

**FARKLI KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN ESANSİYEL
YAĞLAR VE BAHARATLARDA BAZI KALİTE
ÖZELLİKLERİNİN SPEKTROMETRİK YÖNTEMLERLE
TESPİTİ**

**DETERMINATION OF SOME QUALITY
CHARACTERISTICS OF ESSENTIAL OILS AND SPICES
FROM DIFFERENT SOURCES USING SPECTROMETRIC
TECHNIQUES**

ELİF ERCİOĞLU

PROF. DR. İSMAİL HAKKI BOYACI

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.


2017

Elif ERCİOĞLU'nun hazırladığı "Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Esansiyel Yağlar Ve Baharatlarda Bazı Kalite Özelliklerinin Spektrometrik Yöntemlerle Tespiti" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Uğur Tamer
Başkan



Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı
Danışman Üye



Doç. Dr. Ali Topçu
Üye



İkinci Tez Danışmanı : Hasan Murat Veliöğlü

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



En sevdiklerim babam, annem ve kardeşime...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

26.10.2017

Elif ERCİOĞLU

ÖZET

FARKLI KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN ESANSİYEL YAĞLAR VE BAHARATLARDA BAZI KALİTE ÖZELLİKLERİNİN SPEKTROMETRİK YÖNTEMLERLE TESPİTİ

ELİF ERCİOĞLU

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı

İkinci Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Hasan Murat Veliöğlü

Ocak 2017, 110 Sayfa

Her baharatın kendine has aromasını veren uçucu bileşikleri karakteristiktir. Baharatların uçucu yağ bileşiminin büyük bir kısmını terpenoid bileşikler oluşturmaktadır. Aromatik bitkilerin ve uçucu yağların içerdiği terpenoidler bu ürünlerin analizinde kalite kriteri olarak belirlenmiş ve araştırılmıştır. Aromatik bitkilerin ve bu bitkilerden hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağların ayrımı ve içerdikleri terpenoid bileşimlerinin hızlı, kolay ve çevreye zararsız analizi için metot geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yürütülen spektroskopik analizler ile kemometrik metotlar birlikte çalışılmış, kısmi en küçük kareler (PLS) regresyon analizi ve temel bileşen analizi (PCA) modelleri geliştirilmiştir. Pellet formuna getirilen bitki örneklerinin analizleri, Raman spektroskopisi, yakın kızılötesi spektroskopisi (NIRS) ve lazer indüklenmiş plazma spektroskopisi (LIBS) kullanılarak yürütülmüştür. NIRS spektrumları kullanılarak geliştirilen PCA modeli ile bitki örneklerinin ayrımı yapılmış PC1 ve PC2'nin (ilk iki temel bileşen) kümülatif güvenilirliklerinin % 81,42 olduğu gösterilmiştir. Baharat örneklerinin terpenoid bileşimi NIRS kullanılarak araştırılmıştır. 24 terpenoidin kantitatif analizi için

geliştirilen PLS modeli ile NIRS spektrum verileri ve gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) analiz sonuçları arasında lineer bir korelasyon bulunmuştur (0,984-1,000 aralığında R^2 değerleri). Baharat örneklerinin elemental kompozisyonu LIBS ile araştırılmış ve LIBS verileri kullanılarak oluşturulan PCA modeli ile PC1 ve PC2'nin kümülatif güvenilirliklerinin % 92,74 olduğu saptanmıştır. Çalışmanın ikinci kısmında değerlendirilen aromatik bitkilerden hidrodistilasyon yöntemi ile uçucu yağları elde edilmiş, terpenoid bileşimleri ve satın alınan ticari uçucu yağ örneklerinin safsızlıklarının araştırılması Raman spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Raman spektroskopisi ile elde edilen uçucu yağların terpenoid bileşiminin kantitatif analizi için geliştirilen PLS modeli ile Raman spektrum verisi ve GC-MS analiz sonuçları arasında lineer bir korelasyon kurulmuştur (0,988-1,000 aralığında R^2 değerleri). Uçucu yağların Raman ölçümleri ile kurulan PCA modeli sonucunda PC1 ve PC2'nin kümülatif güvenilirlikleri % 96,08 bulunmuştur. Ticari örnekler ile yapılan gerçek örnek denemeleri sonucunda, bazı ticari uçucu yağ örneklerinde sabit yağ tespit edilirken, bazılarında da plastikleştirici ve çözücü kimyasal maddeler tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Baharat, Uçucu yağ, Raman spektroskopisi, NIRS, LIBS, GC-MS, Tağşiş, Terpenoidler

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME QUALITY CHARACTERISTICS OF ESSENTIAL OILS AND SPICES FROM DIFFERENT SOURCES USING SPECTROMETRIC TECHNIQUES

ELİF ERCİÖĞLU

Master of Science, Food Engineering Department

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı

Co-supervisor: Assist. Prof. Dr. Hasan Murat Veliöğlü

January 2017, 110 Pages

Spices have own characteristic flavor arises from volatile compounds that they have comprised. Terpenoid compounds constitute a majority of volatile oil (essential) of spices. Terpenoids, which are present in aromatic plants and essential oils, have been identified and investigated as quality criteria in the analysis of these products. The method has been developed for fast, simple and non-destructive analysis of terpenoid compounds and discrimination of aromatic plants and essential oil obtained by hydrodistillation. For this purpose, chemometric methods have been studied together with spectroscopic analysis and partial least squares (PLS) regression analysis and principal component analysis (PCA) models have been developed. Analyzes of the plant samples in the form of pellets were carried out using Raman spectroscopy, near infrared spectroscopy (NIRS) and laser induced plasma spectroscopy (LIBS). PCA model, developed using NIRS spectra, showed 81.42 % of the cumulative reliability of PC1 and PC2 for the spice samples discrimination. The terpenoid composition of the spice samples was investigated using NIRS. A linear correlation for the quantitative

analysis of 24 terpenoids was found between NIRS spectrum data and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis (R^2 values in the range of 0.984-1.000) through the PLS model developed. The elemental composition of the spice samples was investigated by LIBS and the cumulative reliability of PC1 and PC2 was found to be 92.74 % with the PCA model generated using LIBS data. In the second step of the research, hydrodistillation method was used to extract volatile oils from aromatics plants. Investigation of terpenoid composition of laboratory distilled and commercial essential oil samples have been carried out using Raman spectroscopy. A linear correlation was established between Raman spectrum data and GC-MS analysis results (R^2 values in the range of 0.988-1.000) through the PLS model developed for the quantitative analysis of the terpenoid composition of volatile oils obtained by hydrodistillation method. The cumulative reliability of PC1 and PC2 was found to be 96.08 % as a result of the PCA model established with Raman measurements of essential oils. As a result of real sample tests handled with commercial samples, some commercial volatile oil samples were found to be adulterated with edible oil, plasticizer and solvents substances.

Key Words: Spice, Essential oils, Raman spectroscopy, NIRS, LIBS, GC-MS, Adulteration, Terpenoids

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam aşamasında yoluma tecrübe ve bilgisiyle ışık tutan, maddi ve manevi destekleri ile karşılaştığım güçlükler karşısında her zaman yanımda olan, akıl hocam ve değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı' ya,

Araştırmalarım sırasında yardımını esirgemeyen, tezimi geliştirmemde destek olan ikinci tez danışmanım, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Hasan Murat Velioğlu'na

Tez çalışmamın GC-MS analizleri ile ilgili bölümünde yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ali Topcu' ya,

Tez çalışmamın LIBS analizleri kısmında desteğini veren Yük. Gıda Müh. Banu Sezer'e,

Dr. Burcu Güven, Yük. Gıda Müh. Selin Uysal, Kimyager Demet Ataman Sadık, Gıda Müh. Kübra Tayyarcan, Gıda Müh. Zeynep Arslan, Ar. Gör. Tümay Temiz, Ar. Gör. Efe Geniş ve kocaman bir aile olduğumuz için isimlerini tek tek sayamadığım fakat her türlü destekleri, yardımları ve dostlukları için Hacettepe Üniversitesi BBRG grubunun tümüne,

Her konuda yardımlarını esirgemeyen ve destek olan sevgili hocalarım Yard. Doç. Dr. Serap Velioğlu, Dr. Esra Acar Soykut, Dr. Haslet Ekşi, Dr. Özay Menteş'e

Her kararımın arkasında duran, maddi manevi desteklerini esirgemeyen, yaptığım her işte bana ilham ve güç veren herşeyden değerli ailem; annem Ayşen Ercioğlu, babam Tamer Ercioğlu, kardeşim Nihan Ercioğlu, teyzem Nurşen Bilen Erol'a

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Değerlendirilen Baharat ve Aromatik Bitkiler	8
2.2. Uçucu Yağ Üretimi	15
2.3. Uçucu Yağ Bileşenleri	18
2.4. Baharat ve Uçucu Yağlarda Yapılan Tağşişler	21
2.5. Spektroskopik Analiz Yöntemleri	25
2.5.1. Raman Spektroskopisi	25
2.5.2. NIRS	30
2.5.3. LIBS	33
2.6. Kemometrik Analiz Metotları	38
3. MATERYAL VE METOT	44
3.1. Materyal	44
3.1.1. Materyal Temini	44
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	44
3.2. Metot	44
3.2.1. Hidrodistilasyon ile Uçucu Yağ Üretimi	44
3.2.2. Spektrometrik Ölçümler	45
3.2.2.1. Baharatların ve Uçucu Yağların Raman Spektroskopisi Ölçümleri	45
3.2.2.2. Baharatların NIRS Ölçümleri	46
3.2.2.3. Baharatların LIBS Ölçümleri	46
3.2.3. Uçucu Yağların GC-MS Ölçümleri	46
3.2.4. Kemometrik Analiz	47
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	48

4.1. Baharatların Analizi	48
4.1.1. Raman Spektrumlarının Değerlendirilmesi	48
4.1.2. NIR Spektrumlarının Değerlendirilmesi.....	49
4.1.3. LIBS Spektrumlarının Değerlendirilmesi	51
4.1.4. Baharatların Spektral Veri Analizi	53
4.1.4.1. Baharatların NIR Spektrumlarının Veri Analizi	53
4.1.4.2. Baharatların LIBS Spektrumlarının Veri Analizi.....	58
4.2. Uçucu Yağların Analizi	62
4.2.1. Uçucu Yağların GC-MS Analizi.....	62
4.2.2. Uçucu yağların Raman Spektrumu Analizi	69
4.2.3. Uçucu Yağların Raman Spektrumlarının Veri Analizi.....	85
5. SONUÇ VE YORUM.....	92
KAYNAKLAR.....	98
ÖZGEÇMİŞ	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kurutulmuş ardıç (<i>Juniperus communis</i>) meyveleri	9
Şekil 2.2. Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>) yaprakları	10
Şekil 2.3. Defne (<i>Laurus nobulis</i>) yaprakları	11
Şekil 2.4. Kurutulmuş karabiber (<i>Piper nigrum</i>) meyveleri.....	11
Şekil 2.5. Kekik (<i>Origanum vulgare</i>) yaprakları	12
Şekil 2.6. Lavanta bitkisi (<i>Lavandula latifolia</i>).....	13
Şekil 2.7. Nane (<i>Mentha spicata</i>) yaprakları.....	13
Şekil 2.8. Fesleğen (<i>Ocimum basilicum</i>) yaprakları.....	14
Şekil 2.9. Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>).....	15
Şekil 2.10. Işın saçılmaları	26
Şekil 2.11. Raman spektroskopisi enstrümanları. a) lazer, b) odaklama lensi, c) örnek, d) toplama lensi, e) Raman saçılması, f) dar dalga boyu aralıklı filtre, g) spektrometre, h) CCD, i) yazılım.	27
Şekil 2.12. NIR enstrümanları. a) ışık kaynağı, b) ışın demeti ayırıcı sistem, c) yansıtıcı, d) örnek odası, e) yayılma yansıması dedektörü, f) transmisyon dedektörü, g) yazılım.....	31
Şekil 2.13. LIBS enstrümanları. a) lazer kaynağı ve soğutucu, b) atımlı lazer kafası, c) ayna, d) odaklayıcı lens, e) örnek, f) toplayıcı lens, g) optik fiber, h) dalga boyu seçici, i) dedektör dizilimi, j) dedektör tetikleyici sinyal, k) yazılım	34
Şekil 3.1. Clevenger düzeneği. a-e) Uçucu yağın buhar ile taşındığı yol, f-g) Soğutucu bölme, h-j) Toplama balonu, b-k) Geri kazanım tüpü.	45
Şekil 4.1. Baharat örneklerinin Raman spektrumları	49
Şekil 4.2. Dokuz çeşit aromatik bitki türünün NIR spektrumları	50
Şekil 4.3. Dokuz çeşit aromatik bitki türünün LIBS spektrumları.....	52
Şekil 4.4. Geliştirilen PLS modelinde kullanılan baharatların a) ham NIR spektrumları ve b) ön işlemlerden sonra NIR spektrumları.....	55
Şekil 4.5. NIR spektrumları kullanılarak geliştirilen PCA modeli dokuz çeşit baharat türünün sınıflandırılması. NIR spektrumları verilerinin PC1/PC2 skorları (n=76)..	58
Şekil 4.6. Geliştirilen PCA modelinde kullanılan baharatların a: ham LIBS spektrumları ve b: ön işlemlerden sonra LIBS spektrumları	59

Şekil 4.7. LIBS spektrumları kullanılarak geliştirilen PCA modeli dokuz çeşit baharat türünün sınıflandırılması. LIBS spektrumları verilerinin PC1/PC2 skorları (n=75).....	60
Şekil 4.8. LIBS spektrumları kullanılarak geliştirilen PCA modelleri ile dokuz çeşit baharat türünün dört alt grup halinde sınıflandırılması. LIBS spektrumları verilerinin PC1/PC2 skorları.....	61
Şekil 4.9. Değerlendirilen yirmidört terpenoidin kimyasal yapıları.....	64
Şekil 4.10. Dokuz çeşit baharat türünün Raman spektrumları.....	70
Şekil 4.11. Üretimi yapılan kekik uçucu yağları ve ticari kekik uçucu yağının ham Raman spektrumu.....	72
Şekil 4.12. Üretimi yapılan lavanta uçucu yağları ve ticari lavanta uçucu yağının ham Raman spektrumu.....	74
Şekil 4.13. Üretimi yapılan ardıç uçucu yağları ve ticari ardıç uçucu yağının ham Raman spektrumu.....	75
Şekil 4.14. Üretimi yapılan biberiye uçucu yağları ve ticari biberiye uçucu yağının ham Raman spektrumu.....	76
Şekil 4.15. Ticari biberiye uçucu yağın Raman spektrumu ile bitkisel yağların ve laboratuvarında distile edilen uçucu yağın (B3) Raman spektrumunun karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.16. Üretimi yapılan defne uçucu yağları ve ticari defne uçucu yağının ham Raman spektrumu.....	78
Şekil 4.17. Üretimi yapılan fesleğen uçucu yağları ve ticari fesleğen uçucu yağının ham Raman spektrumu.....	79
Şekil 4.18. Üretimi yapılan karabiber uçucu yağları ve ticari karabiber uçucu yağının ham Raman spektrumu.....	80
Şekil 4.19. Ticari karabiber uçucu yağın Raman spektrumu ile bitkisel yağların ve laboratuvarında distile edilen uçucu yağların (KA1 ve KA3) Raman spektrumunun karşılaştırılması.....	82
Şekil 4.20. Üretimi yapılan nane uçucu yağları ve ticari nane uçucu yağının ham Raman spektrumu.....	83
Şekil 4.21. Üretimi yapılan zencefil uçucu yağları ve ticari zencefil uçucu yağının ham Raman spektrumu.....	84

Şekil 4.22. Ticari zencefil uçucu yağın Raman spektrumu ile bitkisel yağların ve laboratuvarında distile edilen uçucu yağın (Z3) Raman spektrumunun karşılaştırılması	85
Şekil 4.23. Raman spektrumları kullanılarak geliştirilen PCA modeli dokuz çeşit uçucu yağın sınıflandırılması (n=75)	86
Şekil 4.24. Karabiber, biberiye ve zencefil uçucu yağları için çizilen PCA grafikleri.	87
Şekil 4.25. DEP bileşiğinin bilinen konsantrasyonuyla PLS modelinin tahmin ettiği değerlerin karşılaştırılması a) kalibrasyon grafiği b) validasyon grafiği.....	90



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Terpenoid sınıflandırması.....	20
Çizelge 4.1. Baharatların NIR spektrumları ile geliştirilen PLS modelinin istatistiksel verileri ve yöntem validasyon değerleri (n=81).....	56
Çizelge 4.2. Üretimi yapılan uçucu yağlardaki 24 adet terpenoidin konsantrasyon oranları	66
Çizelge 4.3. Ticari uçucu yağlardaki 24 adet terpenoidin konsantrasyon oranları	67
Çizelge 4.4. Uçucu yağların Raman spektrumları ile geliştirilen PLS modelinin istatistiksel verileri ve yöntem validasyon değerleri (n=81).....	89



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

R^2	: Belirleme katsayısı
v_s	: Simetrik gerilme
v_{as}	: Asimetrik gerilme
δ_s	: Düzlemde makaslama (scissoring-in plane bending)
γ	: Düzlem dışı açı bükülmesi (out of plane bending)
ρ_t	: Burulma titreşimi (twisting-out of plane bending)
ρ_w	: Dalgalanma titreşimi (wagging-out of plane bending)
ρ_r	: Sallanma titreşimi (rocking-in plane bending)
π	: Üçden fazla atomun düzlem dışı bükülme hareketine dâhil olması
ΔE	: Titreşim enerji düzeyleri arasındaki fark

Kısaltmalar

GC	: Gaz kromatografisi
MS	: Kütle spektroskopisi
NIRS	: Yakın kızılötesi spektroskopisi
LIBS	: Lazer indüklenmiş plazma spektroskopisi
UV	: Morötesi
CT	: Kematip
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
CCD	: Yük eşleşmiş cihaz
PLS	: Kısmi en küçük kareler
PCA	: Temel bileşen analizi
RMSEC	: Kalibrasyonun kök ortalama kare hatası
RMSECV	: Çapraz validasyonun kök ortalama kare hatası
RMSEP	: Tahminin kök ortalama kare hatası
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
LV	: Gizli değer
PC	: Temel bileşen

1. GİRİŞ

Eski çağlardan bu yana beslenmede önemli bir yere sahip olan baharat ve aromatik bitki materyalleri dünya ve ülkemiz ticaretinde önemli bir yer edinmiştir. Teknolojik açıdan gelişmiş ülkeler hammaddeyi işlenmiş ürüne çevirerek dünya piyasasındaki talebi karşılamaktadır. Türkiye’de de baharat ve aromatik bitki tarımı ve ticareti önemli bir husus teşkil etmektedir. Ülkemiz coğrafi özellikleri ve bitki zenginliği konusunda avantajlı bir konumda olmasına rağmen kaynakları yeterli miktarda değerlendirememiştir. Kültüre alınmış bitkiler yeterli çeşitlilikte olmamakta, baharatların önemli bir miktarı ihraç edilmektedir. Araştırmacılar hedef bitkilerin tanımlanması, yetiştirilmesi, uçucu bileşen analizi gibi başlıklarda çalışmalar yürütmektedirler [1, 2].

Tarih boyunca nesilden nesile aktarılan bitki-insan ilişkisini (gıda veya ilaç olarak bitki kullanımı) kapsayan kültürel birikim, etnobotanik adı altında incelenmektedir. Türkiye etnobotanik açıdan oldukça zengin bir mirasa sahiptir. Fakat teknolojik gelişmelere paralel olarak kentlere göç ile birlikte bazı bilgiler kaybolma tehlikesiyle karşı karşıyadır. Botanik bilgilerin doğruluğu ve bitki tanımlaması ülkemiz ekonomisi için büyük önem teşkil etmektedir [3, 4].

Etnobotanik araştırmalarında Hindistan lider ülke konumdadır. Ayrıca, Çin’de Kunming Botanik Enstitüsü’de bulunan etnobotanik araştırmalar yapan laboratuvarında araştırmacılar bitkiler üzerinde çalışmalarını sürdürmektedirler [5]. Baharatların ve uçucu yağ bitkilerinin kalite kriterlerinin belirlenmesi, doğru botanik isimlendirme, köken tespiti, organoleptik testler, makroskopik, mikroskopik, kimyasal ve kromatografik testler, yabancı madde testlerinin yürütülmesi standartlarının belirlenmesi için önem arz etmektedir.

Birçok baharat pahalı emtialar olarak bilinir ve taşışe açıktır. Buna karşılık geliştirilen standartlardan en önemli iki tanesi Amerika Birleşik Devletleri’nin (ABD) ve Avrupa Birliği’nin (AB) belirlediği standartlardır. Standartlar aynı parametrelere dayanır ve bu uluslararası standartlar; kontaminasyon, kül miktarı, asitte çözünmeyen kül tayini, uçucu yağ, nem miktarı, su miktarı, mikrobiyal ölçümleri, pestisit ve mikotoksin seviyeleri, kütle yoğunluğu testlerini içermektedir. Ayrıca standartlarda analiz sonuçları için limit değerlere de yer verilmiştir [6].

Uçucu yağ sektöründe taşış günümüzde hala ciddi bir problem olarak var olmaktadır. Şüphesiz doğal uçucu yağlara sentetik aromaların karıştırılması

ekonomik sebepler doğrultusunda ortaya çıkmaktadır. Bazı uçucu yağlar doğal olarak tek bir bileşeni yüksek oranda içermektedir ve çoğunlukla bu bileşene muadil sentetik aromalar düşük fiyatlara temin edilebilmektedir. Bu bileşiğin uçucu yağa etikette belirtilmeden sonradan eklenmesi tağşiş anlamına gelmektedir [7]. Uçucu yağlarda yapılan tağşişler yalnızca sentetik aromalar ile gerçekleşmemektedir. Kimi zaman tağşiş, mineral yağların eklenmesi veya uçucu yağın etil alkol ile dilüsyonu şeklinde de gerçekleşmektedir [7].

Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nün yaptığı bir çalışmada uçucu yağ üretimi yapan 21 firmadan 14'ü ile anket yapılmış ve bulgular doğrultusunda bazı firmaların uçucu yağ analizlerinin ihracat yaptıkları ÷lkeler tarafından gerçekleştirildiği, bir kısmının da Eczacılık fakùltelerinde yürütüldüğü ortaya çıkmıştır. Isparta'da uçucu yağ eldesi amacıyla yetiştirilen bitkinin lavanta değil lavandin olduğu, bu sebeple de uçucu yağ piyasasında talep görmediği sonucu elde edilmiştir. Çalışmada iç piyasada ticareti gerçekleştirilen uçucu yağların denetimlerinin artırılması ve sahte uçucu yağ üretimi yapan firmalar için yaptırımlarda bulunulması gerektiği belirtilmiştir [8].

Uçucu yağlara yönelik yapılan tağşişin tespiti için birçok metottan faydalanılmaktadır. Gaz kromatografisi (GC), gaz kromatografisi-kùtle spektroskopisi (GC-MS), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC), bu yöntemlerden bazılarıdır [7].

Geleneksel analiz yöntemlerinin uzun süren örnek hazırlama prosedürleri gerektirmesi neticesinde zaman ve kimyasal sarfiyatı söz konusu olmaktadır. Buna karşılık titreşim spektroskopisi metotları hızlı ve tahribatsız analiz imkânı sunmaktadır. Titreşim spektroskopisi infrared ışınlarının maddeler tarafından absorplanması veya saçılmasını araştıran bir spektroskopi dalıdır. Fourier dönüşümü (FT), yakın kızılötesi spektroskopisi (NIRS), orta kızılötesi spektroskopisi (MIRS), Raman spektroskopisi ve hiperspektral görüntüleme (HSI) gibi bir dizi titreşim spektroskopisi tekniği, çeşitli gıda ürünlerinin tanımlanması ve kalite analizi için hassas ve hızlı analitik teknikler olarak yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca bu teknikler, kızılötesi radyasyon tarafından kaplanan geniş dalga aralığı ve modern spektroskopik cihazların yüksek çözünürlüklü ve hızlı tarama özellikleri sayesinde geleneksel analitik yöntemler karşısında güçlü ve etkili alternatifler haline gelmektedir [9].

Literatürde uçucu yağ analizlerinde kullanılan spektroskopik analiz yöntemleri de oldukça çeşitlidir. Örneğin öjenol ve timol sırasıyla karanfil ve kekikte bulunan majör fenolik bileşiklerdir. Vanilin ise gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan en önemli sentetik aroma vericidir. Bu bileşenlerin uçucu yağlarda analizine yönelik olarak Backheet [10] bir çalışmada morötesi spektroskopide (UV)'de absorbanlarını ölçmüştür. Bitki metabolitlerinin birincil metabolitleri olan protein yağ ve karbonhidrat bileşimi ve ikincil metabolitleri (fenolik bileşenler, terpenoidler, alkaloidler, poliasetlenler, bitril bileşenler, iridoidler ve klorofil) azaltılmış toplam yansıma kızılötesi spektroskopisi (ATR-IR) ve Raman spektroskopisi ile incelenmiştir. Schulz ve Baranska [11]., ATR-IR ve Raman kullanarak yapılan uçucu yağ analizlerinin yanı sıra, fesleğen (*Ocimum basilicum*), rezene (*Foeniculum vulgare*), kekik (*Thymus vulgaris*), güvey otu alt türleri (*Origanum majorama*, *Origanum vulgare*), karabiber (*Piper nigrum*), papatya (*Chamomilla recutita*), okaliptus çeşitleri ve sitrus meyvelerde bulunan bazı terpenoidlerin kalibrasyonu için kemometrik modellerin de geliştirildiğini derlemelerinde belirtmişlerdir.

Bitki dokularının bu denli kapsamlı incelenmesine olanak tanıyan titreşim spektroskopisi, baharat ve uçucu yağlarda bileşen tespitini de olanaklı kılmıştır. Bazı uçucu yağlarda bulunan önemli bileşenlerin analizine örnek olarak; nane yağında mentol, kakule ve lavantada linalol ve linalil asetat, kekikte timol, karanfilde öjenol ve karyofillen, kimyonda karvon verilebilir. Örnekler çoğaltılırsa; güveyotunda α -vetivone ve β -vetivonei, bademde benzoik asit, tarçında sinnamik asit ve sinnamik aldehit, limonda sitral ve limonen, sardunyada geranil asetat ve pinen, portakalda limonen, yıldız anasonda pinen de spektroskopik olarak araştırılmıştır [10-16]. Uçucu yağın analiz edilmesi ile çörek otunun (*Nigella sativa*) majör biyoaktif bileşeninin timokinon olduğu tespit edilmiştir. Çörek otunun ve biyoaktif maddesi timokinon'un antidiyabetik, antioksidan, antihistaminik, antiinflamatuvar, antikanserojen etkileri ve kanın pıhtılaşması üzerindeki hematolojik özellikleri bildirilmiştir. Bununla birlikte çörek otunun bazı toksik etkileri de araştırılmıştır [17]. Schulz ve ark. uçucu [14] yağların analizine yönelik yaptıkları bir çalışmada ATR/Fourier dönüşümlü kızılötesi ışın spektroskopisi (ATR/FT-IR) ve yakın kızılötesi-FT-Raman (NIR-FT-Raman) spektroskopisi kullanmışlardır. Çalışmalarında, bazı aromatik bitki türlerinin uçucu yağlarını elde

etmiş ve elde ettikleri yağlarda en çok bulunan terpenoidleri (karvakrol, timol, ρ -simen, γ -terpinen, kafur, ökaliptol, α -pinen ve β -pinen) araştırarak, saf terpenoid numuneleri ile birlikte spektrometrik yöntemlerle analiz etmişlerdir.

Baharat analizleri de spektroskopik yöntemler ile yapılabilmektedir. September çalışmasında NIR-HSI ve MIR spektroskopisi ile karabiberde, karabuğday ve darı ile yapılan tağşişi saptamıştır. Karabiberin, karabuğday ve darı ile karışımları hazırlanmış ve kısa dalga boylu kızılötesi (SWIR) spektroskopisi ile 1000–2498 nm spektral aralıkta incelenmiştir [16]. Kırmızıbiber dünyada büyük oranda ticareti yapılan bir baharattır ve Sudan boyaları ile tağşişi bilinen bir gerçektir. Kırmızıbiber baharatında yapılan bir çalışmada, kırmızıbiberler Sudan I boyasıyla ile % 0,1-5 oranlarında kasıtlı olarak tağşiş edilmiş NIRS ve Raman spektroskopisi ile analiz edilmiştir [18]. Başka bir çalışmada soğan tozunda yapılan mısır nişastası tağşişi FT-IR ile FT-NIR ile saptanmıştır [19]. Anibal ve ark. [20] yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) ile baharatlarda Sudan I boyasını tespit etmişlerdir. Titreşim spektroskopisi gıdalarda köken analizi için de kullanılmaktadır. Örneğin çok değerli bir baharat olan safranın köken analizi için Zalacain ve ark. [21] FT-NIR spektroskopisi ile safran bitkisinin köken analizini yapmış ve İspanya, İran ve Çin'den temin edilen safran örneklerinin ayrımını sağlamışlardır.

Spektrometrik tekniklerin gıda analizleri için faydalı bir araç haline gelmeye başlamasıyla birlikte karmaşık gıda sistemlerinin çözümü için kemometri adı verilen disipline ihtiyaç doğmuştur. Kemometri, istatistik ve matematik bilimlerinin kullanıldığı bir kimyasal veri işleme disiplini. Kemometri, kimyasal analizlerde, karmaşık bir kimyasal veriden ilgili ve önemli bilginin ayrılması ve ortaya çıkmasına olanak tanıyan güçlü bir araç olmuştur. Bu yöntemle spektroskopik ölçümler (NIR, FT-IR, MIR, UV-görünür bölge (UV-vis), Raman, Floresans vb.) ve kromatografik verileri birlikte kullanılarak gıdalarda tağşiş, köken analizi, bileşen analizi gibi çeşitli analizler yürütülmüştür. Anibal ve ark. [20] nükleer manyetik rözenans (NMR) ve UV-vis verilerini kullanarak baharatlarda Sudan boyalarını analiz etmişlerdir. Kemometri, spektroskopik verinin çoklu değişken veri analizi ile işlenmesidir. Bu teknikler içinde en çok kullanılanları temel bileşenler analizi (PCA), kısmi en küçük karaler-ayrım analizi (PLS-DA) ve kısmi en küçük karaler (PLS) regresyon analizi olmuştur. Franco [16] çalışmasında spektrometrik yöntemlerle elde ettiği verileri PCA yöntemi ile analiz etmiştir. PCA modeli yağ ve

proteine ait olan karakteristik pikler seçilerek geliştirilmiştir. NIR HSI görüntüleri için PLS analizi modeli geliştirilmiştir. Modelin sınıflandırma doğruluğu darı ile tağışı yapılan karabiberler için % 77 karabuğday ile tağışı yapılanları için % 70 bulunmuştur. Tüm örnekler ATR, FTIR ve MIR kullanılarak da analiz edilmiş ve elde edilen veri için PLS analizi yapılmıştır. Anibal [20] ise Sudan I boyasının analizine yönelik yaptığı çalışmada tağışı saptamak için PCA modelleri geliştirmiştir.

Tez kapsamında baharat analizleri için LIBS ve titreşim spektroskopisi metotlarından Raman ve NIR spektroskopileri ile çalışılırken, uçucu yağ analizleri Raman spektroskopisi ile yürütülmüştür. Ayrıca baharat ve uçucu yağ analizlerinde Raman ve NIR spektroskopilerinin terpenoid bileşen tespiti için uygunluğu değerlendirilmiş, terpenoid kantifikasyonu için kalibrasyon modelleri geliştirilmiştir. Terpenoid analizleri için referans yöntem olarak GC-MS analizleri yürütülmüştür. Baharat ve uçucu yağların sınıflandırılması LIBS, Raman ve NIR spektrumlarından elde edilen verilerin işlenmesi ile sağlanmıştır.

Yürütülen spektroskopik analiz metotlarının sonuçlarını daha anlamlı hale getirmek için kemometriden yararlanılmıştır. Bu doğrultuda PLS ve PCA modelleri geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Günümüzde de oldukça geniş bir kullanım alanına sahip olan baharatların tarihi, insanlık tarihi kadar eskidir. Doğu, Yunan ve Roma gibi eski çağ medeniyetlerinden bu yana bitkiler, baharat, medikal, kozmetik ve esans materyali olarak çeşitli amaçlar için kullanılmıştır. Baharatların kullanımına ilişkin en eski belge Sümerlerin kekiği kullanmaya başladıkları MÖ 5000 yılına dayanmaktadır [22].

Baharatların ticareti de tarihte önemli bir yer edinmiş olup bu amaçla kullanılan yola ismini vererek 'Baharat Yolu' olarak anılmasını sağlamıştır [22]. Başka hiçbir ham madde modern medeniyetin gelişmesinde baharatlar kadar etkin bir rol oynamamıştır.

Baharatlar tarihin rotasını değiştirmiş; gıdalarda, tıpta ve kozmetikte bileşen olması sebebiyle ekonomik yönden önemli bir yere sahip olmuştur. Baharatların kullanımına yönelik bilgiler binlerce yıl nesilden nesile aktarılmış ve günümüze ulaşmıştır [22].

Baharatlar ve aromatik bitkiler eski çağlardan bu yana koruyucu, renklendirici ve aroma arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Günümüzde baharatlar ve onların biyoaktif bileşenleri birçok ilaç ve kimyasalın yapımının yanı sıra aroma verici olarak gıdalarda, kozmetikte ve parfümeride yoğunlukla kullanılmaktadır. Birçok ülkede geleneksel tıp ilminde uzun yıllar yer almış, özellikle ilaç, kimya, gıda endüstrilerinde sağlığı iyileştirici potansiyeli sebebiyle medikal çalışmalara konu olmuştur [23, 24]. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, içerdikleri biyoaktif bileşenlerin antioksidan, sindirim uyarıcı, hipolipidemik ve antibakteriyel, antienflamatuvar, antiviral ve antikanserojenik aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bu faydalı fizyolojik etkiler hastalık önleyici uygulamaların potansiyeline sahip olabilmektedir [22].

Tüm kültürlerde baharatlar beslenmede önemli bir yere sahiptir. Gıda aromasını öne çıkartarak tuz ihtiyacını ve yağların gereksinimi düşürmekte, organizmaya ekstra antioksidan sağlamaktadır [22].

Bitkiler geçmişte birçok hastalığı tedavi amaçlı kullanılmış olup, etken maddeleri günümüzde hala ilaç yapımında kullanılmaktadır. Fransız Henri Leclerc (1870-1955) tarafından ilk defa kullanılan 'fitoterapi' terimi bitkiler ile tedavi anlamına gelmektedir. Dünya sağlık örgütü (WHO), dünya nüfusunun % 80 inin hala öncelik olarak bitkisel droglar ile tedaviye yöneldiğini belirtmiştir. Amerika Birleşik

Devletleri'nde (ABD) ilaç firmalarının reçetelerinin % 25'i bitki ekstraktlarından ve biyoaktif maddelerinden oluşmaktadır (vimbilastin, rezerpin, kinin, aspirin vb.) [25]. Bitkisel droglar, bitkilerin ikincil metabolitleri olup fitokimyasal olarak da adlandırılırlar. Birincil metabolitlerden farklı olarak büyüme ve onarım için doğrudan gerekli olmadıklarından bu şekilde adlandırılmışlardır. Fitokimyasalların oldukça geniş fonksiyonları vardır. Yırtıcılara karşı koruyucu toksinler, tozlaşma için insektleri çeken feromonlar, mikrobiyal enfeksiyona karşı koruyucu fitoaleksinler, toprak ve ışık için rekabette komşu bitkileri inhibe edici yönde etkileyen allelopatik maddeler bu fonksiyonlara örnek olarak verilebilir [26].

Türkiye, florası açısından Avrupa ve Orta Doğu'nun en zengin ülkelerindedir. 9000'den fazla bitki türünün 3000'i endemik bitki olup, 1000'i medikal amaçla kullanılmaktadır [11, 12].

Uçucu yağlar, baharat ve aromatik bitkilerin koku bileşikleridir. Alkol, eter, bitkisel ve mineral yağlarda kolaylıkla çözünebilen, genellikle hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen bu kokulu, uçucu bileşikler, bitkilerin farklı organlarında bulunan metabolizma ürünleridir. Bitkilerin kendine özgü kokularını terpenoid hidrokarbonların oksijenli bileşikleri vermektedir. Aldehit, fenol, ester, eter, keton, alkol yapıda oksijenli bileşenler uçucu yağların temel bileşenleridir. Baharat ve aromatik bitkilerde bulunan uçucu yağ bileşen miktarı, türe ve bitki organına göre değişiklik göstermektedir.

Türkiye'nin ihraç ettiği başlıca uçucu yağlar, gül, kekik, defne ve limondan genellikle buhar/su distilasyonu veya soğuk sıkım yöntemi elde edilen uçucu yağlardır. Uçucu yağlar ihracatımızın büyük bir kısmı Avrupa Birliği (AB) ülkelerine yöneliktir. Uçucu yağ ihracatında önde gelen dünya ülkeleri değerlendirildiğinde, Avrupa'da Fransa, İsviçre, İngiltere, Almanya, Hollanda, ABD ve Kanada'dır. Türkiye'de ise üretimi yapılan gülyağlarının neredeyse tamamı Japonya, ABD, İsviçre ve AB ülkelerine ihraç edilmektedir. Kekik uçucu yağları da ülkemizin son zamanlarda ihraç ettiği uçucu yağlardan olup, ABD, Hollanda, Fransa, Belçika, Almanya ihracat yapılan başlıca ülkelerdendir. Defne uçucu yağlarının oldukça büyük miktarda üretimi yapıldığı bilirse de ayrıca bir GTİP (Gümrük tarife istatistik pozisyonu) numarası olmaması sebebi ile ihracat ve ithalatı ile ilgili olarak yorum yapılamamaktadır [27].

Türkiye'nin ithalatı kapsamında uçucu yağlar değerlendirildiğinde, nane, bergamut, lavanta, melisa ve soğuk pres ile üretimi yapılan portakal yağıdır. İthalat yapılan başlıca ülkeler öncelikle AB ülkelerinden olup, ABD, İngiltere, Çin, Hindistan, Brezilya, Hindistan'dan da ithalat gerçekleştirilmektedir. Global açıdan uçucu yağ üretiminin yaklaşık olarak ortalama 45000 ton dolaylarında olduğu bildirilmiş olup, bu üretimin % 90'ını Çin nanesi, ABD nanesi, karanfil, ökaliptus, melisa, lavanta, biberiye, paçuli, limon, misket limon, portakal, sedir ağacı, litsea cubeba ve sassafras uçucu yağları oluşturmaktadır. Dünya çapında ticareti yapılan en popüler uçucu yağlar ise; nane, ökaliptus, limon, karanfil, melisa, misket limon ve portakal uçucu yağlarıdır [27].

Aromatik bitkilerden elde edilen yağların gıda takviyesi olarak kullanımları da mevcut olup melisa, adaçayı, nane bu amaçla piyasada satışa sunulan bazı uçucu yağlara örnektir [28].

Tez kapsamında değerlendirilen aromatik bitkilerin uçucu yağ bileşenleri detaylı olarak verilmiştir.

2.1. Değerlendirilen Baharat ve Aromatik Bitkiler

Ardıç, *Cupressaceae* familyasına mensup olan Ardıç bitkisi her daim yeşil kalan, boyu 6 metreye ulaşabilen bodur bitkidir. Kuzey yarımkürede oldukça yaygın görülüp, Avrupa'da Akdeniz'den İskandinavya'ya; Asya'da Himalaya dağlarının kuzeyine; Kuzey Amerika'da güney eyaletlerinden Grönland'a kadar oldukça geniş bir coğrafyada yetişmektedir. Küçük kırmızı meyveleri uçucu yağ üretimi açısından verimli kabul edilir (Şekil 2.1.). Meyveleri şeker açısından da zengin olup fermentasyonu ve distilasyonu ile kendine has karakteristik tadı ve aroması olan cin ve benzer alkoller üretilir [29]. Ardıç meyvelerinin olgunlaşması iki yılı bulduğundan aynı ağaçta hem olgunlaşmış hem de olgunlaşmamış meyvelere rastlamak mümkün olmaktadır. Uçucu yağı büyük oranda İtalya, Fransa, Yugoslavya, Avusturya, Çek Cumhuriyeti, İspanya, Almanya ve Kanada'da üretilmektedir. Ardıç meyvesinin uçucu yağlarında α -pinen (% 24,1-55,4), sabinen (% 0-28,8), β -mirsen (% 0-22), terpinen-4-ol (% 1,5-17,0), limonen (% 0-10,9), β -pinen (% 2,1-6,0), δ -terpinene (% 0-5,8), δ -3-karen (% 0-3,0), α -terpinen (% 0-2,6), β -karyofillen (% 1,3-2,2), ρ -simen (% 0-2,0), terpinolen (%0-1,9), α -thujene (% 0-1,8), α -terpineol (%0-1,6) terpenoidleri olduğu bildirilmiştir [29]. Kubeczka ve ark. [24] ardıç

meyvesi uçucu yağ bileşenlerini tayin ettikleri bir çalışmada, % 41,1 α -pinen, % 15,2 β -mirsen, % 9,8 sabinen, % 6,3 germakren D, % 3,1 limonen, % 2,8 β -pinen, % 2,7 δ -kadinen, % 1,9 erpinen-4-ol, % 1,8 germakren B, % 1,7 β -karyofillen, % 1,4 α -karyofillen, % 1,0 β -elemen oranlarına terpenoidler tespit etmişlerdir. Ardıç uçucu yağlarında en sık rastlanan taşıyıcılar fermente olmuş meyvelerden elde edilen uçucu yağların, ardıç ağaç veya dallarının uçucu yağlarının, terebentin yağlarının veya terpen hidrokarbon fraksiyonlarının katılması yolu ile olmaktadır [24]. Eğer uçucu yağ okside olursa cilt hassasiyetlerine yol açabilmektedir. Yüksek oranda α -pinen içermesinden dolayı oksidasyondan kaçınmak için buzdolabında, karanlık bir ortamda ve hava geçirmez ambalajda muhafaza edilmelidir [24].



Şekil 2.1. Kurutulmuş ardıç (*Juniperus communis*) meyveleri

Biberiye, *Lamiaceae* ve *Labiatae* ailesinden olan *Rosmarinus officinalis* biberiyenin botanik ismidir. Milattan önce 500 yılından bu yana Avrupa'da çeşnilendirici olarak kullanılmaktadır. Akdeniz Bölgesi'ne özgü bir bitki olup özellikle İtalya ve Fransa'da oldukça popülerdir. İngiltere, Cezayir, Fransa, Almanya, İtalya, Fas, Portekiz, Rusya, İspanya, Türkiye ve ABD'de yetiştirilmektedir. Fransa, İspanya ve Tunus önemli biberiye uçucu yağı üreticileri arasında olup, yıllık 200-300 ton üretim söz konusu olmaktadır. Biberiye yaprakları taze, kurutulmuş, doğanmış, ezilmiş, öğütülmüş veya tam formda kullanılmakta olup küçük, dar ve iğne uçludur (Şekil 2.2.). Taze yaprakları parlak ve koyu yeşildir. Kuru yaprakları koyu yeşilden kahverengi-yeşil renge dönen renklere sahiptir [23]. Yapraklar parçalandığında güçlü aromatik, çamsı, ağaçsı bir rahiya ve nispeten tatlı bir tat verir. Biberiye yaprakları, nispeten naneli, adaçayı benzeri, keskin, balzamik ve kafur benzeri acımsı ve ağaçsı bir tada sahiptir. Kuru formu güçlü aromasını muhafaza etmektedir. Sap ve çiçekleri de ayrıca aromatiktir. % 0,5-2,5 oranında içerdiği uçucu yağı biberiyeye karakteristik aromasını veren ökaliptol (% 30-40), borneol (% 16-20), kafur (% 15-25), bornil asetat (% 2-7) ve α -pinen (% 25) ihtiva

etmektedir. Oleoresini yeşil-kahverengi yarıkatı olup, A ve C vitamini, potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir ve fosfor içermektedir [23]. Distilasyon başlangıcı fraksiyonları α -thujene, α -pinen, kamfen, β -pinen ve ökaliptol olurken, sonrasında kafur ve bornil asetat bileşime dâhil olmaktadır [30]. Biberiye uçucu yağ bileşeni kompozisyon, profil ve oran varyasyonu lokasyon, populasyon ve fenoloji ile bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [31]. Bitkinin iğne uçlu yapraklarından elde edilen estragol kemotip uçucu yağ içeriğinde; estragol (% 73,4-87,4) linalol (% 0-8,6), ökaliptol (% 0,6-6,0), β -karyofillen (% 0-4,0), limonen (% 0,1-3,0), terpinen-4-ol (% 0-2,2), metil öjenol (% 0-4,2), Bornil asetat (% 0-1,1), 10-epi- α -kadinol (% 0-1,3), β -osimen (% 0-2,2), öjenol (% 0-1,2), kafur (% 0-1,0) bulunduğu bildirilmiştir [24]. Olası tağşişi dışarıdan eklenen estragol ile yapılabilmektedir [24].



Şekil 2.2. Biberiye (*Rosmarinus officinalis*) yaprakları

Ticareti yapılan defne yaprakları *Lauraceae* ailesinden olan *Laurus nobilis* L. Ağacından elde edilmektedir (Şekil 2.3.). Ana vatanı Akdeniz bölgesi olup, Avrupa ve Kaliforniya ormanlarında sık rastlanmaktadır. Avrupa, ABD ve Arap ülkelerinde yetiştirilmektedir [32]. Kurutulmuş yaprakları ve uçucu yağları baharat ve gıda aroma maddesi olarak kullanılmaktadır. Defne yağının aynı zamanda farklı ülkelerde geleneksel ilaç yapımında da kullanıldığı bilinmektedir. Antimikrobiyal [33], antifungal [34, 35], antiülserogenik [36] ve hipoglisemik [37, 38] özellikte olduğu bildirilmiştir. Uçucu yağ majör bileşenleri ve oranları sırasıyla; ökaliptol (% 38,1-43,5), α -Pinen (% 7,1-15,9), α -terpinil asetat (% 4,5-7,0), linalol (% 6,2-6,5), β -pinen (% 4,9- 6,5), sabinen (% 4,5-6,5), metil öjenol (% 1,4-3,8), öjenol (% 1,2-3,0), kamfen (% 0,7-2,9), linalil asetat (% 0,4-2,7), α -terpineol (% 0,9-1,9), bornil asetat (% 0,4-2,3), terpinen-4-ol (% 2,1-2,2), β -mirsen (% 0,7-1,5), borneol (% 0,1-1,5), β -karyofillen (% 0,1-1,5), terpinolen (% 0,1-1,1), γ -terpinen (% 0-1,0) olarak

bildirilmiştir [24]. Önemli miktarda ökaliptol içermesi defne yağını parfüm sektörü için cazibeli hale getirmektedir [32].



Şekil 2.3. Defne (*Laurus nobilis*) yaprakları

Baharatlar arasında karabiber dünya çapında ticareti en çok yapılan baharattır (Şekil 2.4.). İşlenmiş gıdaları tatlandırmak ve muhafaza etmek için kullanılmasının yanında tıbbi olarak da önemlidir. Uluslararası baharat ticaretinin % 34'ü karabiber baharattır [39]. Güneybatı Hindistan, bu baharatın geleneksel evi olarak bilinmekte olup Avrupa'ya Romalılar ve Yunanlılar tarafından tanıtılmıştır. Karabiber, karabiber bitkisinin (*Piper nigrum* L.) olgunlaşmış meyvelerinden elde edilmektedir. Karabiberin kalitesi için iki bileşen önemlidir; piperin içeriği ve uçucu yağ miktarı. Karabiber uçucu yağlarındaki ortalama bileşen miktarları; α -pinen (%0-5), β -pinen (% 0,4-10,4), sabinen (% 0-3,6), mirsen (% 0-2,6), α -fellandren (% 0-5,9), δ -3-karen (% 0,6-32,7), limonen (% 1,2-19,5), α -karyofillen (% 13,9-65,7), karyofillen oksit (% 0,3-14,2) [24]. Karabiber uçucu yağında en sık rastlanan taşıyıcılar, düşük kaliteli karabiber veya yabancı maddeler katılması, sentetik bileşenler ve ucuz uçucu bileşen kaynaklarıdır.



Şekil 2.4. Kurutulmuş karabiber (*Piper nigrum*) meyveleri

Uçucu yağ elde edilen botanik ismi *Thymus vulgaris* L. kekik bitkisinin oldukça çeşitli kemotipi (CT) vardır. Dolayısı ile de majör konumdaki terpenoid bu kemotiplere göre değişmektedir. Bununla birlikte iki ana bileşeni bitkinin kimyasal karakteristiğini belirlemektedir; uçucu yağları ve uçucu olmayan polifenollerini [40].

Uçucu yağlarındaki en önemli bileşen timol terpenoididir. Ayrıca bir diğer önemli terpenoidi sentez yolu timol ile oldukça benzer olan karvakrol terpenoididir. *Thymus vulgaris* timol CT'de % 48,3-62,5 timol, % 7,2-18,9 ρ -simen, % 5,5-16,3 karvakrol, % 5,2-6,4 γ -terpinen, % 1,3-3,1 β -karyofillen ve % 1,5-2,7 oranlarında linalol içermektedir [24]. *Thymus vulgaris* karvakrol CT'inde ise % 41,8 karvakrol, % 27,4 ρ -simen, % 10,7 γ -terpinen, % 5,0 timol, % 3,0 karvakril metil eter, % 1,7 linalol, % 1,7 α -pinen, % 1,6 ökaliptol, % 1,4 β -mirsen ve % 1,0 oranında α -terpinen tespit edilmiştir [24]. Yukarıda sayılan *Thymus vulgaris* kemotiplerine ek olarak Türkiye'de baharat olarak en çok yetiştirilen ve kullanılan cinsi 'spiked thyme' olarak bilinen *Origanum vulgare* (Şekil 2.5.) bileşenleri; % 70,0 karvakrol, % 10,1 ρ -simen, % 9,5 γ -terpinen, % 3,7 β -karyofillen, % 1,3 α -terpinen [24, 41].



Şekil 2.5. Kekik (*Origanum vulgare*) yaprakları

Ticari olarak en çok uçucu yağı üretilen iki çeşit lavanta bildirilmiştir [42]. İlk olarak ticari olarak en kıymetli kabul edilen (kafur içeriği nispeten daha düşük) Fransız lavantası olarak da bilinen *Lavandula stoechas* botanik isme sahip lavantada majör terpenoid linaloldur. Uçucu yağında, % 27,2-43,1 linalol, % 28,0-34,9 ökaliptol, % 10,8-23,2 kafur, % 0,9-3,6 borneol, % 0,8-2,6 β -pinen, % 0,5-2,3 α -bisabolen, % 0,6-1,9 α -pinen, % 0,5-1,9 β -karyofillen, % 0,8-1,6 α -terpineol, % 0,3-1,0 germakren D bileşikleri bulunmaktadır [24]. Diğer bir uçucu yağ için kullanılan lavanta botanik ismi *Lavandula latifolia* (spike Lavender) olan lavandin bitkisidir (Şekil 2.6.) [42]. Bu bitkide majör bileşen kafur terpenoididir. % 16,4-56,2 kafur, % 14,9-49,1 fenkon, % 3,6-14,5 ökaliptol, % 3,4-4,5 α -pinen, % 2,8-5,5 kamfen, % 2,0-4,3 mirtenil asetat, % 1,8-3,1 bornil asetat, % 0,8-2,2 linalol, % 0,6-2,4 mirtenol, % 0-1,9 δ -3-karen, % 1,0-1,4 limonen, % 0,5-1,2 ledol [24].



Şekil 2.6. Lavanta bitkisi (*Lavandula latifolia*)

Nane (*Mentha*), *Lamiaceae* ailesinin bir cinsi olup dünyada 30'a yakın türe sahiptir. Nane uçucu yağları medikal ve aromatik özellikleri sebebi ile kullanılmaktadır. Bitkinin çiçek açmasından sonra aromasını kaybetmesi sebebi ile kurutmak için çiçeklenmesinden önce yaprakları kesilmelidir. Nane kemotipleri oldukça çeşitli olup iki kemotipinin (mentol ve karvakrol) uçucu yağının ticareti yapılmaktadır [24, 43]. Mentol kemotipinin, ISO tarafından belirlenmiş ABD ve ABD dışı ticareti için limit aralıkları vardır. ABD içinde, bileşen kompozisyonu, mentol % 36,0-46,0, menton % 15,0-25,0, mentil asetat % 3,0-6,5, neomentol % 2,5-4,5, ökaliptol % 4,0-6,0, mentofuran % 1,5-6,0, izomenton % 2,0-4,5, β -pulegon % 0,5-2,5, limonen % 1,0-2,5, β -karyofillen % 1,0-2,5, sabinen hidrat % 0,5-2,3 oranlarında istenmekte iken, ABD dışında bu oranlar mentol % 32,0-49,0, menton % 13,0-28,0, mentil asetat % 2,0-8,0, neomentol % 2,0-6,0, ökaliptol % 3,0-8,0, mentofuran % 1,0-8,0, izomenton % 2,0-8,0, β -pulegon % 0,5-3,0, limonen % 1,0-3,0, β -karyofillen % 1,0-3,5, sabinen hidrat % 0,5-2,0 [24]. Karvon kemotipi için bildirilen terpenoid bileşen oranları; karvone % 60,9-71,6, limonen % 11,4-21,2, dihidrokarvon % 1,0-4,9, 3-oktanol % 1,3-2,6, menton % 0,4-1,7, ökaliptol % 0,8-1,5, β -mirsen % 0,5-1,5, α -gurjunen % 2,5, α -karyofillen % 2,3, γ -gurjunen % 2,3 bildirilmiştir [24]. Tez kapsamında karvon tip olan *Mentha spicata* değerlendirilmiştir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Nane (*Mentha spicata*) yaprakları

Fesleğen bitkisi (*Ocimum L.*) *Lamiaceae* ailesi mensubu olup tropikal ve subtropikal bölgelerde yaklaşık 30 türü vardır (Şekil 2.8.) [15]. Zengin uçucu yağ bileşimi sebebi ile birçok çalışmaya konu olmuştur. Ayrıca *Ocimum basilicum L.* (tatlı fesleğen) estragol bileşiminden kaynaklanan anason benzeri aroması ve tatlı tadı ile dünya çapında 42,5 ton/yıl üretim hacmine sahiptir [44]. Bununla birlikte estragol ve metil öjenaolün genotoksik ve kanserojen etkileri sebebi ile melezleme çalışmaları yapılmıştır. Avrupa Konseyinin belirlediği limitler doğrultusunda gıda ürünlerinde estragol % 0,05 mg/kg'a kadar bulunabilirken, metil öjenolün tespit edilmemesi gerektiği bildirilmiştir [15]. Fesleğen, % 73,4-87,4 estragol, % 0-8,6 linalol, % 0,6-6,0 ökaliptol, % 0-4,0 β -karyofillen, % 0,1-3,0 limonen, % 0-2,2 β -osimen, % 0-4,2 metil öjenol, % 0-1,3 10-epi-a-kadinol, % 0-2,2 terpinen-4-ol, % 0-1,0 bornil asetat, % 0-1,2 öjenol, % 0-1,0 kafur terpenoidlerini ihtiva etmektedir [24].



Şekil 2.8. Fesleğen (*Ocimum basilicum*) yaprakları

Zencefil baharatı, *Zingiber* ailesinde mensup *Zingiber officinale*'nin yeraltı kökleri ya da rizomlarından elde edilmektedir (Şekil 2.9.). Bitkinin tamamı aromatik olsa da baharat olarak yeraltı rizomlarının çiğ veya işlem görmüş hali değerlidir [45]. Güney doğu Asya özellikle Hindistan anavatanıdır. Zencefil baharatı % 1,8 oranında uçucu yağ ihtiva etmektedir. Zencefilin karakteristik organoleptik özellikleri, uçucu ve uçucu olmayan yağlarındaki bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Bunların arasında diğer aroma bileşenlerini domine eden, bir terpenoid olan α -zingiberendir [45]. Zencefil uçucu yağlarında bulunan terpenoidleri ortalama oranları; zingiberen (% 38,1-40,2), ar-curcumen (% 17,1), β -seskifellandren (% 7,2-7,3), kamfen (% 4,7-4,5), β -bisabolen (% 5,2-6,0), β -fellandren (% 2,5-3,4), borneol (% 2,2-2,8), ökaliptol (% 2,1-1,7), α -pinen (% 1,3-1,4), β -elemen (% 1,2), 2-undekanon (% 1,4) [24].



Şekil 2.9. Zencefil (*Zingiber officinale*)

2.2. Uçucu Yağ Üretimi

Uçucu yağlar, bitkilerden veya bitkisel droglardan elde edilen, alkol, eter, bitkisel ve mineral yağlarda serbestçe çözünebilen uçucu bileşenler olarak nitelendirilir ve distilasyon veya buhar sıyırma prosesi ürünüdür. Atmosfere açık bırakıldıklarında, oda sıcaklığında buharlaşmaları sebebi ile *uçucu yağ* veya *eterik yağ*, güzel kokulu olmaları sebebi ile *esans* gibi isimlendirmelere sahiptir. Kuvvetli kokulara sahip, oda sıcaklığında genellikle sıvı (bazen donabilen), uçucu ve yağimsi karışımlardır [46]. Uçucu yağ kullanımı ve üretimi doğuda 2500 yıldan daha öncelerine dayanmaktadır. Uçucu yağ endüstrisinin teknik temeli olan distilasyon uygulamaları ilk kez Mısır ve Hindistan'da ortaya çıkmıştır. Terebentin (M.S. 484) ve kafur (M.S. 425) uçucu yağları Herodotus tarafından Yunanistan'da ilk kez belgelenmiştir [46].

Uçucu yağ üretim yöntemleri oldukça çeşitli olup, üretim yöntemi uçucu yağın bileşimini, verimini ve değerini etkilemektedir. Birçok aromanın kökeni olan uçucu yağlar iki sebeple üretilmektedir. İlk olarak kendine has aroma ve karakteristik özelliklerini (biyosit, anti kanserojen, antioksidan vb.) son ürüne vemesi amacı ile ikinci olarak, doğal aroma bileşenlerinin sentetik olarak yaratılmasında kullanılmaktadırlar. Uçucu yağlardan ekstrakte edilen birçok bileşen, ilaç ham maddesi veya koku verici bileşenin yarı sentez yolu ile elde edilmesinde kullanılmaktadır. Örnek olarak; kafur pinen bileşiğinden, vanilin öjenol bileşiğinden elde edilmektedir. Bununla birlikte uçucu yağların en çok kullanıldığı alan doğal aromalardır. Doğal aromalarda ve aroma zenginleştirmede oldukça sık kullanılmaktadırlar. Aroma bileşeni olarak kullanılmalarına örnek olarak karanfil uçucu yağlarından elde edilen öjenol bileşiğinin doğal muz aroması olarak kullanılması verilebilmektedir. Bunun yanı sıra uçucu yağların, ağız bakım ürünleri

ve dişçilik, kozmetik, boyacılık, maden ve gıda sektörü gibi oldukça geniş ölçüde kullanım alanları söz konusudur [47].

Uçucu yağlar sırası ile asetat-mevalonik asit ve şikimik asit yollarından türetilen terpenler ve aromatik polipropanoid bileşiklerden oluşmuştur. Bitkilerin esansiyel yağ bileşimi genetik ve çevresel faktörlere bağılı olarak değişmektedir. Bitki dokusunun esansiyel yağ içeriğı de gelişim evresine ve ekstraksiyon yöntemlerine göre değişebilmektedir [48].

Esansiyel yağların ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan teknikler arasında hidrodistilasyon, buhar distilasyonu, çözücü ekstraksiyonu, tepe boşluğu (headspace) analizleri ve sıvı CO₂ ekstraksiyonu sayılabilmektedir. Ekstrakte edilen yağın bileşimi, bir ekstraksiyon yönteminden diğere farklılık gösterebilmektedir [48].

Literatürde, tepe boşluğu analizlerinin yalnızca küçük bir miktar bitki materyaline gereksinim duyduğu ve uçucu yağ ekstraksiyonu için hızlı bir metot olduğuna değinilse de, sadece yüksek yapılı uçucu bileşenlerin kazanımı gerçekleştirilmektedir [48, 49].

Geleneksel olarak uygulanan buhar distilasyonu ve çözücü ekstraksiyonu yöntemlerinde yağın toplandığı sıvının evaporasyon ile uzaklaştırılması gerektiğı için uçucu bileşenlerde büyük kayıplar olmaktadır [48, 50, 51]. Ayrıca çözücü ekstraksiyonunda uçucu olmayan bileşiklerinde ekstraksiyonu söz konusu olmaktadır.

CO₂ ekstraksiyonu uçucu yağ kazanımı için güvenilir, etkili ve neredeyse dekompozisyon değişikliklerine yol açmayan bir yöntem olsa da, pahalı olması sebebi ile endüstride limitli kullanımı mevcuttur. Ayrıca CO₂ ekstraksiyonunda bahsedilen avantajların hidro ve buhar distilasyonu ile de sağlanması sebebi ile kurulumu maliyetli olan CO₂ ekstraksiyonu metodu yerine hidro ve buhar distilasyonu metodları tercih edilmektedir [48, 49, 52].

Küçük miktarlarda aromatik bitkiden hızlı uçucu yağ ekstraksiyonu uçucu yağ karakterizasyonu için oldukça avantajlı bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım doğrultusunda çeşitli araştırmalar yapılmış, Godefroot ve ark. [53] sürekli buhar distilasyonu ve ekstraksiyonu sırasında uçucu bileşenlerin yalnızca 1 ml'lik çözücüde toplandığı bir aparat geliştirmişlerdir. Miktarı uçucu yağ miktarına bağılı olmak üzere yalnızca 1-15 g bitki materyalinin gerek duyulduğu sistemde gaz kromatografisi analizi dâhil

4 saatte üretim ve analiz tamamlanmıştır [48]. Bir diğer mikro ölçekli aparat (yalnızca 1 g bitki materyali yeterli görülmekte) buhar distilasyonu için Bicchi ve ark. [54] tarafından tasarlanmıştır. Bu yöntemlerde kullanılan aparatlar pahalı malzemeler olup, büyük ölçekli üretimler için dezavantaj oluşturmaktadır.

Hidrodistilasyon uçucu yağ eldesinde, verimli olması, uçucu yağ bileşeni kazanımında etkili olması, daha az uzmanlık gerektirmesi, basit ve hızlı sonuçlanması sebepleri ile en tercih edilen üretim yöntemi olmuştur [48]. Ayrıca taze ve kuru bitki materyallerinin kullanılabilmesine de olanak sağlamaktadır. Ek olarak, üretimi yapılacak bitki materyal miktarının 75 g kuru ağırlıktan 10 g kuru ağırlığa düşürüldüğünde uçucu yağ bileşiminde dikkate değer bir fark olmaması sebebi ile birçok numunenin analiz edilmesi yüzünden kısıtlı numune olabilen fizyolojik ve ıslah çalışmalarında kullanılabilmesi bildirilmiştir [48].

Bitki materyalinin su içinde kaynatılmasına dayanan hidrodistilasyon yöntemi uçucu yağ üretimi için endüstride en çok kullanılan metottur. Endüstriyel açıdan ilerlemiş ülkelerde hidrodistilasyon yöntemi bilgisayar destekli olup, son ürün için hat analizlerini yapabilecek karmaşık ekipmanlara sahiptir [55]. Bu sayede daha kaliteli uçucu yağ üretimi gerçekleştirilmektedir.

Hidrodistilasyon uygulamasında, bitki materyali su ile birlikte kaynatılmaktadır. Bir bitkinin yağ hücrelerinde bulunan uçucu yağın salınması, yağ hücresi içeriğinin ısı ile oluşturulan genişlemenin artan basıncından kaynaklanan yağ hücresi duvarlarının patlamasından (osmoz) kaynaklanmaktadır. Yağ molekülleri yağ hücrelerinden difüze olduktan sonra buharlaşarak ortamdaki buhar akışı tarafından taşınmaktadır (buhar, uçucu yağ moleküllerinin taşıyıcısı gibi davranmaktadır). Su veya buhar distilasyonunun temel ilkesi bir sıvı-sıvı-buhar sisteminin sınır değeridir [55]. Hidrodistilasyon teorisine göre iki karışmaz sıvı (bu durumda su ve uçucu yağ) A ve B iki ayrı faz oluşturmakta ve bu sistemin toplam buhar basıncı iki saf sıvının kısmi buhar basıncının toplamına eşittir (Eş. 2.1.).

$$\rho = \rho_A + \rho_B \quad (\text{Eş.2.1.})$$

Denklemden gösterilen ρ sistemin toplam buhar basıncıdır. Her iki sıvı karışmayacağı için ρ , sıvı fazın bileşiminden bağımsızdır. Karışımın kaynama sıcaklığı (T_M), A ve B sıvılarının kaynama sıcaklıklarının (T_A ve T_B) altındadır. Her bir bileşenin miktarı ile buhar fazındaki basınç arasındaki orantı, Eş. 2.2'de verilmiştir.

$$\frac{N_{yağ}}{N_{su}} = \frac{P_{yağ}}{P_{su}} \quad (\text{Eş.2.2.})$$

$N_{yağ}$, buhar fazındaki yağ moleküllerinin mol sayısını ve N_{su} buhar fazındaki su moleküllerinin mol sayısını ifade etmektedir.

Yağ bileşenlerinin uçuculuğu buharlaşma oranından etkilenmez fakat uçucu yağ bileşenlerinin sudaki çözünürlük derecelerine bağlıdır. Sonuç olarak, suda çözünürlüğü fazla olan bileşenler daha uçucu olacaklarından, suda çözünürlüğü daha az olan bileşenlerden daha önce damıtılacaktır [55].

2.3. Uçucu Yağ Bileşenleri

Uçucu yağlar bitkinin birçok bölgesinde (meyve, yaprak, odun, kök, çiçek, rizom) ve nadiren de sap ve kabuklarında bulunmaktadır. Ayrıca uçucu yağlar bazen bitkinin bütün dokularında (*Coniferae* gibi) veya bitkinin sadece belirli bir kısmında (gülün çiçek kısmında; tarçın ağacında yaprak ve kabukta; nanede sap, yaprak ve çiçekte; sitrus türlerinde çiçek, yaprak ve perikarpta) da bulunabilmektedir. Uçucu yağlarda bulunan bileşiklerin % 90'ı terpenoid bileşiklerdir [56]. Diğer bileşikler ise fenolkarbonik asitler, fenilpropan türevleri, kükürt içerikli bileşikler (hardal esansı), dallanmamış hidrokarbürler ve türevleri, basit fenoller ve eterleri, kısa zincirli yağ asitleri ve azotlu bileşiklerdir (indol türevleri ve antranilik asit esterleri) [56].

Doğada üretilen kimyasallar primer ve sekonder metabolitler olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır. Primer metabolitler organizmanın yaşamsal faaliyetleri ile doğrudan ilişkili olup, enerji üretimi sırasında son veya ara ürün olarak oluşmaktadırlar. Primer metabolitlerin protein, karbonhidrat, nukleik asitler ve yağlar olmak üzere dört alt grubu bulunmaktadır. Sekonder metabolitler ise yaşamsal faaliyetler ile doğrudan ilişkili olmayıp, birincil metabolitlerden türemiştir ve genellikle terpenoidler, şikimatlar, poliketidler ve alkaloidler olarak sınıflandırılmaktadır [55]. Bu son sınıfta yer alan terpenoidler uçucu yağlarda en önemli bileşikler olup tez kapsamında bu bileşikler değerlendirilmiştir.

Uçucu yağ bileşenlerine yönelik ilk sistematik araştırmalar Fransız kimyager M.J Dumas tarafından bazı hidrokarbonlar ve oksijenin yanı sıra sülfür ve nitrojen içerikli bileşenleri analiz etmesi ile başlamıştır. 1833 yılında ilk sonuçlarını yayınlamıştır [55]. Fransız araştırmacı M. Berthelot yedi maddeyi optik rotasyonlarına göre karakterize etmiştir. Bununla birlikte, en önemli araştırmalar Kekule'nin asistanı O.Wallach tarafından yapılmış olup, araştırmacı çeşitli terpenlerin botanik kaynaklarına göre farklı isimler altında tanımlandığı halde

kimyasal olarak aynı olduklarını farketmiş daha sonra her bir yağ fraksiyonunu izole etmeye ve temel özellikleri üzerinde çalışmaya başlamıştır [55]. Wallach ve ark. [55] uçucu yağların ayrılması için fraksiyonel distilasyon üzerinde çalışmış, her bir fraksiyonun karakterizasyonu için inorganik ayraçlar kullanılmıştır. Ayraç olarak, hidroklorik asit, nitrojen oksitleri, bromür ve nitrozil klorid kullanılmıştır. O dönemde terebentin yağı içindeki varlığı sebebi ile Kekule terpenleri adı verilen ve uçucu yağlarda bulunan moleküler formülü $C_{10}H_{16}$ olan hidrokarbonlar biliniyordu ve kafur jenerik isminin altında tanımlanan $C_{10}H_{16}O$ ve $C_{10}H_{18}O$ moleküler formüllü bileşenlerin terpenler ile ilişkili olduğu tahmin ediliyordu. 1891 yılında pinen, kamfen, limonen, dipenten, fellandren, terpinolen, fenken ve daha sonra artifakt olduğu teşhis edilen silvestren terpenleri Wallach tarafından karakterize edilmiştir [55].

Alman kimyacı A. von Baeyer 1893 yılından sonra halkalı terpenlerin yapı ve özellikleri üzerine birçok çalışma yapmıştır. Geraniol, linalol ve sitral gibi sık bulunan asiklik monoterpenler F. W. Semler ve Rus kimyager G. Wagner tarafından araştırılmıştır [55]. Read ve ark. [55] ise mentol, karvomentol, borneol, fenkol ve pinokamfeol sterokimyasal yapılarını ayırt etmeye yönelik araştırmalar yürütmüşlerdir. Moleküler yapısının izahı konusunda önemli bir gelişme de seski- ve diterpenlerin sülfür ve sonrasında selenyum ile dehidrojenasyonu (temel bir metot olarak öne sürülen) ile aromatik bileşiklerinin elde edilmesi olmuştur. Terpenler biyosentetik olarak izopren birimlerden türetilirler. İzopren kuralı ile, terpenoid bileşiklerin iskelet yapısı beş karbonlu basit izopren birimlerinin (2-metil-1,3-butadien) baş ve kuyruk olarak bir araya gelmesi ile oluşmuş olduğu 1921 yılında L. Ruzicka tarafından öne sürülmüş ve 1939 yılında 'polimetilen ve yüksek terpenler' alanındaki çalışmaları ile Nobel almıştır [55].

Terpenler; uçucu yağ bileşiminde alkol, ester, oksit, aldehit, keton ve eter olarak bulunmaktadır. Bunlar asiklik, monosiklik veya bisiklik olarak gruplandırılırlar. Seskiterpenler asiklik, monosiklik, bi ve trisiklik olabilir ve uçucu yağ terpenleri, içinde 1000 kadar bileşikle en büyük grubu teşkil eder. Diterpenler ise uçucu yağ içinde nadiren bulunur. Fenilpropan türevleri; doğrudan sinnamik asitten meydana gelen aldehit, fenol ve fenol eteri şeklinde bulunur. Bu bileşikler, bazı *Apiaceae* uçucu yağlarında, peru balsamı, tarçın ve karanfil esansı, küçük hindistan cevizi esansında yüksek oranlarda bulunur [57].

Birçok doğal terpenoid hidrokarbonunun genel kimyasal formülü $(C_5H_8)_n$ 'dir. C sayısı veya n değerine (bağlı izopren birimi sayısı) bağlı sınıflandırma Çizelge 2.1.'de görüldüğü gibidir. Çizelgede görülen her bir sınıf, yapıda bulunan halka sayısına göre alt gruplara ayrılmıştır. Monoterpenoid asiklik terpenoidler halkasız yapılar, monosiklik terpenoidler tek halkalı ve bisiklik terpenoidler iki halkalı yapılardır.

Birçok terpenoid renksiz, kokulu, sudan hafif, sıvılar olmakla birlikte kafur gibi katı formda olanlar da vardır. Hepsi organik çözücülerde çözünür ve genellikle suda çözünmezler. Çoğu optikçe aktiftir. Asiklik veya siklik doymamış bileşenler bir veya birden fazla çift bağ içermektedirler.

Çizelge 2.1. Terpenoid sınıflandırması

C atom sayısı	n değeri	Terpenoid sınıfı
5	1	Hemiterpenoidler (C_5H_8)
10	2	Monoterpenoidler ($C_{10}H_{16}$)
15	3	Seskiterpenoidler ($C_{15}H_{24}$)
20	4	Diterpenoidler ($C_{20}H_{32}$)
25	5	Sesteterpenoidler ($C_{25}H_{40}$)
30	6	Troterpenoidler ($C_{30}H_{48}$)
40	8	Tetraterpenoidler ($C_{40}H_{64}$)
>40	>8	Politerpenoidler ($(C_5H_8)_n$)

Hidrojen, halojen ve asit ile katılma tepkimesine girebilirler ve çok sayıda katılma ürününün antiseptik özellikleri söz konusudur. Ayrıca, hidrojenasyon ve polimerizasyon reaksiyonlarına girmektedirler. Neredeyse tüm okside edici ajanlar ile kolaylıkla okside olabilmektedirler. Çoğu terpenoid ısı ayrışmada izopren ürünü vermektedir.

Terpenoidler, uçucu yağ bileşimindeki en önemli grup niteliği taşımaktadırlar. Literatür incelendiğinde konu ile ilgili ilk çalışmalarda araştırmacılar terpenler olarak ele almış olsalar da artık bu grup monoterpenoid hidrokarbonlar olarak isimlendirilmektedir. Terpenoidler, izopren birimi (2-metil-1,3 bütadien) içeren kimyasal madde şeklinde tanımlanmaktadır. İzopren birimi uçucu yağlarda sık bulunmasa da 2-metil bütan iskeleti terpenoid yapısında ayırt edilebilmektedir. İzopren birimlerinin baş-kuyruk bağlanması yalnızca tek yönlü olmaktadır.

Terpenoid yapısının ilk halinde her zaman beşin katları kadar C atom sayısı bulunmaktadır. İlk çalışılan terpenoidler, monoterpenoid olarak isimlendirilen her molekül için 10 C atomu ihtiva eden bileşikler olmuştur. Bu isimlendirme ile birlikte 5 C'lular hemiterpenoidler, 20 C'lular seskiterpenoidler, 20 C'lular diterpenoidler olarak isimlendirilmiştir. Genel olarak, hemiterpenoidler, monoterpenoidler ve seskiterpenoidler uçucu bileşiklerdir.

Uçucu yağlar birçok kimyasal yapı içerir. Örneğin limonen, linalol ve pinenler birçok uçucu yağda bulunmaktadır. Bununla birlikte her bir uçucu yağın farklı bileşenler ile domine olduğu görülmüştür. Aynı tür bitkilerin dahi içerdikleri uçucu yağ oranlarının değişiklik gösterdiği bildirilmiştir [58]. Böyle durumlarda bitkinin botanik isminden sonra içerdiği majör bileşen kemotipe ismini verir. Örneğin; kekik yağlarında rastlanan yedi ayrı kemotip; karvakrol, timol, timol/karvakrol, borneol, geraniol, linalol, thujanol kemotipleridir. Ticari olarak satılan kekik uçucu yağlarının büyük çoğunluğu timol, karvakrol veya timol/karvakrol kemotipidir [58].

2.4. Baharat ve Uçucu Yağlarda Yapılan Tağşişler

Gıda maddelerinde tağşiş kavramı genel olarak, mevzuatta izin verilmeyen katkı maddelerinin bir gıda içerisinde bulunması, mevzuatta izin verilmiş olan katkı maddelerinin limitlerinden fazla eklenmesi veya ekonomik sebepler ile başka bir gıdanın karıştırılması gibi eylemleri kapsamaktadır. Gıdalarda yapılan tağşişler tesadüfi veya kasıtlı olabilmektedir. Tesadüfi tağşiş yabancı maddelerin gıdaya bilgisizlik, ihmal ve yanlışlık vasıtasıyla kontaminasyonu ile olmaktadır. Bu tip bir bulaşma bitkiye hasat süresinde uygulanan pestisit kalıntıları, kuş ve kemirgenlerin atıkları veya bakteriyel kontaminasyon ile olmaktadır. Kasıtlı yapılan tağşişler ekonomik sebeplerden kaynaklanmaktadır. Ekonomik kazanç için görünüm nitelikleri ve değeri yükseltmek için ikincil değersiz materyaller eklenmektedir. Bu ikincil materyaller baharatlar için talaş, yaprak, toz ürünler (nişasta vb.) veya diğer baharat türleri olabilmektedir [59].

Baharatlara yapılan başlıca hilelere örnek olarak karabiber tanelerinde parlak görünmesi için kullanılan mineral yağı, kuru papaya tohumları, yabani karabiber türleri (*P. attenuatum* ve *P. galeatum*), *Lantana camara* ve *Embelia ribes* meyveleri, *Mirabilis jalapa* tohumları, *Schinus molle* taneleri, ezilmiş karabiber, karabiber sap ve bitki parçaları verilmektedir. Ayrıca, toz karabiberde yapılan hilelere boyalar, toz papaya tohumu, ucuz kaynaklı nişasta tağşişi örnek olarak

verilebilir [16]. Bunun dışında baharatlarda kullanılan boyalar da toplumda sağlığı tehdit etmektedir. Toz kırmızıbiberde sentetik azo boyalarından Sudan (I-IV), Sudan turuncu G, Sudan kırmızı 7B, Sudan kırmızı B, Sudan kırmızı G, Butter sarı ve Para kırmızı boyları, sentetik kapsaisin, sarımsak veya soğan tozu kullanıldığı bildirilmiştir [60-62]. Sık yapılan tağşiş örneklerini çoğaltacak olursak; toz biberde mineral yağı, talk pudra, tuğla tozu, toz tuz eklenmesi, zerdeçalda; metanil sarı, turuncu kurşun II kromat, tebeşir tozu, sarı sabun taşı tozu, yabancı *Curcuma* türleri, ucuz kaynaklı nişasta, talaş tağşişleri yapılmaktadır [63]. Ayrıca; zencefilde kalsiyum hidroksit, kapsaisin, uçucu yağları ekstrakte edilmiş zencefil, zerdeçal tozu, kakulede; küçük çakıl, portakal tohumları, kahve tohumları, *Amomum aromaticum*, *Amomum subulatum* ve *Amomum costatum* tohumları karıştırılırken hindistan cevizinde; yabancı türler (*Macassar*, *Myristica argentea*), Bombay hindistan cevizi (*M. malabarica* ve *M. otopa*) eklenmesi hileleri yapılmaktadır [63]. Karanfilde yapılan hileler; magnezyum tuzu, kum, toprak iken tarçında; çin tarçını (*Cinnamomum cassia*), öjenol, sarı kahverengi boya, kayın ağacı meyvesi kabuğu, fındık, badem kabuğu tozu ilaveleridir. Anasonda; baldıran otu, maydanoz, rezene, çörekotunda; soğan tohumları, kimyonda; kümin diğer örneklerdir [63]. Değerli bir baharat olan safranda yapılan tağşişler oldukça fazladır; sentetik boyalar (Tartrazine, Ponceau 2R, Orange GG, Sunset yellow, amaranth, eozin, eritrosin, metil turuncu,), yağ, gliserin, potasyum veya amonyum nitrat çözeltileri, sodyum sülfat, magnezyum sülfat, baryum sülfat, boraks yapılan ve literatürde bildirilen hileler arasındadır [63]. Vanilya çekirdeklerinde; tonka fasulyeleri (*Dipteryx odorata*), *Dipteryx oppositifolia*, vanillon (*Vanilla pompona*), *Selenipedium chica*, orkide (*Angreacum fragrans* ve *Orchis fusca*) yaprakları, *Trilisa odoratissima*, *Nigritella anguistifolia* ve tatlı karanfil (*Melilotus spp.*), vanilya ekstraktında; sentetik vanilin, etil vanilin, 3,4-dimetoksibenzaldehit, piperonal, vanitrope ve kumarin tağşişleri de sıklıkla yapılan hilelerdendir [63]. Metanil yellow, Rodamin B, Auramine O, Congo red, malahit yeşili ve Orange II gibi gıdalarda varlığına izin verilmeyen bazı boyalar ne yazık ki olası sağlık tehlikelerine rağmen baharatlarda kullanılmaktadır [64].

Amerikan Baharat Ticareti Kuruluşu (ASTA) tüketici perakende piyasasında dâhil olmak üzere her türlü endüstriyel alanda kaliteli baharat ticaretini sağlayan kurumsal bir yapıdır [59]. Kuruluş baharat tağşişi için çeşitli analitik yöntemler

sunmuştur. Nişasta metodu, mikroskopik analizler, ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ve spektrofotometrik metotlar (UV/Vis spektroskopisi) ASTA'nın önerdiği yöntemlerdendir [59]. Resmi Zirai Kimyagerler Kuruluşu (AOAC) ve ISO gibi organizasyon kuruluşları da baharat taşımasının analizine yönelik bir takım metotlar önermişlerdir. Nem içeriği, toplam kül, uçucu ve uçucu olmayan içerik ve yabancı madde içeriği analizi bu metotlardandır [65].

Bu metotların hassasiyeti ve doğruluğu baharatta taşışın belirlenmesi konusunda kabul görmüştür. Bununla birlikte, bu analizler zaman harcayan ve maliyetli yöntemler olup, uzman bir personel gereksinimine sahiptir. Bu sebeple, daha hızlı ve doğru analiz metotlarına ihtiyaç doğmuştur. Spektrometrik yöntemler gıda analizlerinde basit, hızlı ve çevreye zararsız olması sebebiyle öne çıkmaktadır.

Uçucu yağların kullanım alanının oldukça geniş olması araştırmacıların ilgisi çekmiş ve bu sebeple, uçucu yağların kimyasal yapısı ve biyoaktif özellikleri birçok araştırmaya konu olmuştur [66]. Sentetik bileşiklere kıyasla aromatik bitkilerden ekstrakte edilen uçucu yağların çok yönlü kullanılabilmesi, çevreye ve insan sağlığına zararsız olması, ilaç sanayinin yanı sıra, gıda, kozmetik, parfümeri endüstrisi ve aromaterapi gibi alanlarda kullanılması sebebi ile tüm dünyada tüketimi artmakta ve Türkiye'de de gelişmekte olan sektör olarak varolmaktadır. Koruyucu gıda katkı maddesi olarak kullanılan kimyasal bileşiklere gelen yasal sınırlamalar, endüstrinin talebini bitkilerden sağlanan ve antioksidan özelliğe sahip uçucu yağlara kaydırmıştır. Türkiye uçucu yağ bitkileri açısından zengin bir mirasa sahiptir ve uçucu yağ içeren birçok aromatik bitki her hangi bir kültüre alınmadan doğal olarak yetişmektedir [8].

Uçucu yağlara olan ilgi bir takım hileleri de beraberinde getirmiştir [8]. Kontaminantlar doğal olarak bulunmayan fakat distilasyon sebebi ile bulaşan veya taşış amacı ile ürüne eklenen yabancı maddelerdir. Plastikleştiriciler, pestisitler, çözücüler kontaminant grubuna dâhildir [58]. Genellikle antimikrobiyel etkili oldukları için mikrobiyel kontaminasyona uğramazlar [67].

400'ün üzerinde kimyasal biyositi aromatik bitkilerde kullanıldığı ve buhar distilasyonu sırasında bu kimyasalların uçucu yağlara taşındığı bildirilmiştir [68-70]. Çözücü ekstraksiyonu ürünlerinin her hangi bir biyositi tutma ihtimali daha yüksektir. Yapılan bir çalışmada, Chlorpyrifos insektisinin gülden gül suyu,

konkreti (katı gül yağı) ve absöütüne sırası ile % 5,7, % 46,9 ve % 38,8 oranında geçtiği ortaya konulmuştur [71].

Nanelerde kullanılan tebuconazole ve propiconazole fungusitleri, bu bitkilerin uçucu yağlarında sırasıyla 0,01–0,04 mg/kg ve 0,02–0,05 mg/kg oranında tespit edilmiştir [72]. Görülen bazı alerjik reaksiyonların yağın kendisinden değil, biyosit kalıntıları sebebi ile olabileceği raporlanmıştır [73].

Ftalatlar olarak bilinen ftalat esterleri plastikleştirici ajanların başında gelmekte olup bu maddelerin uçucu yağlarda kullanılması kasıtlı veya kasıtsız taşışlardır. Bitki oleoresinlerini daha akışkan hale getirmek için kullanılmaktadırlar. Dietil ftalat (DEP) uçucu yağ ve oleoresinlerde kullanılmaktadır [58]. Kokusuz çözücüler propilen (PG) glikol, DEP, veya dioktil ftalat (DOP) sıklıkla lavanta yağlarına eklenmektedir.

Endüstride taşışın amacı uçucu yağların kokulu veya kokusuz maddeler ile seyreltilmesi ile karlılığı yükseltmektir. Kokulu safsızlıklar daha ucuz uçucu yağlar veya fraksiyonları, sentetik aroma kimyasallardır. Kokusuz safsızlıklar ise, 'çoğaltıcı' olarak kullanılan etanol, mineral yağları (petrol türevleri) glikoller, ftalatlar, sabit yağlar, izopropil miristattır [58]. Sentetik metil salisitat keklik üzümü yağı yerine satılmaktadır. Potansiyel tehlike arzeden benzil alkol de bu amaçla uçucu yağlarda bulunmaktadır.

Bir diğer taşış yolu da uçucu yağa daha ucuz bir yağ eklenmesiyle gerçekleştirilir. Bununla birlikte uçucu yağ eldesi yapılacak bitki türünün yanlış bilinmesi de taşışse yol açmaktadır. Örneğin yapılan bir çalışmada Isparta ilinde bir kasabada lavanta adı ile yetiştirilen bitkinin aslında lavender bitkisi olduğu ve bu bitkilerin uçucu yağlarının uçucu yağ piyasasında (özellikle ihracaatta yüksek kafur içeriği sebebi ile kabul görmemektedir) talep edilmediği, bu sebeple de bölgede lavanta bitkisinin yetiştirilmesi için üreticilere lavanta kültürünün temin edilmesi gerektiği bu doğrultuda girişimlere ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir [8].

Uçucu yağların, iritan, rubefiyen, vesikan, antiromatik, ekspektoran, antitussif, diüretik, emenagog, karminatif, stomaşik, kolekinetik, koleretik, antihelmentik, antienflamatuar, antiseptik, antibiyotik ve sedatif etkileri vardır. Bu sebeple bileşen analizi oldukça önem arz etmektedir. Ayrıca uçucu yağ bileşen analizlerinde yaşanan sıkıntılar sebebi ile iç piyasada denetimin arttırılması ve sahte uçucu yağ

üretimi yapan işletmelere bir takım yaptırımlarda bulunulması gerektiğine değinilmiştir [8].

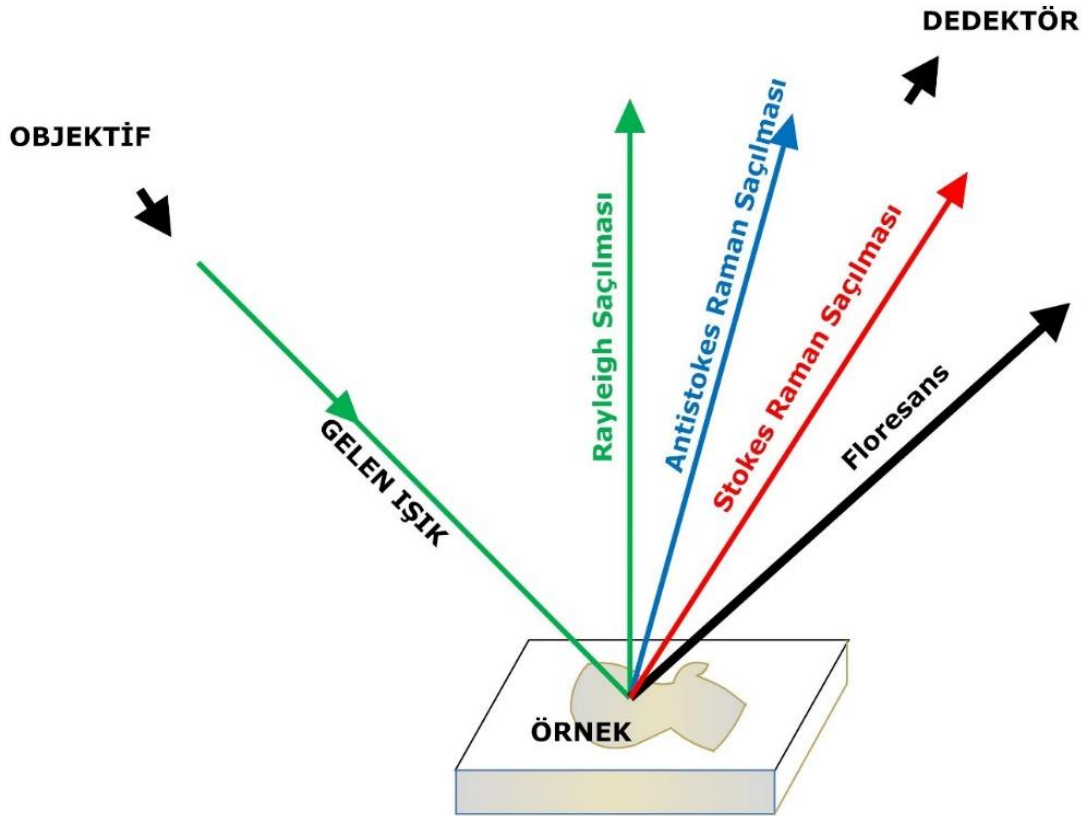
Uçucu yağların teşhisinde gaz sıvı kromatografisi (GLC), TLC ve ikisi kombine olarak kullanılmaktadır [57]. Uçucu yağlardaki bileşenlerin analizi ve terpenoidlerin tanımlanması genellikle kromatografik yöntemler ile yürütülmektedir. Gaz kromatografisi-alev iyonizasyon dedektörü (GC-FID), gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS), iki boyutlu gaz kromatografisi (GCXGC) bu kromatografik yöntemlere örnek olarak verilebilir [5,6]. Bununla birlikte kromatografik analiz metotları güvenilir ve doğru sonuçlar verseler dahi ön işlemlere sahip olduklarından dolayı zaman alan ve kimyasal sarfiyatına sebep olan analiz yöntemleri arasında yer almaktadırlar. Günümüzde araştırmacılar ve sanayi daha ekonomik ve zaman tasarrufu sağlayan analiz metotlarına yönelmişlerdir. Uçucu yağların analizi klasik yöntemler dışında spektrofotometrik yöntemler ile de yapılabilmektedir. Tüm spektroskopik metotlar terpenoid yapı konformasyonu ve degradasyon ürünlerinin yapısı hakkında oldukça başarılı bilgiler vermektedir.

2.5. Spektroskopik Analiz Yöntemleri

2.5.1. Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi örneğin lazer gibi bir şiddetli ışık demetine maruz kaldığı ve uyarılmış örnek moleküllerinin meydana getirdiği Raman-aktif titreşim modlarının spektrumunun elde edildiği titreşim spektroskopisinin bir dalıdır [74]. Işığın moleküller ile etkileşimi ile saçılması sonucunda dalga boyunun büyük kısmının gelen ışık dalga boyu ile aynı olduğu görülmüş geriye kalan çok az bir kısmının da farklı dalga boylarına kaydığı ortaya çıkmıştır. Işığın farklı dalga boylarına kayması da elastik olmayan saçılma olarak da bilinen Raman saçılmasıdır. Elastik saçılma türü ise Rayleigh saçılması olup Raman saçılmasına oranla 10^4 - 10^5 kez daha şiddetli ışık saçılımı olmaktadır. Raman saçılması esnasında toplam enerji korunmakta, fotonun kazandığı veya kaybettiği enerji molekülün titreşim enerji düzeyleri arasındaki enerjiye (ΔE) eşit olmalıdır. Dolayısıyla, fotonun kazandığı veya kaybettiği enerji miktarı sayesinde moleküllerin titreşim enerji düzeyleri hakkında bilgi alınabildiği titreşim spektroskopisine Raman spektroskopisi adı verilmektedir [75]. İki türlü Raman saçılması söz konusu olup biri yayılan ışının enerjisi uyarılma enerjisinden küçük olup Stokes saçılması olarak adlandırılırken,

diđeri yayılan Őının enerjisinin uyarılma enerjisinden bųyųk olma durumudur ve Anti-Stokes sađılması olarak ifade edilmektedir. Sađılma tųrleri Őekil 2.10.'da verilmiŐtir. Floresans ųzelliđe sahip protein gibi bazı biyomateryallerin spektrumlarının Stokes pikleri ile giriŐim yapabilmesi mųmkųn olabilmektedir. Sađılımların olasılıkları deđerlendirilecek olursa, Rayleigh sađılması en bųyųk olasılıđa sahip olup Anti-stokes sađılımını endųŐųk ihtimale sahiptir [75]. Raman spektrumu sađılan iŐıđın Őiddetinin cm^{-1} biriminde Raman kayması ($\Delta\nu$) fonksiyonu olarak Őizilmesi ile oluŐmakta ve gerilme ve bųkųlme titreŐim modlarına ile ilgili bilgi sađlamaktadır [74].

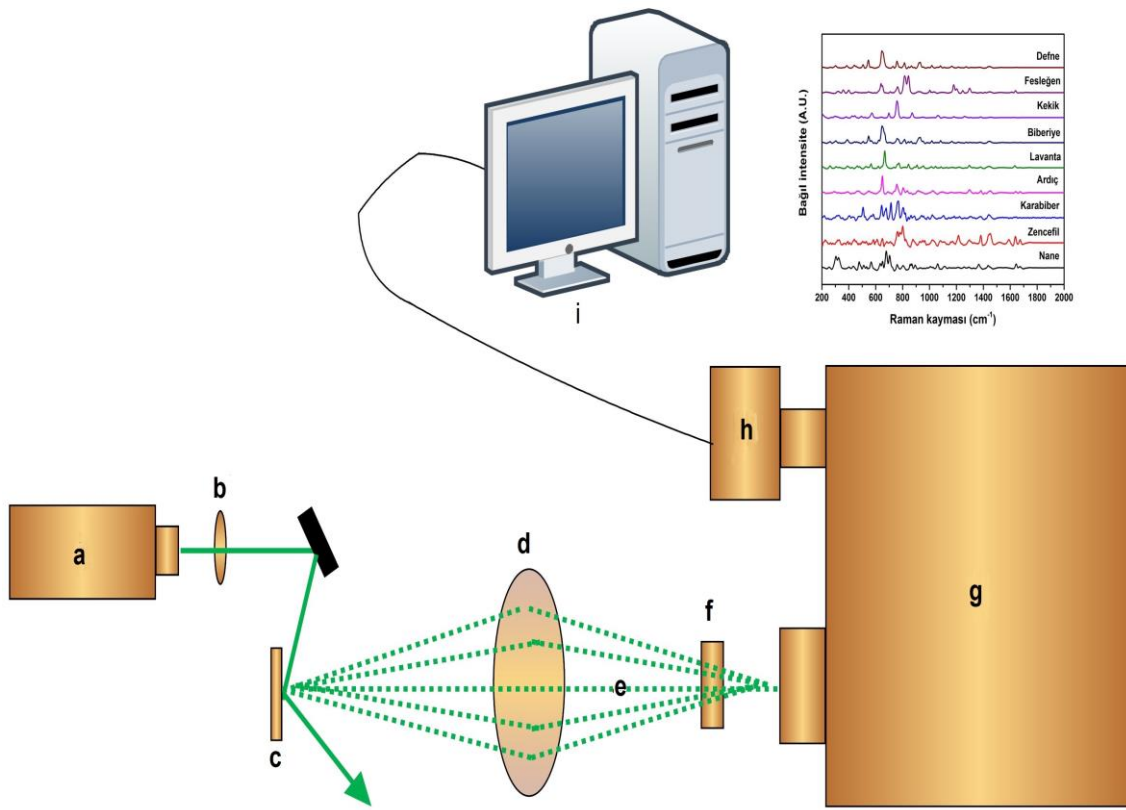


Şekil 2.10. IŞın saçılmaları

Raman enŐrųmantasyonu 1960'lı yıllarda akademik ortamda geliŐmesinden ve kullanımından bu yana ųnemli derecede ilerlemiŐtir. Gųnųmųzde, fotoŐođaltıcı lambalar (photo-multiplier tubes) yerini yųk eŐleŐmiŐ cihaz (CCD) dedektųrlerine ve diđer katı hal cihazlara bırakmıŐtır. Ųçlų monokromatųrler yerini optik ađlara ve Rayleigh Őizgi filtrelele sahip interferometrelere bırakmıŐtır [76].

NIR uyarma kaynaklarını kullanan FT-Raman spektrometreleri 1987 yılından bu yana ticari olarak kullanıma çıkmıştır [77]. Nd:YAG (Neodymium doped yttrium aluminum garnet) lazeri ve 1064 nm eksitasyon kullanan FT-Raman enstrümanları protein gibi biyolojik materyaller içeren örneklerin Raman analizinde sorun olan floresans etkisini azaltmaktadır [78]. Diğer avantajları ise, yüksek spektral çözünürlük ve dalga boyu hassasiyeti olarak öne çıkmaktadır.

Raman spektrometresi Şekil 2.11.'deki ışık kaynağı, örnek ölçüm haznesi, dalga boyu seçici, dedektör ve kaydediciden oluşmuştur. Raman ölçümlerinin etkin olması büyük oranda lazer kaynaklıdır.



Şekil 2.11. Raman spektroskopisi enstrümanları. a) lazer, b) odaklama lensi, c) örnek, d) toplama lensi, e) Raman saçılması, f) dar dalga boyu aralıklı filtre, g) spektrometre, h) CCD, i) yazılım.

Raman spektroskopisinde yüzeyde ve hacimde ölçüm yapabilmek mümkün olmaktadır. Yüzeyde ölçüm için x-y eksenli hareket edebilen bir mikroskopun dâhil edilmesi, bir numunenin belirli bölgelerinin analiz edilmesini sağlamaktadır. 20x, 50x ve 100x büyütme oldukça yaygındır. Lazer spot boyutu, lazer dalga boyu ve objektifin sayısal diyaframı (NA) tarafından belirlenmektedir. 50x objektif, 0,75 NA, 514 nm dalga boyu değerleri kullanıldığında, teorik olarak spot yarıçapı 0,84 μm

hesaplanmıştır [76]. Tipik uyarma dalga boyları Argon iyon lazer ile 457 nm, 488 nm ve 514 nm; HeNe Lazer ile 633 nm ve diod lazerler ile 785 nm ve 730 nm'dir. 90°'lik örnekleme optiklerine sahip olan ilk dispersive Raman enstrümanlarının aksine mikro-Raman enstrümanları numuneye mikroskop ile odaklanan lazerle geniş bir şekilde 180° geri saçılım geometrisini kullanmakta ve saçılan ışığı aynı mikroskop objektifi ile toplamaktadır [76]. Saçılan radyasyon Rayleigh hattını, yarıklara (slit) ve monokromatöre yönelmeden önce çıkarmak için sınır üstü filtresi (edge filter) veya dar dalga boyu aralıklı filtre (notch filtre) gibi bir optik filtrelerden geçmektedir. Tipik bir monokromatör, optik ağ (diffraction grating) ve güvercin prizma bileşenlerinden oluşmuştur. Son olarak Raman saçılım radyasyonu lazer türüne ve dalga boyuna uygun bir dedektöre gönderilir ve elektrik sinyaline dönütürülerek kaydedilir [76].

Raman saçılması atomlar titreşirken fonksiyonel grupların kutuplaşabilirliğine bağlı bir spektroskopik analiz yöntemidir. Dolayısıyla, C=O, N-H ve O-H gibi polar gruplar güçlü kızılötesi gerilme titreşimlerine sahiptir ve C=C, C-C ve S-S gibi polar olmayan gruplar şiddetli Raman hatları oluşturmaktadır. Bu anlamda IR absorpsiyonu ve Raman saçılımı birbirinin tamamlayıcısı olarak görülebilmektedir [74]. Polar bir molekül olan suyun oldukça zayıf bir Raman saçılımı olup Raman spektrumuna oldukça küçük bir paraziti vardır. Sonuç olarak, büyük oranda su ihtiva edebilen gıda örneklerinin Raman spektroskopisi ile analizi oldukça uygundur. Titreşim spektroskopisi küçük moleküllerin interaksyonları ve kimyasal yapılarını araştıran klasik analiz metodu olarak kabul görmeye başlamıştır. Bununla birlikte birçok gıda matrisinin yapısında bulunan protein ve polisakkaritler gibi makro molekül bileşenlerinin sinyalleri, geniş bir grup fonksiyonel grup ve onların çeşitli mikroortamlarının oluşturduğu geniş spektral bandlar tarafından örtüşmektedir [74].

Raman spektroskopisinin insanoğlunun günlük hayatının bir parçası olan gıda bilimi alanında da uygulamaları vardır. Fermentasyon, ısıl işlem, basınç uygulamaları, pişirme, saklama, gibi birçok gıda uygulamasının yanı sıra bakteriyel bozunma, kontaminasyon gibi birçok husus da Raman spektroskopisinin konularından olmuştur. Özellikle endüstriyel uygulamaların izlenebilirliği oldukça önem arz etmektedir. Örneğin şarap üretiminde yüksek kaliteli şarapların üretimi fermentasyon izlenebilirliği ile ilişkilidir. Eğer şarap fazla fermente olursa şarap

içerisindeki fazla etanol, asetik aside dönüşebilmekte ve şarap karakterini değiştirebilmektedir. HPLC gibi geleneksel yöntemler sıklıkla kullanılmakta fakat gıda uygulamalarının izlenebilirliği hususunda bir takım dezavantajları vardır [79].

Su moleküllerinin pik şiddetleri diğer moleküllerin pik şiddetleri ile nadiren girişimde bulunduğu (genellikle 3000-3200 cm^{-1} 'de) için özellikle yüksek oranda su ihtiva eden matrise sahip olan gıda maddeleri için Raman spektroskopisi analizleri tercih edilmektedir [79].

Raman spektroskopisinin literatürde öne çıkan dezavantajlarına, sinyallerinin zayıf olması ve birçok organik maddeden kaynaklan floresansın kısmen güçlü sinyalinin kısmen zayıf Raman sinyali ile girişimde bulunması olarak yer verilmiştir. Ayrıca sahada kullanılan *in-situ* Raman sistemlerinin bazı örnekler için masaüstü Raman sistemlerine oranla ideal bir spektral tespit aralığı ve spektral çözünürlüğü sahip olmadığına da yer verilmiştir [79].

Uysal ve ark. [80] kademeli sirke fermentasyonundaki glikoz ve fruktoz tüketimi, etanol üretimi/tüketimi ve asetik asit üretimini Raman spektroskopisi ile takip etmiş, kullandıkları referans metot HPLC ile kalibrasyon modeli oluşturmuşlardır. Modeli valide ettiklerinde sonuç olarak etanol ($R^2 = 0,996$), asetik asit ($R^2 = 0,983$) glikoz ($R^2 = 0,973$) ve fruktoz ($R^2 = 0,988$), için iyi korelasyon değerleri elde etmişlerdir.

Bir diğer fermentasyon takibi Q. Wang ve ark. [81] tarafından üretim hattında gerçekleştirilmiş (on-line) 1064 nm lazer enstrümanına sahip FT-Raman sistemini kullanmışlardır. Sonuç olarak spektral çözünürlük ideal olmasa da, şaraptaki etanol, şeker gibi anahtar bileşenleri tanımlayabilmişlerdir.

Türkiye ve dünyada oldukça önemli bir konu olan et ve et ürünlerinin hızlı tayinini de Raman spektroskopisi ile yapılabildiğinin örnekleri literatürde mevcuttur. Boyacı ve ark. [82], sığır, koyun, domuz, balık, tavuk, keçi ve manda örneklerinin yağ kompozisyonunu Raman spektroskopisinde araştırarak, örneklerin ayrımını temel bileşen analizi ile yapmayı başarmışlardır. Bir diğer çalışmalarında ise sığır ve at etlerinden elde ettikleri yağ örnekleri ile elde ettikleri Raman spektrumlarının PCA metodu ile orjin tayinini gerçekleştirmiş ve tagşiş söz konusu olduğunda farklı konsantrasyonlardaki karışımların da (% 25, % 50, % 75, ağırlıkça) ayrımını gösterebilmişlerdir [83].

Altı çeşit balık türünde dondurulma ve çözünme döngüsüne bağlı tazelik analizi 64 örneğin elde edilen Raman spektrumları ile oluşturulan PCA modeli ile bir kere

dondurulup çözünen ve iki kere dondurulup çözünen örnekler ile taze örnekler üç ayrı grupta kümelenmiştir [84].

Bitkisel yağların karakterizasyonu Raman spektroskopisinin bir diğer konusu olmuştur. Isı ve oksidasyonun etkilerinin araştırılmasının yanısıra taşıma ve köken analizleri de yürütülmüştür [79].

21 farklı kaynaktan (hindistancevizi, ayçiçek zeytin, palm, fıstık, palm çekirdeği, kanola, soya, balık, terayağ vb.) temin edilen 128 adet yemeklik sıvı yağ ve katı yağda Raman spektroskopisi kullanılarak tekli doymamış, çoklu doymamış yağ asidi ve doymuş, klasifikasyonu yapılmıştır [85].

Velioğlu ve ark. [86] bir çalışmalarında kanola örneklerinde erusik asit tespiti Raman spektroskopisi ile gerçekleştirilmiş, referans yöntem olarak kullanılan gc sonuçları ile korelasyon elde edilmiştir.

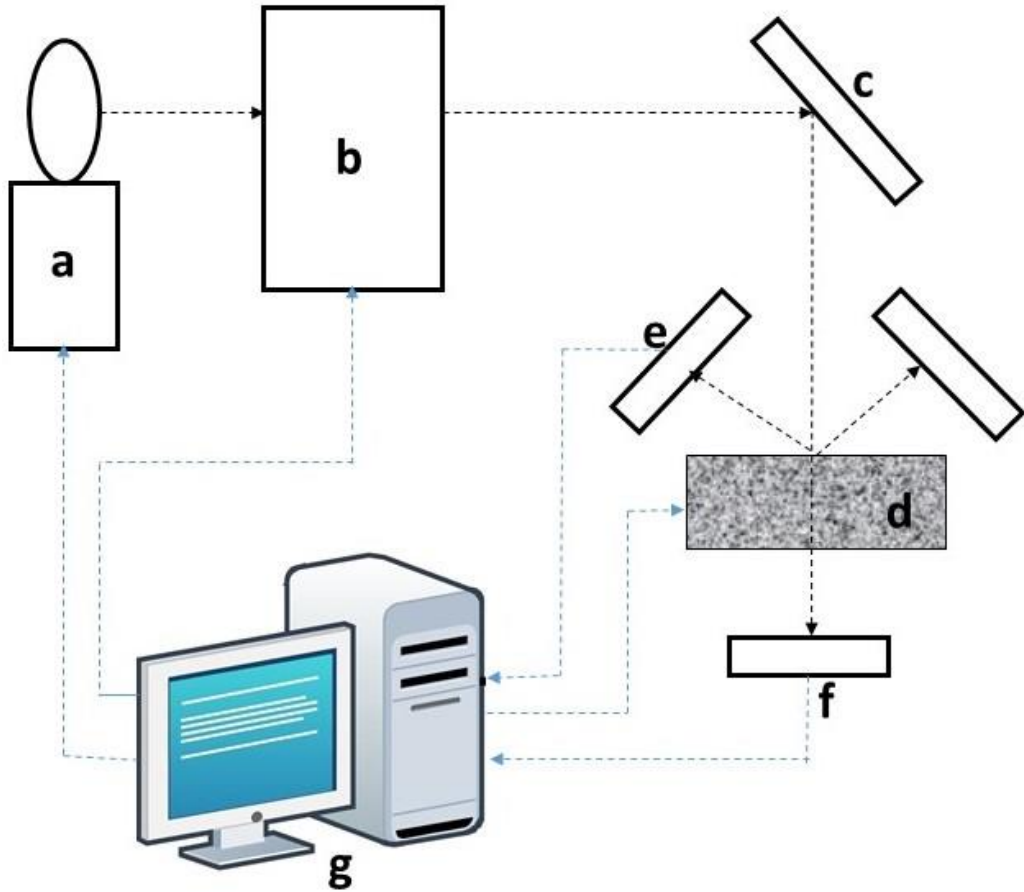
Uçucu yağlar gıda takviyesi olarak kullanılmasının yanısıra antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri sebebi ile kozmetik sektöründe oldukça kullanılmaktadır. Düşük kaliteli ve taşıma uğramış uçucu yağların kalite kontrolüne yönelik bir takım çalışmalar mevcuttur. Kozmetik sektöründe tercih edilen 15 farklı uçucu yağın Raman spektroskopisi ile analizi Jentzsch ve ark. [87] tarafından yapılmış uçucu yağlardaki terpenoidlerin Raman spektrumunda oluşturduğu hatlar araştırılmış ve temel bileşen analizi yapılarak ayırım sağlanmıştır.

2.5.2. NIRS

Kızılötesi ışınması, görünür ışık ve mikrodalga dalga boyları arasındaki elektromanyetik spektrum bölgesindedir. Yakın kızılötesi dalgaboyları 750-2500 nm ($4000-13000\text{ cm}^{-1}$) arasındadır. Katı, sıvı ve gaz faz örnekleri kızılötesi radyasyonunu belirli dalga boylarında absorblamaları ile spektrum (parmakizi) oluştururlar [88-90]. NIR reflektans spektroskopisinin prensibi toz halindeki katıdan yansıyan 1100-2500 nm dalgaboyları arasındaki ışığın içerdiği kompozisyon bilgisinin bilgisayar tarafından çözümlenmesi ve verinin analiz edilmesi işlemidir. Bu metot birçok organik bileşikteki bileşenlerin hızlı, eş zamanlı ve zararsız miktar tayini olanağı sunmaktadır [90-92]. Başka bir ifade ile O-H, N-H ve O-H bağlarını içeren organik kimya yapılarını spektrumun NIR bölgesindeki absorpsiyon enerjisi vasıtası ile değerlendirmektedir. NIR spektrumlarındaki spektral karakteristikleri kısa dalga boyundaki karmaşık üst tonlar ve yüksek frekans kombinasyonları oluşturur [93]. Son yıllarda geliştirilen yeni enstrümanlar ve bilgisayar algoritmaları

NIR spektrumlarındaki verilerin daha kolay işlenebilmesine ve daha anlamlı sonuçlar ortaya koymasına olanak sağlamıştır. Spektroskopik yöntemlerin kemometri ile birlikte çalışmasının organik bileşenlerin kimyasal kompozisyonlarının değerlendirilmesinde oldukça güçlü bir araç olarak yer verildiğine literatürde oldukça rastlanmaktadır [91]. Kemometrik teknikler ile birlikte çalışıldığında bir gıda matrisinin kompozisyonunda bulunan ve NIR spektrumu zor tespit edilebilecek bir hedef kimyasalın daha kolay ayırt edilebilmesine imkân vermektedir [91, 92, 94, 95]. Literatürde spektroskopi ve kemometrinin birlikte çalışıldığı organik matrislere örnek olarak; yemler, tahıl çeşitleri, et ve et ürünleri, içecekler, tarım ürünleri verilmektedir [88-94, 96, 97].

Şekil 2.12.'de şematik olarak gösterilen NIR spektrometresi, ışık kaynağı, örnek koyma aksesuarı, monokromator, dedektör ve optik bileşenlerden (lensler, kolimatör, ışın demeti ayırıcısı, toplama küresi ve optik fiberler) oluşmuştur [91, 98].



Şekil 2.12. NIR enstrümanları. a) ışık kaynağı, b) ışın demeti ayırıcı sistem, c) yansıtıcı, d) örnek odası, e) yayılma yansıması dedektörü, f) transmisyon dedektörü, g) yazılım.

Örneğin NIR spektrumunu toplamak için temel olarak reflektans ve transmitans olmak üzere iki ana metot kullanılmaktadır. Genellikle katı ve toz materyaller için kullanılan reflektans modunda, ışık kaynağı ve dedektör, aynasal yansımadan (örnekle etkileşimde bulunmamış ışığın yansıması) kaçınmak amacı ile spesifik bir açı ile monte edilmektedir. Genellikle sıvı örneklerde kullanılan transmitans modunda ise ışık kaynağı dedektörün karşısına monte edilirken, interaktans modda ise speküler yansımadan kaynaklanan ışığın doğruca dedektöre girmesinin engellenmesi için ışık kaynağı ve dedektör birbirlerine paralel pozisyonda monte edilmektedir [91, 96, 98, 99]. Reflektans ve transmitans modlarının her ikisinde de toplama küreleri ışığı toplamak ve sinyal-gürültü oranını arttırmak için kullanılmaktadır. Diğer taraftan, transmitans ölçümleri örnek yüzeyini kolayca yakarak spektral değişikliklere yol açabilecek oldukça yüksek ışık şiddetlerine ihtiyaç duymaktadır [98, 99].

NIRS analizleri bitkisel materyallerin içerik tayini amacı ile de kullanılmıştır. Schulz ve ark. [100] sebze ve uçucu yağ bitkilerinin kalite parametrelerinin tayini için NIR spektroskopisinden yararlanmış, farklı havuç çeşitlerinde toplam karotenoid ve şeker içeriklerini araştırmıştır. NIR spektrumunda su ve karbonhidrat içeriğinden kaynaklanan O-H ve C-H bağlarının güçlü absorpsiyon bandlarının 5150, 6897, 8400 ve 10100 cm^{-1} de gözlendiğini bununla birlikte minor bileşiklerden karotenoidlerin de NIR spektrumunu etkilediğini kemometrik analiz yöntemleri ile ortaya koymuştur [100]. Ayrıca rezene, kimyon, kişniş dereotunda uçucu yağlarında limonen, karvon, fenkon, anetol, estragol ve linalol terpeoidlerini NIRS ve kemometri kullanarak saptamaya çalışmış linalol haricindeki terpenoidlerde iyi bir korelasyon elde etmiştir [100].

Dört farklı coğrafik bölgeden temin edilen hünnap meyvesinde coğrafi ayrımı tespit etmek amacıyla NIR spektroskopisi ve kemometri kullanılmıştır. Ayrıca, toplam şeker, toplam asitlik, toplam fenolik madde ve toplam antioksidan aktivitesinin kantitatif analizi için standart normal varyasyon (SNV), PLS, geri yayılım-yapay sinir ağıları (BP-ANN), en küçük kareler destek vektör makineleri (LS-SVM) modelleri geliştirilmiştir. Toplam şeker miktarı 0,862 kalibrasyon belirleme katsayısı ve 0,818 validasyon belirleme katsayısı ile tahmin edilmiştir. Toplam asitlik miktarı 0,904'e eşit kalibrasyon belirleme katsayısı ve validasyon belirleme katsayısı ile tahmin edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı 0,968 kalibrasyon belirleme

kasayısı ve 0,936 validasyon belirleme katsayısı ile tahmin edilmiştir. Toplam asitlik miktarı 0,878'e eşit kalibrasyon belirleme katsayısı ve validasyon belirleme katsayısı ile tahmin edilmiştir.

Sitrus yağlarının NIR spektroskopisi ile analizi gerçekleştirilmiş, 1100-2500 nm dalga boyları araştırılmıştır. NIRS metodu ve kemometrinin birlikte kullanılması ile terpen hidrokarbolların yanı sıra aldehit, notkaton, limonen gibi değerli bileşiklerinde kantifikasyonuna olanak tanıdığı bildirilmiştir. Dekanal/nootkatone kalibrasyonu 2240-2360 nm dalgaboylarında gözlenen C-H bükülme-gerilme interaksiyonları kullanılarak oluşturulmuş bu amaçla PLS modeli geliştirilmiştir [101].

Kekik, güveyotu ve papatya türlerinde NIR analizleri yürütülmüş, karvakrol, timol, γ -terpinen, α -bisabolol ve β -farnesen gibi terpenoidler için kalibrasyon oluşturulmuş ve geliştirilen PCA modeli ile bitkilerin sınıflandırılması yapılmıştır. Geliştirilen PLS ve PCA modelleri için 2300-2500 nm dalga boyu kullanılmıştır. Terpenoid kantifikasyonu için oluşturulan kalibrasyon R^2 değerleri 0,97'den büyük bulunmuştur [102].

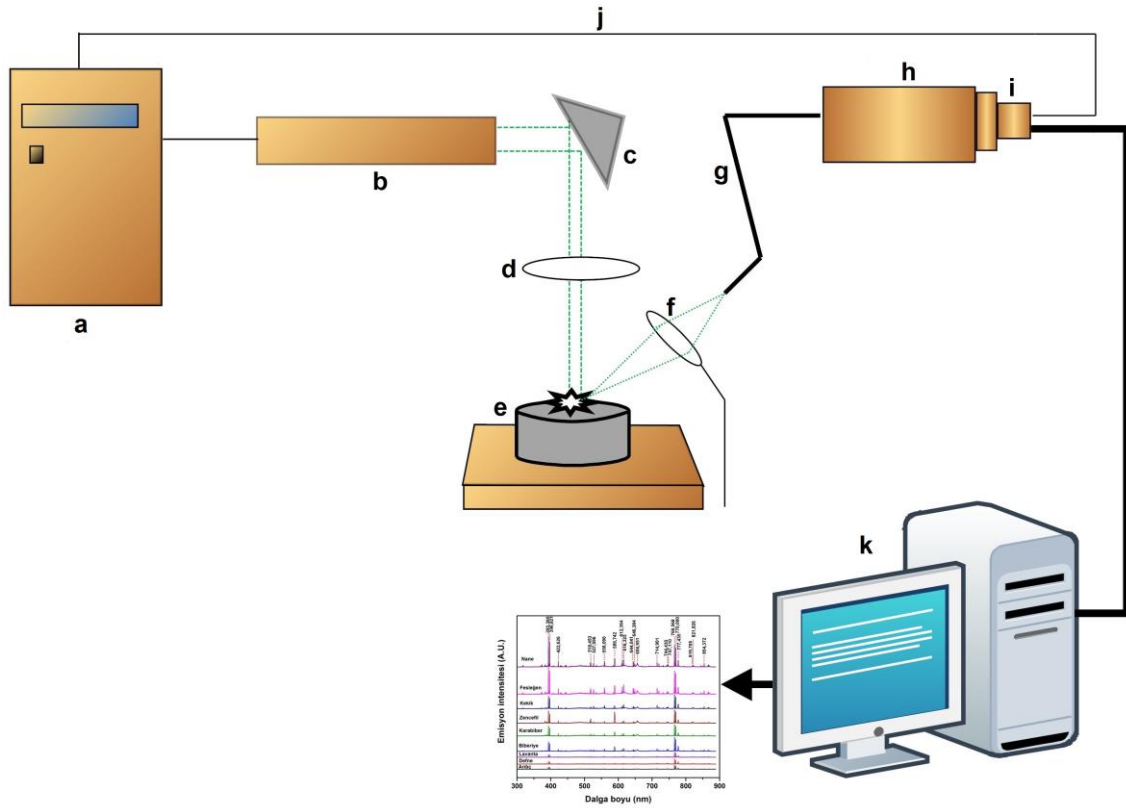
2.5.3. LIBS

Son zamanlarda gıda analizlerinde kullanılan spektroskopik yöntemlere LIBS (lazer indüklenmiş plazma spektroskopisi) eklenmiştir [103-105]. Spektroskopik yöntem, lazer atımının yüzeyde plazma bulutu oluşturması ve plazma bileşenlerinin araştırılması metoduna dayanmaktadır. Lazer atımı ile uyarılan örnek sonucu emisyonunda bulunan iyonik ve atomik maddeler bir detektör yardımı ile algılanarak analiz edilmektedir. LIBS analizi ile gıdanın elemental kompozisyonu, kimyasal ve kristal yapısından bağımsız bir şekilde belirlenebilmektedir [106]. LIBS yüzey analizi temelli bir metot olup, materyal mineral kompozisyonundaki tüm elementlerin eş zamanlı analizini yapmak mümkün olmaktadır.

LIBS sistemlerinde genellikle atımlı lazer, örnek yüzeyi üzerinde plazma oluşturan odaklama lensi, plazma emisyonunu toplayan toplayıcı lens ve uygun bir dedektör monte edilmiş spektrometre enstrümanlarından oluşmaktadır (Şekil 2.13.).

Özellikle bitki analizleri için en çok kullanılan lazer kaynakları 1064 nm Nd:YAG lazeri yanı sıra ikinci (532 nm) ve dördüncü harmonikleri (266 nm) de kullanılmaktadır [107]. Bazı durumlarda, femtosaniye lazerler örnek yüzeyinde

daha düşük termal etkisi dolayısı ile daha düşük yanal hasara sebep olması sebebiyle yüksek uzaysal çözünürlüklü analizler için kullanılmaktadır [107]. Nd:YAG ve diğer tip lazerlerin farklı dalga boylarındaki kullanım fizibilitelerine literatürde yer verilmiştir [108, 109]. Lazer odaklaması genellikle 20 cm odak boyundan daha az plane-convex lensler ile yapılmaktadır. Lazer atım enerjisi ve lens-örnek uzaklığı (LTSD: lens to sample distance) lazer akışını ve ışınımı etkilemektedir. Bu etkiler lazer oluşturmali plazmalar üzerindeki lazer odaklamasında ve atım enerjisinde varyasyonlara sebep olmaktadır [110].



Şekil 2.13. LIBS enstrümanları. a) lazer kaynağı ve soğutucu, b) atımlı lazer kafası, c) ayna, d) odaklayıcı lens, e) örnek, f) toplayıcı lens, g) optik fiber, h) dalga boyu seçici, i) dedektör dizilimi, j) dedektör tetikleyici sinyal, k) yazılım

Lens-örnek uzaklığı örnek yüzeyindeki ışınlanan alanı bir diğer ifade ile spot büyüklüğünü belirlemektedir (spot size). Lens odak uzaklığından daha kısa lens-örnek uzaklığı ile daha geniş bir spot büyüklüğü elde edilmektedir. Bu yaklaşımla heterojen test örneklerinde tekrarlanabilirliğin geliştirilebildiği bildirilmiştir [107]. Plazmadan yayılan ışık genellikle plane-convex lensler veya aynalardan oluşan optik kofigürasyon tarafından toplanmakta ve doğrudan spektrometre giriş yarığına (slit) odaklanmaktadır. Bazı optik tasarımlarda, optik fiberler de kullanılmıştır.

Spektral analizler ve sinyal tespiti için saha analizlerine uygun taşınabilir, CCD veya ICCD (intensified charge-coupled device) dedektör monteli Echelle optikler gibi oldukça çeşitli spektrometreler mevcuttur [107]. Genellikle, spektrometreler hızlı çoklu elemental analize olanak sağlayan, hedef spektral selektiviteye dayanan ve yöntem hassasiyeti olan metotlardır.

Literatürde gıda materyalinde kalite kontrol analizlerinin LIBS ile yapıldığı çalışmalara rastlamak mümkündür. Sezer ve ark. [103] yaptıkları bir çalışmada tahıl ürünlerinde protein analizinin Kjeldal ve Dumas gibi geleneksel yöntemler ile yapıldığında uzun analiz süreleri, yüksek saflığa bağlı taşıyıcı gaz ve titrasyon hataları gibi dezavantajlarının ortaya çıktığına dikkat çekmiş bu metotlar yerine hızlı, güvenilir ve çevre dostu yöntem olarak LIBS analizini öne sürmüşlerdir. Çalışmada kantitatif doğrulama için kemometriden yararlanılmış % 7,9-20,9 aralığındaki protein bileşimi için 0,992 R² değeri ile iyi bir korelasyon elde edilmiştir.

Bilge ve ark. [104] et türlerinin tanısı için LIBS analizi yürütmüşler ve spektral veri analizi için PCA kullanmışlardır. Sonuç olarak, sığır, tavuk ve domuz etlerini % 83,37 oranında ayırım sağlarken, geliştirdikleri PLS modeli sonucunda domuz ve tavuk eti ile tağşiş yapılmış sığır etleri için R² ve LOD değerleri sırası ile 0,99, % 4,4 ve 1,00, % 2 bulunmuştur.

Başka bir çalışmada süt tozlarında peynir altı suyu tozu tağşişini tespit etmek için LIBS ve kemometri analizleri yürütülmüş asidik peynir altı suyu tozu (yoğurt kültürü katılmış) ve tatlı peynir altı suyu tozu tespit limitleri sırası ile % 0,55 ve % 1,55 bulunmuştur [111].

Sıvı gıda matrislerinde de LIBS analizleri gerçekleştirilmiştir. Farklı kökenlerden 38 Kırmızı şarapda koruma altına alınmış menşe analizi (PDO) Moncayo ve ark. [105] tarafından LIBS ve sinir ağları kombine kullanılarak yapılmıştır. Şarabın LIBS ölçümlerinin alınması amacı ile geliştirilen kuru kolojen jeller kullanılmış örnek sıvı halden katı hale çevrilerek analitik performansın iyileştirilmesi sağlanmıştır.

LIBS gıda maddelerinde biyosid analizine de olanak vermektedir. Bir çalışmada meyve üzerindeki pestisit kalıntılarının saha analizlerinde zorluklarına değinilmiş elmalar üzerindeki chlorpyrifos pestisiti kalıntısı fosfor, sülfür ve klorinin spektral karakteristikleri takip edilerek bir yüzey analizi yöntemi olan LIBS analizi ile sağlanmıştır [112].

LIBS in bitki materyali analizlerinde kullanılabilirliği literatür ile desteklenmektedir. Yerel marketlerden edinilen çeşitli kök sebzeleri ile yapılan çalışmada 27 element, C₂ ve CN molekülleri 400 den fazla emisyon çizgisi vermiştir [113]. Mikro besinlerin pellet haline getirilmiş bitki örneklerinde LIBS analizi yapılmış, referans yöntem olarak İndüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP OES) kullanılmış ve çalışma neticesinde B, Cu, Fe, Mn ve Zn için tespit limitleri sırasıyla 2,2 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,6 mg/kg, 1,8 mg/kg ve 1,2 mg/kg bulunmuştur [114]. Altı çeşit türden Çin çay yapraklarında yapılan LIBS analizi sonucunda elde edilen spektral veri ile kemometrik analiz yapılmış ve 300 örnekte 294 örnek doğru tanımlanmış, ortalama doğru tanımlama oranı % 95,33 bulunmuştur [115].

LIBS analizlerinin çok yönlülüğü, örnek hazırlama adımlarını ortadan kaldırması gibi avantajlarının yanı sıra, bitki materyallerinin uygun kantitatif analizi için bazı sınır şartları söz konusudur. Birçok uygulamada, bu şartlar test örneği sunumu, kalitesi ve kalibrasyonuna bağlıdır.

LIBS analitik performansı, seçilen operasyonel parametrelere bağlıdır [107]. Ölçümü etkileyen lazere ait özellikler (dalga boyu, enerji, atım süresi, atımlar arası (shot to shot) dalgalanmaları vb.), ölçüm stratejileri (gecikme süresi, integrasyon zamanı, emisyon çizgisi seleksiyonu, zaman gecikmesi (delay time), veri toplama süresi (integration time gate), emisyon bantlarının seçimi ve yükseltme dedektörü kazancı vb.), optik tasarım (lazer odaklama, optik toplayıcı), çevresel atmosfer (gaz kompozisyonu ve basıncı) ve örnek prezantasyonu (analit mikro-homojenitesi, partikül boyutu dağılımı ve pellet yoğunluğu) gibi değişkenler dikkatle seçilmelidir [107].

Bitki yapraklarındaki makro ve mikro besin maddelerin belirlenmesi, ekonomik ilgi alanındaki ürünlerin beslenme durumunu değerlendirmek için kilit öneme sahip olmakta ve meyvelerin, sebzelerin ve tahılların üretimini ve/veya kalitesini sınırlayabilecek beslenme yetersizliklerinin tespiti için sıklıkla kullanılmaktadır [116].

Lazer odaklamasının ve aşınımın bitki yapraklarının pelletleri ile yapılan LIBS analizlerindeki etkisinin araştıran bir çalışmada Ca, K, Mg, P, Al, B, Cu, Fe, Mn, ve Zn için konsantrasyonlar tespit edilmiş, K I (404,414 nm), P I (213,618 nm), B I (249,773 nm), Cu I (324,755 nm), Fe II (259,940 nm), Mn II (257,610 nm), Zn II (206,200 nm), Ca I (442,544 nm), Ca II (393,366 nm), Al I (309,271 nm), Cd II

(214,441 nm) için emisyon çizgileri tayin edilmiştir. Çalışmada ayrıca tespit limitleri de hesaplanmış, Ca, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Al, Cd, Pb için sırası ile 0,1, 0,01, 1,0, 0,5, 0,4, 0,4, 0,3, 0,2, 3,9, 0,2, 0,4 mg/kg ve K için 2,0 g/kg hesaplanmıştır [117].

Sağlıklı ve turunçgil hastalığına sebep olan *Candidatus Liberibacter asiaticus* ekilmiş sitrus yapraklarında LIBS analizi yürütülmüş, sağlıklı ve mikroorganizma zararı görmüş bitki örneklerinde ayırım sağlanabilmiştir [118].

Bitki pelletlerinde mikro bileşen tespiti için çoklu bileşen analizi yöntemleri ve LIBS in kombine kullanıldığı bir çalışmada, B (249,773 nm), Cu (327,395 nm), Fe (275,578 nm), Mn (257,610 nm), Zn (206,200 nm) emisyon çizgileri saptanarak PLS modelleri geliştirilmiştir. Çalışmada B, Cu, Fe, Mn ve Zn elementleri için hesaplanan LOD değerleri sırası ile 3, 5, 7, 4 ve 12 mg/kg bulunmuştur [119]. Bitki materyalleri ayrıca çevresel kirliliğin tespiti için de analiz edilmektedir [120].

LIBS verilerine yapılacak kalibrasyon teknikleri çeşitlilik göstermektedir. Kalibrasyon referans materyalleri (CRMs) bu amaçla kullanılmaktadır [121]. CRMs bulunmadığı takdirde daha önce ölçümü yapılan örnek materyallerinin validasyonu ile kalibrasyon da yapılmaktadır [122].

PLS veya temel bileşen regresyonu (PCR) gibi çok değişkenli kalibrasyon metotları da kantitatif analizler için kullanılmaktadır.

Diğer bir alternatif ise kalibrasyonsuz LIBS (CF-LIBS) olarak adlandırılan kalibrasyon eğrilerinin ve/veya matris eşleştirilen standartların kullanılmasını gerektirmeyen, çok elementli nicelik analizi yaklaşımıdır [123, 124]. CF-LIBS, çizgi yoğunluklarının ve plazma özelliklerinin (plazma elektron yoğunluğu ve sıcaklığı) ölçülmesine ve uyarılmış seviyelerde bir Boltzmann popülasyonunun varsayımına dayanmaktadır. CF-LIBS ile ilgili Tognoni ve ark.'nın [124] hazırladığı derlemede kapsamlı bilgi yer almaktadır. Bununla birlikte, bu yazarlara göre, CF-LIBS sonuçlarının, bilinmeyen numunelere ilişkin doğruluğu kolayca değerlendirilememektedir.

Literatürde baharatlarda yapılmış olan kapsamlı bir LIBS analizi çalışmasına rastlanmamıştır. Tez kapsamında değerlendirilen dokuz baharat türünün LIBS analizi ile mineral tayini gerçekleştirilmiştir. Kantitatif analiz yöntemi olarak çok değişkenli analiz yöntemleri seçilmiştir.

2.6. Kemometrik Analiz Metotları

Kemometri disiplininin yaklaşımı, ilişkili veya ilişkisiz kimyasal bir veri setinden elde edilen anlamlı bilgilerin nesnel bir şekilde değerlendirilmesi için matematik, istatistik ve diğer yöntemlerin uygulanmasına dayanmaktadır. Çok değişkenli analizlere dayalı birçok kemometrik metot ile taşıma veya safsızlığa sebep olan maddelere karşı kimyasal verinin kantitatif ve kalitatif ölçümlerini yapabilen uygulamalar geliştirilmiştir. Gıdalarda kalite kriterlerine yönelik yapılan spektroskopik araştırmalarda, karmaşık ve büyük spektroskopik verilerin araştırılması ve anlamlı sonuçlar ortaya koyulmasında yaygın olarak kemometrik analizlerden yararlanılmıştır. Bu analizler içerisinde en çok kullanılanları veri tanımlama ve görselleştirme, ayırma ve sınıflandırma, regresyon ve tahmin olmak üzere üç sınıfta toplanabilmektedir [125].

Kemometride temel olarak, eğitilmiş ve eğitimsiz metot yaklaşımları ile bir ayrım yapılmaktadır. Eğitimsiz metotlar yaklaşımında sınıflar veya gruplar hakkında önceden bilgi sahibi olmaksızın örnekler arasındaki kümeleri veya eğilimlerin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Eğitilmiş metotlarda ise ilkinin aksine ilgili grubun oluşturulması için gruptaki örnekler denetlenen parametre değerlerinin önceden verilmesi üzerine kurulmuştur (eğitim/kalibrasyon seti). Daha sonra ise bilinmeyen örnek grubu tahmin edilmektedir (test/validasyon seti) [125]. Özellikle gıda alanında sıklıkla kullanılan eğitimsiz metotlara örnek olarak, hiyerarşik kümeleme analizi (HCA), PCA verilmektedir. Sık kullanılan eğitilmiş metotlara örnek olarak ise, doğrusal diskriminant analizi (LDA) ve PLS verilebilmektedir [126]. Bu tez çalışmasında PCA ve PLS analizlerine yer verilmiştir.

Kemometriden metotları açıklamadan önce öz vektör (eigenvector) ve öz değer (eigenvalue) kavramlarından bahsetmek gerekmektedir. Bir vektörün dönüşümüne uğraması ile boyutunun değişmesi fakat yönünün aynı kalması söz konusu ise bu dönüşüm vektörüne özvektör denilmektedir. Burada söz konusu olan özvektör değişimi sayısal uzunluğunun değişmesidir ve hesaplanan bu skaler değere özdeğer denilmektedir. PCA, veri matrisinin özvektörlere ve özdeğerlere özvektör ayrışması ile başlamaktadır. Spektral veride öz vektörler spektrum verilerinin matematiksel temsilidir. Verilerdeki maksimum varyans miktarını tanımlamak için hesaplanan n -boyutlu eksenler boyunca ortogonal vektörler olarak tespit edilirler. Çok değişkenli bir eksen tipik bir x-y grafiği üzerindeki bir çizgi grafiğine benzemektedir ve iki

eksene göre bir kesişim ve eğim vardır. Özvektörler ortogonal iken, 90° açı oluşturacak şekilde çapraz geçmektedirler ve ilk özvektör verilerin temel eğilimine düşerken ikincisi, ilkinin dikidir [127].

Her bir öz vektör (faktör) spektral veri setinde bulunan bazı spektral özellikleri tanımlamaktadır. Tamamen birbiriyle ilişkilendirilmiş olan spektral özellikler, bireysel bir faktörde birlikte olmalıdır ve tipik olarak, faktörler, veri kümesindeki gözlemlenen değişikliklere katkısı ile sıralanmaktadır. Verilere en çok katkıda bulunan faktörlerin bir alt kümesi seçilmekte ve bu set bazen ana faktörler olarak adlandırılmaktadır. Raman sinyallerindeki değişiklikler çoğunlukla spektrumdaki gürültüye ortogonaldır (diğer bir deyişle korelasyonsuzdur) ve önemli spektrum değişiklikleri ve rasgele gürültü çoğunlukla farklı faktörlere ayrılmaktadır. Bu nedenle, yararlı sinyali kaybetmeden gürültüyü boşa çıkaran birçok faktör atılabilmektedir. p_n noktasından p_1 'ye vektör olarak tanımlanan, faktörlerin bir alt kümesini kullanarak herhangi bir spektrum x tarif edilebilmektedir ve bunların her biri, skor (t_i) veya ana bileşen (PC) olarak bilinen bir skalar ağırlıklandırma faktörü ile Eş. 2.3'de olduğu gibi çarpılmaktadır;

$$x = t_1 p_1 + t_2 p_2 + \dots + t_n p_n + e \quad (2.3.)$$

Vektör e , x ' de bulunan fakat n faktörler tarafından modellenmemiş artık sinyali temsil etmektedir.

Kümelenme analizinin en basit yolu, belirli bir faktör için veri setindeki tüm spektrumların skorlarının başka bir faktörün skorlarına göre çizildiği bir PC grafiğidir [127].

PCA basit bir anlatımla çok sayıda değişken içinden, daha az sayıda en muhtemel anlamlı PC'leri hesaplayarak veri yapılarını basitleştirmek ve açıklamak için kullanılmaktadır. Hedef dışı (non-targeted) analizlerde PCA'nın prensibi, çok sayıda birbiri ile ilişkili değişkenlerden oluşan veri setinin boyutluluğunu, veri setinde mümkün olabildiğince değişken bırakarak azaltmasıdır [128].

Spektroskopik analizlerde en çok çalışılan regresyon modeli PLS regresyonudur [125]. PLS, bir tanımlayıcı matris X 'i bir tahmin vektörü/matrisi ile ilişkilendirmek için kullanılan bir yöntem olup, tahmin edilen değişkenleri yeni bir alana yansıtarak doğrusal bir regresyon modelini tanımlamaktadır. X matrisi spektroskopik veri (bağımsız değişken) içerirken, Y (bağımlı değişken) genellikle bir referans metot kullanılarak elde edilmiş çeşitli analitik parametrelerin kantitatif değerlerini

içermektedir. PLS analizi Eş.2.4'deki gibi bu iki matrisi ilişkilendiren bir regresyon modeli üretmeyi amaçlamaktadır.

$$Y = XB \quad (2.4.)$$

Eş. 2.4. PLS modelinin oldukça basitleştirilmiş gösterimidir. B matrisi spektrum şiddeti ve konsantrasyon (cevap) arasındaki ilişkiyi tanımlamaktadır. İki çeşit PLS analizi söz konusudur [129]. İlk türü yalnızca bir Y değişkenin analizini, ikinci türü ise çoklu Y değişkenlerinin eşzamanlı analizini kapsamaktadır. Bu çalışmada çok değişkenli PLS analizlerine yer verilmiştir. Yapılan PLS analizi konsantrasyonu bilinen değişkenler ile kalibrasyon modelinin geliştirilmesi ve bu modelin bilinmeyenlerin konsantrasyonlarını tahmin etmek aracılığı ile kullanılması basamaklarından oluşmuştur. PLS analizi, modeldeki her bir konsantrasyon (bağımlı değişken) için bir regresyon grafiği oluşturmaktadır. Analiz, konsantrasyon varyasyonları ile her bir spektrum noktasında gözlemlenen varyasyonlar arasındaki istatistiksel korelasyonu belirlemektedir. Bu regresyon grafikleri, bilinmeyen bir örneğin konsantrasyonunu tahmin etmek için gereken tüm bilgileri içermekte ve bu nedenle yeni "kalibrasyon eğrileri" olarak tanımlanmaktadır.

Model, her spektral veri noktasının spesifik dalga sayısı ile ilgili herhangi bir bilgi içermemekte ve her bir bağımlı değişkeni kalibre etmek için tipik spektral bir veri kullanmamaktadır. PLS, birçok spektrum bölgesi ve bağımsız değişken arasında bir korelasyon tanımlamaktadır. Modele göre bir elemanın konsantrasyonu arttıkça bir veya daha fazla element azaltılmalıdır [129]. PLS analizi, Eş. 2.5. de gösterilen denklemdeki gibi spektral değişiklikleri, bağımsız değişkenler ile korele etmek için doğrusal bir değer kombinasyonu kullanmaktadır;

$$Y = b_0 + b_1X_1 + \dots + b_kX_k + e \quad (2.5.)$$

Y konsantrasyon, X_n spektral veri, b_n regresyon katsayısı ve e hata matrisini simgelemektedir.

PLS modeli geliştirildiğinde güvenilirliği kontrol edildikten sonra bilinmeyen örnekler üzerinde çalışmaya hazırdır. Bir modelin başarısını değerlendirmek için kalibrasyonun kök ortalama karesi hatası (RMSEC) ve çapraz doğrulamanın kök ortalama karesi hatası (RMSECV) gibi bazı analitik değerler kullanılmaktadır. RMSEC modelin veriye ne kadar iyi uyarladığının ölçüsü olup, Eş. 2.6. deki gibi ifade edilmektedir;

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (2.6.)$$

Eş. 2.6. de tüm örnekler model oluşumuna dâhil edildiğinde y_i değişkenin gerçek değerini, \hat{y}_i tahmin edilen değişkenin değerlerini ve n örneklem büyüklüğünü simgelemektedir. RMSECV, modelin yeni örnekleri tahmin etme kabiliyetinin bir ölçütü olup Eş. 2.6.'te tanımlandığı gibidir. Farklı olarak burada y_i , model formülasyonuna dâhil olmayan örnekler için tahmin değerleridir.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (2.7.)$$

Eş. 2.7.'de, PRESS kareler tahmin hatasının toplamıdır ve çarpaz doğrulama yöntemleri ile hesaplanmaktadır. Çarpaz doğrulama yöntemlerinden en çok kullanılanlarından biri '*birini dışarıda bırak*' olup, tez kapsamında bu yöntem kullanılmıştır.

RMSEC ve RMSECV değerleri sadece model tutarlılığı hakkında bilgi sağlamakta fakat bilinmeyen örneklerin bileşenlerini tahmin etmede modelin kabiliyetini onaylamamaktadır. Bu nedenle, tahminin kök ortalama karesi hatası (RMSEP) gibi diğer bileşenleri hesaplamak üzere bağımsız bir validasyon seti kullanmak önem arz etmektedir [129]. PLS modelinde LV veya PC'lerin seçiminde RMSECV değerinin minimum olması göz önünde bulundurulmaktadır.

Kromometrik teknikler, spektroskopik analizlerde istenen spektral bilgilerin ekstraksiyonunu kolaylaştırmak için gerekli görülmektedir. Gıda matrisi oldukça karmaşıktır. Gıda analizlerinde, gıda parmak izi tespit etme yaklaşımları, bileşimin kapsamlı bir iç görüsü elde etmek için teknik olarak mümkün olduğunca çok bileşik veya özellik tespit etmeyi hedeflemektedir [130]. Söz konusu gıda parmak izlerinin otantik bir örneklem setiyle karşılaştırılması, yanlış tanımlamanın ortaya çıkması sağlamaktadır. Bu gibi yaklaşımlar, farklı kökenlerin veya tür çeşitlerinin ayrılması veya süt, yağ, alkollü içecekler ve balık, et, meyve veya sebze gibi geniş bir yelpazedeki gıda ürünlerine yönelik (bilinmeyen) kontaminantların tanımlanması gibi araştırmalarda başarıyla uygulanmıştır [130]. Hepsinin ortak noktası, belirli bir gıda matrisinin, veri toplama için spektroskopik bir teknikle ve daha sonra çok değişkenli istatistiksel değerlendirme için bir veya daha fazla kemometrik yaklaşımla araştırılmasıdır. Değerlendirilecek kritere göre (gıda karakteristiklerinin tanımlanması, coğrafik köken, tağşiş v.b.) kemometrik analiz yöntemi seçilmektedir.

Schulz ve ark. [15] birçok titreşim spektroskopisi metotlarını kullanarak 11 fesleğen uçucu yağ fraksiyonunda bulunan kanserojen bileşenleri (estragol ve metil öjenol) tanımlamış ve kantifikasyonunu sağlamışlardır. Uygulanan PLS regresyonu ile geliştirilen kalibrasyon sonucunda, titreşim spektroskopisi verileri ile GC referans değerleri arasında fesleğen kemotipleri için bir korelasyon kurulmuş ve bu sayede, kanserojen bileşiklerin seviyesine göre en uygun hasat zamanının değerlendirilmesine olanak sağlandığı bildirilmiştir [15].

IR ve Raman spektroskopisi kullanılarak kurutulmuş bazı aromatik bitkilerden hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağların bileşenleri araştırılmış, bitki kemotaksonomisi araştırmaları için PCA'yı yeni bir metot olarak bildirmişlerdir [14]. Velioğlu ve ark. [131] yedi çeşit bitkisel yağda araştırdıkları yağ asidi kompozisyonu analizinde elde ettikleri Raman spektrumlarının ikinci dereceden türevine dayanan barkodlar (2D-BRS) ile PCA ve PLS modelleri geliştirmişler, sekiz majör yağ asitinde barkod ve GC sonuçları arasında iyi bir korelasyon ($0,970-0,989 R^2$) ortaya koymuşlardır.

Kemometri ile spektrometrik analizlerde enstrümantal ve ortam şartlarından kaynaklanan değişiklikler de ortaya konulmuştur. Biberiye (*Rosmarinus officinalis*) yapraklarında bulunan karnosik asit analizi için NIRS kullanılmış, karnosik asit ölçümleri sırasında kullanılan üç farklı spektrofotometre ve üç farklı sıcaklığın analiz sonucuna etkisi karşılaştırılmıştır [132]. SECV değerleri üç farklı spektrofotometre için 0,5-1,5 aralığında bulunmuştur [132].

Çin'de geleneksel ilaç olarak kullanılan birçok bitki materyalini ihtiva eden Honghua yağının ticari olarak satışının yapıldığı dokuz markanın farklı partilerinden tedarik edilen 48 örnekle ile yapılan FT-NIR ve GC analizleri yapılmıştır [133]. Kantitatif analizleri için PLS kalibrasyonları oluşturulurken α -pinen, metil salisilat ve öjenol olmak üzere üç majör komponent seçilmiştir. Hesaplanan SEP değerleri α -pinen, metil salisilat ve öjenol için sırasıyla % 1,550, % 0,957 ve % 0,389 bulunmuştur [133].

Çeşitli beyazbiber ve karabiber örneklerinde uçucu yağ bileşimi NIRS ve PLS regresyon analizleri kullanılarak araştırılmış, acılık, terpenoid miktarı ve aroma içeriği bildirilmiştir [134, 135]. Yazarlar, NIR ve Raman gibi titreşim spektroskopisi metotlarının karabiber tanesi, ekstraktı ve yağının kalite kontrol analizleri için standart yöntemlerin yerini alabilecek yeni metotlar olduğunu ileri sürmüşler

oluşturdukları PLS modelleri ile 0,009-0,270 arasında oldukça tatmin edici SECV değerleri hesaplamışlardır [134, 135].

Farklı tarçın ve karanfil uçucu yağlarındaki bileşen kompozisyonu NIRS analizleri araştırılmış, geliştirilen çapraz doğrulama modelleri ile bileşen miktar tayini yapılmıştır. Her bir aromatik bitki türü için ayrı geliştirilen kalibrasyonlar ile GC analiz sonuçları ve NIR spektrumları arasında korelasyon saptanmıştır (0,985 R² değeri) [136].



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Materyal Temini

Ardıç (*Juniperus communis*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), defne (*Laurus nobilis*), fesleğen (*Ocimum basilicum*), karabiber (*Piper nigrum*), kekik (*Origanum majorana*), lavanta (*Lavandula latifolia*), nane (*Mentha spicata*) ve zencefil (*Zingiber officinale*) bitki örnekleri Türkiye'deki çeşitli yerel baharat satıcılarından temin edilmiştir. Dokuz baharatın her biri için üç farklı temin kaynağı tercih edilmiştir.

Uçucu yağlar hidrodistilasyon yöntemiyle üretilmiş ve ticari örnekler Türkiye'deki yerel aktarlardan temin edilmiştir.

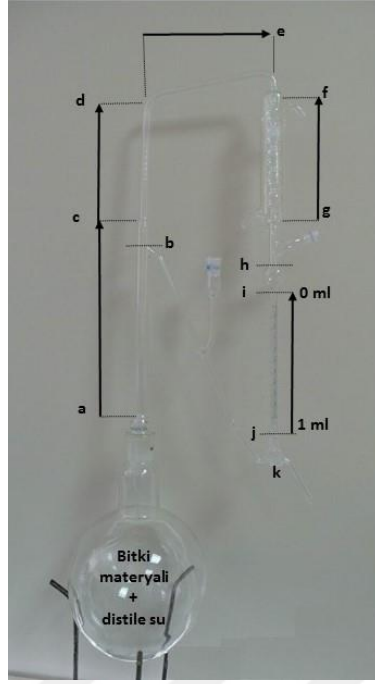
3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Etanol, hekzan, susuz sodyum sülfat Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Hidrodistilasyon ile Uçucu Yağ Üretimi

Baharatlardan uçucu yağ eldesi European Pharmacopoeia tarafından önerilen Clevenger aparatı (Şekil 3.1.) kullanılarak hidrodistilasyon ile yapılmıştır [137]. Uçucu yağ distilasyonu yapılacak öğütülmüş baharattan 100 g tartılıp, 2000 ml şilifli balona konulmuş ve 1500 ml distile su eklenmiştir. Kaynama başladıktan sonra bulanık sıvı akışı bitene kadar, üç saat boyunca distilasyona devam edilmiştir. Kaynayan baharat su karışımında uçucu yağ su buharı ile birlikte düzenekte yükselmekte ve düzeneğin soğutma kısmında kondanse olduktan sonra toplama balonunda iki faz halinde birikmektedir. Üst kısımda uçucu yağ olup alt kısımda biriken su geri kazanım tüpünden şilifli balona geri sirküle olmaktadır. Distilasyon sona erdiğinde musluk yardımıyla uçucu yağ toplanmıştır. Yağlardaki nemi uzaklaştırmak amacıyla susuz sodyum sülfat eklenerek çalkalanmış ve süzülmüştür. Elde edilen uçucu yağlar amber şişelerde -20°C'de analiz edilinceye kadar saklanmıştır.



Şekil 3.1. Clevenger düzeneği. a-e) Uçucu yağ buhar ile taşındığı yol, f-g) Soğutucu bölme, h-j) Toplama balonu, b-k) Geri kazanım tüpü.

3.2.2. Spektrometrik Ölçümler

Baharatların organik ve inorganik moleküler bileşimleri araştırmak amacı ile Raman spektroskopisi, NIRS ve LIBS kullanılmıştır. Baharat bileşiminde bulunan terpenoidlerin incelenmesi için Raman spektroskopisi ve NIRS kullanılmıştır.

Spektroskopik analizler için baharat örneklerinden 400 mg tartılarak pellet pres makinesinde (Specac 15T Manual Hydraulic Press, Swedesboro, New Jersey) 10 tonluk hidrolik pres uygulanarak pellet formuna getirilmiştir.

Baharatlardan hidrodistilasyon yolu ile elde edilen uçucu yağların spektrometrik analizleri Raman spektroskopisi kullanılarak yürütülmüştür.

3.2.2.1. Baharatların ve Uçucu Yağların Raman Spektroskopisi Ölçümleri

Raman ölçümleri için kullanılan Delta Nu Examiner Raman (Deltanu Inc., Laramie, WY, ABD) 785 nm lazer kaynağına sahip olup mikroskop sisteminde Olympus BX51 (Tokyo, Japonya) hareketli tabla ve soğutulmuş yük eşleşmiş cihaza (CCD dedektör) sahiptir. Bütün Raman spektrumu ölçümleri 200 ile 2000 cm^{-1} dalga sayıları aralığında elde edilmiştir. Baharatların yüzeyde Raman ölçümleri için pelet haline getirilmiş baharat örnekleri analiz edilmiştir. Ölçüm parametreleri baharat yüzeyi için 60 mW lazer gücü, 1 saniyelik ölçüm süresi olacak şekilde seçilmiş ve yüzey taranarak 10 bölgeden 3 paralelli olacak şekilde ölçüm alınmıştır.

Uçucu yağ örnekleri için cihaz parametreleri her bir örnek için 25 saniye örnek-lazer etkileşim süresi ve 150 mW lazer gücü olarak seçilmiştir. Bütün ölçümler, üç paralelli olarak kuvars Raman kuvvetlerinde gerçekleştirilmiş ve örnek miktarı 200 µl olmuştur. Her örnek spektrumu için yazılımın otomatik eksen düzeltmesi (automatic baseline correction) kullanılmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2. Baharatların NIRS Ölçümleri

Baharat pelletlerinde NIR analizleri reflektans modunda Nicolet iS50 FT-IR Spektrometrenin NIR modülü (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak yürütülmüştür. Ölçümler, 4000-10000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında 8 cm⁻¹ çözünürlükte 1557 veri kaydedilmiştir. Her bir pellet için 32 tarama yapılmış ve analiz üç paralelli yapılmıştır. Absorbans değerleri reflektans modunda, log 1/R olarak kaydedilmiştir (R, reflektans). Ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3. Baharatların LIBS Ölçümleri

Baharat pelletlerinde mineral yoğunluklarını analiz etmek amacıyla LIBS spektroskopisi kullanılmıştır. LIBS analizlerinde 50 mJ/lazer atımlı, 1064 nm dalga boyunda lazer atımı yapan Polaris New Wave Nd:YAG lazer (Fremont, CA, ABD) ve 186 ve 888 nm arasında spektrum kaydeden Applied Spectra 5 channel Aurora LIBS spektrometre (Fremont, CA, ABD) kullanılmıştır. Lazer, 3 Hz tekrarlama frekansı ve 0,3 µs gecikme süresi (gate delay), 1,05 ms integrasyon zamanı parametreleri ile Q-switched modunda çalıştırılmıştır. Lazer atımı başına 38 mJ enerji üretmektedir. Örnek pelletlerinin ölçümleri her bölgede 15 atım olacak şekilde yedi farklı bölge taranarak üç tekrarlı yapılmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Uçucu Yağların GC-MS Ölçümleri

Uçucu yağların bileşen tespiti için GC-MS analizi yapılmıştır. Bu amaçla 100µl uçucu yağ 5 ml hekzanla seyreltilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağ bileşenlerinin analizi, alev iyonizasyon detektörlü, otomatik örnekleyici içeren Trace DSQ II, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) gaz kromatografisi ile yürütülmüştür. Ayırma 60 m uzunluğunda, 0,25 mm iç çapında, film kalınlığı 0,25 µm Tg-wax kolonda yapılmıştır. Bileşiklerin kolon içinde taşınması helyum (1 ml/dk) gazı ile sağlanmıştır. Fırın sıcaklığı 40°C'de 10 dk beklemeden sonra, 5°C/dk hızla artarak 240°C'ye çıkmış ve bu sıcaklıkta 12 dk bekletilmiştir.

Enjeksiyon split modda (1:20), 250°C'de, 1µl hacimde gerçekleştirilmiştir. İyon kaynağı sıcaklığı 230°C'dir. Kütle Spektrometresi 35-350 m/z atomik kütle birimleri tarama aralığında, elektron çarpma iyonizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin tanımlanması için NIST 2005 ve Wiley 9 kütle spektrum kütüphaneleri kullanılarak kütle spektral karşılaştırmaları yapılmıştır. Analiz sonuçları relatif % olarak elde edilmiştir. Örneklerin alıkonma indekslerinin (RI) hesaplanmasında C8-C20 *n*-alkan standartları (Karışım no. 04070, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanılmıştır.

3.2.4. Kemometrik Analiz

Spektrometrik analizler sonucu elde edilen karmaşık verilerin yorumlanması amacıyla PCA ve PLS metodundan yararlanılmıştır. Bu amaçla MATLAB (Matlab R2015b, The Mathworks, Natick, MA, A.B.D) ve Bağımsız Kemometrik Yazılımı (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, ABD) kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Tez kapsamında değerlendirilen dokuz çeşit aromatik bitki türünün ve bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların spektroskopik analizleri yapılmış ve spektrum verileri kullanılarak kemometrik metotlar ile örneklerin sınıflandırılması yapılmıştır. Ayrıca uçucu yağların terpenoid kompozisyonlarının belirlenmesi amacı ile elde edilen spektrumlar GC-MS analizleri ile birlikte araştırılmış ve spektral verilerin GC-MS sonuçları ile ilişkili olduğu kemometrik yöntemler ile saptanmıştır.

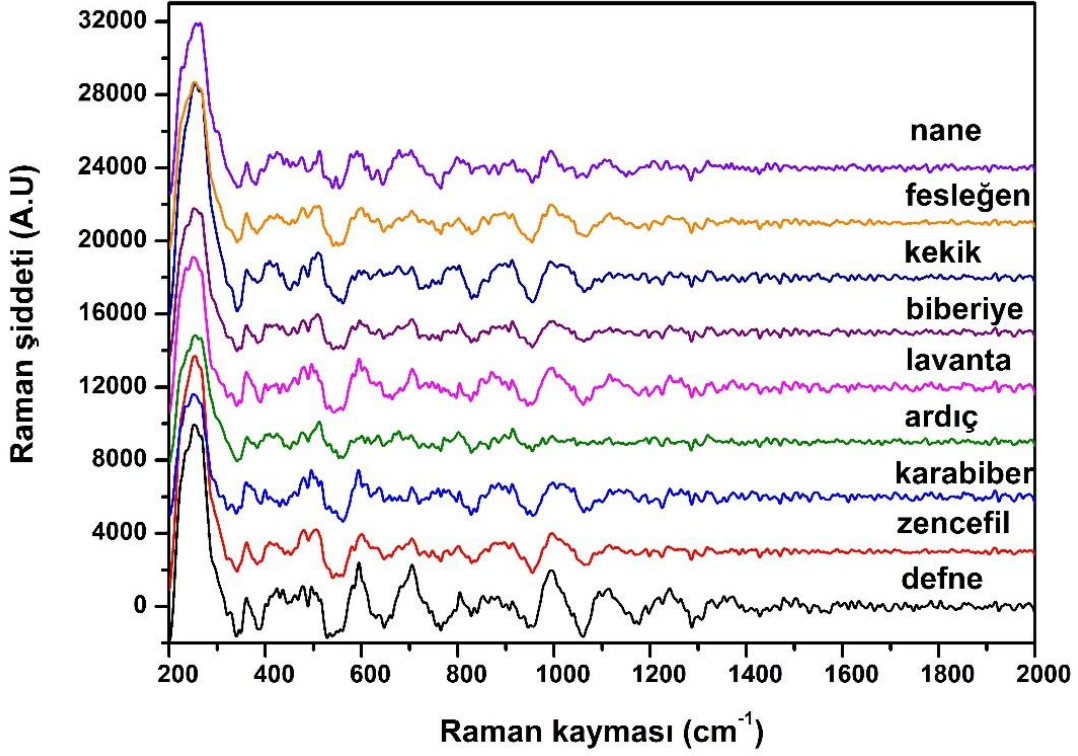
4.1. Baharatların Analizi

Baharat bileşimindeki organik maddelerin değerlendirilmesi amacı ile Raman ve NIR spektroskopisinden faydalanılırken, elementel kompozisyonunun araştırılması için LIBS metodundan faydalanılmıştır.

4.1.1. Raman Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Bitki materyallerinin yapısal hücre duvarı bileşenleri, bitki bileşenleri, metabolitler ve inorganik maddeler üzerinde yapılan araştırmalar spektroskopisi araştırmalarına dâhil edilmiş ve bu kapsamda pek çok araştırma yapılmıştır [138]. Bununla beraber Raman spektroskopisinde özellikle bitki materyali araştırmalarında numuneye veya numunenin kirliliğine bağlı olarak, floresans ciddi bir problem olarak görülmektedir. Tez kapsamında daha öncede belirtildiği gibi floresans özelliğe sahip bazı biyomateryallerin spektrumlarının Stokes pikleri ile girişim yapabilmesi mümkün olabilmektedir. Analiz edilen baharat pelletlerinin Raman spektrumları Şekil 4.1.'de verilmiştir. Spektrumların görselinde de görüldüğü gibi baharatların Raman spektrumlarından işlenebilir sonuçlar sağlanamamıştır. Dokulardaki ana bileşen klorofilin termal degradasyon, lüminesans ve fotooksidasyonu sebebiyle dispersif Raman spektroskopisi ile araştırılmasında zorluklar vardır [139]. Floresans etki, ölçümleri engelleyebilmekte veya ölçümleri imkânsız hale getirebilmektedir [138].

Bunların yanı sıra SERS tekniğinin kullanılması ile safsızlık ve bitki enzimlerinden kaynaklanan floresans etki baskılanmaktadır. Bununla birlikte, SERS metodunda yüksek miktarlarda ağır metallerin kullanılması hassas biyolojik örneklerin tahribatına sebep olmaktadır. 1064 nm uyarılmış radyasyon ile klorofil bandlarının intensitesi pre-rezonans etki sayesinde güçlenmektedir [140].



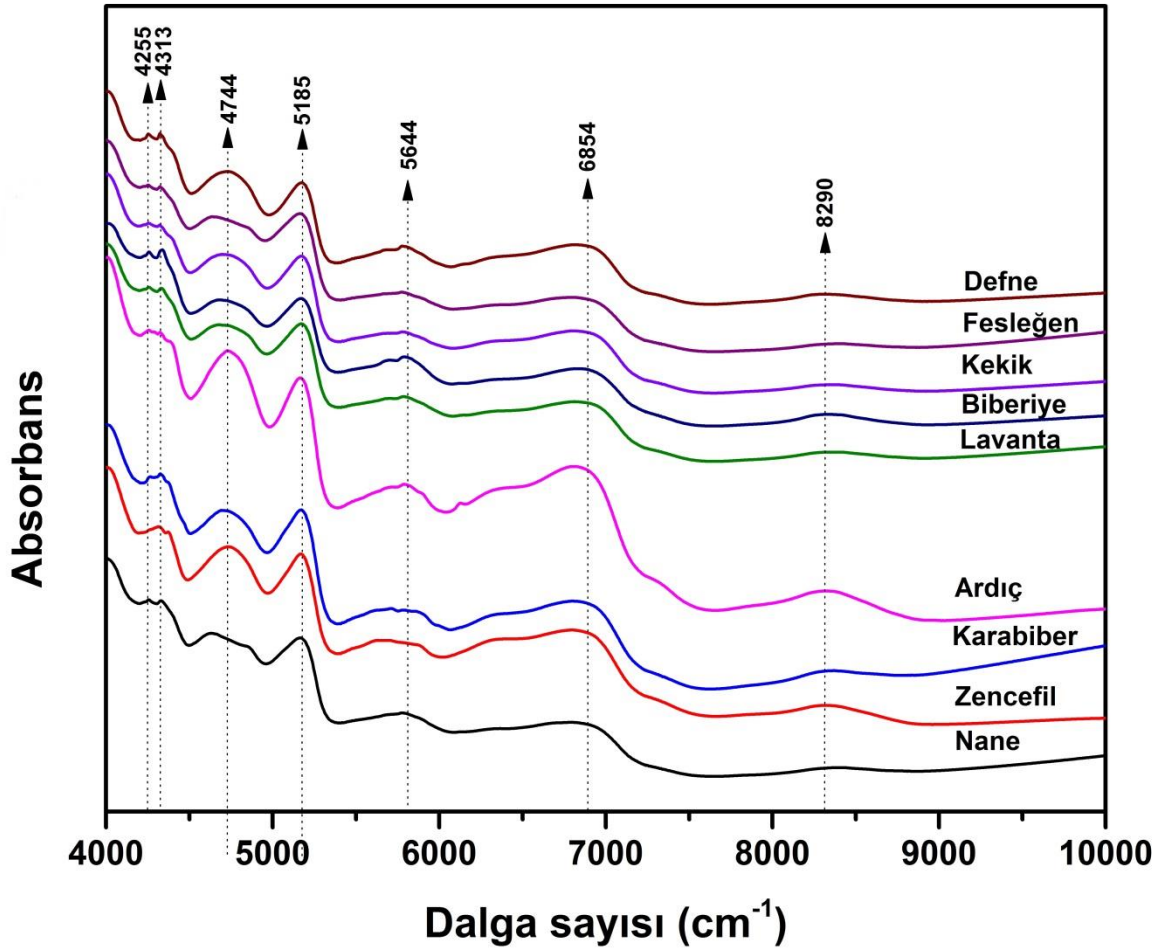
Şekil 4.1. Baharat örneklerinin Raman spektrumları

Güçlü sinyallere sebep olan suyun dipol momenti sebebiyle kuru materyallerin analizine odaklı çalışan IR spektroskopisi ile bitki materyallerinin analizi literatürde daha çok kabul görmüştür. Bu sebeple bitki materyallerinin analizi için NIR spektroskopisinin kullanılması tez kapsamında uygun görülmüştür.

4.1.2. NIR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Pellet haline getirilen baharat örneklerinin NIR spektrumları Şekil 4.2.'de verilmiştir. Örneklerin NIR spektrumları değerlendirildiğinde farklı türlerde spektral farklılık gözlenmiştir. Bununla birlikte aynı tür aromatik bitkiler benzer spektrum sergilemiştir. Salguero-Chaparro ve ark.'larının [141] yaptığı bir çalışmada; 2198, 2328 ve 2442 nm (4549, 4295, 4095 cm^{-1}) dalga boylarındaki güçlü absorpsiyon bandlarının, 1664, 2002, 2040, 2068 ve 2136 nm (sırasıyla, 6009, 4696, 4901, 4681 cm^{-1} dalga sayısında)'de gözlenen absorpsiyon bandlarının meyve rengi, su molekülü absorpsiyonu, yağlar ve yağ bileşenleri ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Literatür incelendiğinde, 5150, 6897, 8400 ve 10100 cm^{-1} dalga sayılarındaki NIR absorpsiyon bandları O-H ve C-H absorpsiyonları ilişkilendirilmiştir [142, 143]. NIR reflektans spektral karakteristiği; 8290 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}_2$ 'in C-H ikinci üst

tonu), 6855 cm^{-1} (fenollerin O-H birinci üst tonu, H_2O), 5645 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}_2$ 'nin C-H gerilme birinci üst tonu), 5185 cm^{-1} (H_2O 'nun O-H deformasyon ve O-H gerilme kombinasyonu), 4745 cm^{-1} (karbonhidratların C-H gerilme ve deformasyon kombinasyonu; karbonhidratların O-H gerilmesi ve C-O deformasyon kombinasyonu), ve 4313 cm^{-1} ve 4255 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ 'in C-H gerilme ve C-H deformasyon kombinasyonu) absorpsiyon bandları tarafından domine edilmektedir [144]. Tez kapsamında baharatların sınıflandırılması ve tanımlanması için kemometriden faydalanılmıştır.



Şekil 4.2. Dokuz çeşit aromatik bitki türünün NIR spektrumları

Aromatik bitkilerdeki terpenoid içerikleri oldukça farklılaşmaktadır. Bu farklılaşma dikkate alınarak baharatların ihtiva ettikleri uçucu yağ bileşenleri ve NIR spektrumları arasında bir ilişki kurulması amaçlanmıştır. Bu amaçla GC-MS analizlerinden elde edilen terpenoid oranları ve NIR spektrumları arasında bir korelasyon kurulmuş ve spektral veri analizi kısmında yer verilmiştir.

4.1.3. LIBS Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Baharatlara ait LIBS spektrumları bu bölümde değerlendirilmiştir. LIBS ölçümleri baharatların pellet haline getirildiği formlar üzerine lazer kaynağının odaklanması ve örnek yüzeyinde yüksek sıcaklık ile (8000-20000°K) oluşan kısmi buharlaşma neticesinde meydana gelen iyonize gaz ile plazma oluşmaktadır. Tüm organik yapıların yandığı ve ortamda sadece elemental bileşimin var olduğu plazma formunda, elementler tarafından yayınlanan karakteristik ışık dedektör tarafından toplanır ve karakteristik spektrum sinyallerini (pik) oluşturur. Dokuz aromatik bitki türüne ait ham spektrum Şekil 4.3.'de görülmektedir. Baharatlara ait LIBS spektrumları incelendiğinde benzer noktalarda şiddetli pikler gözlemlenmektedir. Piklerin elemental tayini için NIST Atomik Spektra Veritabanı kullanılmıştır [145]. Makro ve mikro-besin elementlerine ait olası pikler baharat grupları arasında değerlendirilmiş ve literatürle karşılaştırılmıştır.

Bitkiler için makro besin elementlerinden kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), sodyum (Na), fosfor (P), potasyum (K) ve sülfür (S) ve mikro besin elementleri çinko (Zn), demir (Fe), bakır (Cu), manganez (Mn), iyot (I), kobalt (Co), nikel (Ni), florür (F), vanadyum (V), krom (Cr), molibden (Mo), selenyum (Se), kalay (Sn), silikon (Si) e ait karakteristik pikler çalışma kapsamında araştırılmıştır [146, 147].

Bitkilerde N, klorofil üretimi ve hücre bölünmesi ile ilişkili olup, protein ve enzimlerin yapı taşıdır. Daha koyu yeşil renge ve hızlı büyümeyi teşvik etmektedir. Bitki protein seviyesinin yükselmesini teşvik etmektedir. Bitkide NO_2^- ve NH_4^+ moleküllerinde bulunmaktadır. LIBS spektrumunda 744,430 nm (N I) ve 821,826 nm (N I) pikleri N için karakteristiktir [146].

Ca elementi bitkilerde Ca^{++} iyonu olarak bulunmaktadır. Hücre duvarı formasyonuna dâhildir. Şekerlerin translokasyonu, kök tüyü formasyonu, meyve ve tohum üretimi gibi fonksiyonlarda görevleri vardır [146]. LIBS spektrumlarında Ca elementine ait olası pikler 393,360 nm (Ca II), 396,821 nm (Ca II), 422,626 nm (Ca I), 558,096 nm (Ca I), 612,384 nm (Ca II), 616,325 nm (Ca II), 644,041 nm (Ca I), 646,384 nm (Ca II), 714,901 nm (Ca I), 854,372 nm (Ca II)' ortaya çıkmaktadır.

Potasyumun bitkilerdeki fonksiyonu öncelikle bitki respirasyonu ile ilişkilidir. Sap kalitesinden sorumlu olup hastalıklara direnç sağlamada yardımcı olmaktadır. Nitrojenin proteine dönüşünü teşvik etmektedir. Bitki yapısında K^+ iyonu olarak

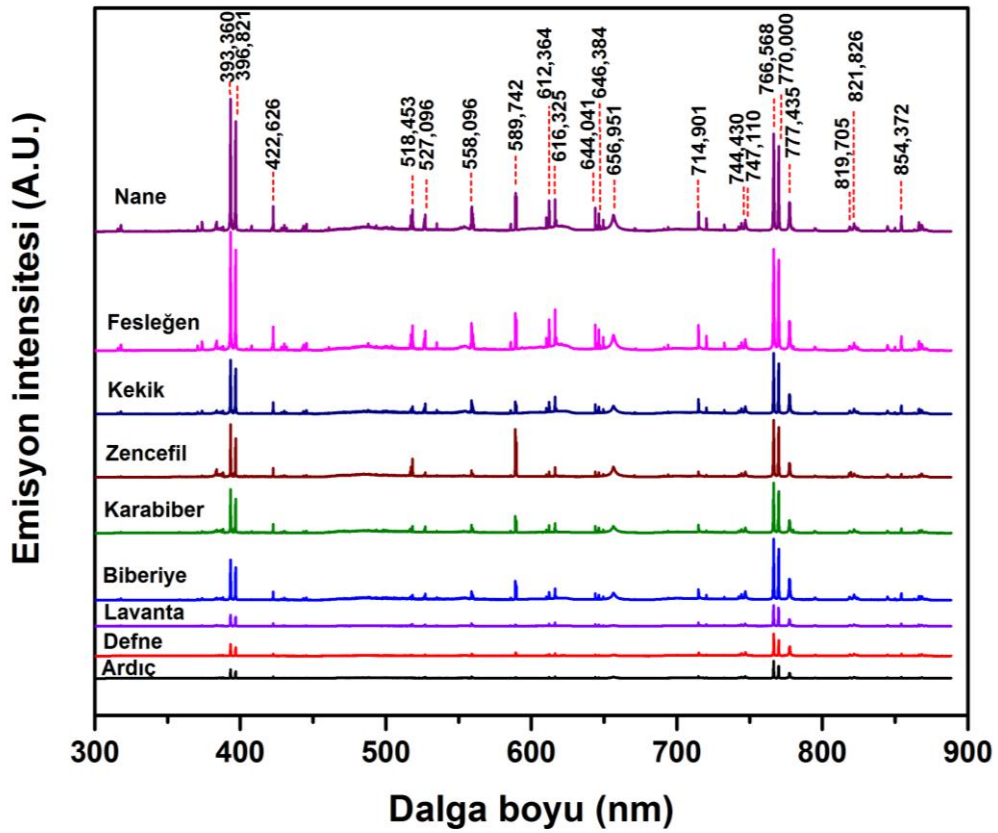
bulunmaktadır [146]. K elementine ait olası pikler; 422,626 nm (K II), 766,568 nm (K I), 770,000 nm (K I) dolaylarında gözükmetedir.

Mg bitkide Mg^{++} iyonu formunda bulunmaktadır. Klorofil ve tohum formasyonu için esansiyeldir. Klorofilin prolidin halkasında bulunmaktadır Diğer bitki besinlerinin alımını regüle etmektedir. Bitkide fosforun taşıyıcı davranışı göstermektedir. Yağ formasyonunu teşvik etmektedir [147]. LIBS spektrumlarında Mg elementine ait olası pik 518,453 nm (Mg I)'de ortaya çıkmıştır.

Fe bitkide Fe^{++} iyonu olarak bulunmaktadır. Klorofil sentezi, bitki metabolizması ve oksidasyonu için gereklidir [147]. Fe elementi ise 527,096 nm (Fe I) dolaylarında olası pike sahiptir.

Çinko diğer elementlerin bitkilerde kullanımını kontrol eder. Büyüme hormonları, tohum üretimi için esansiyeldir. Bitkide Zn^{++} iyonu olarak bulunmaktadır [147]. Zn olası piki LIBS spektrumlarında 747,110 nm (Zn II) dolaylarında ortaya çıkmıştır.

LIBS spektrumunda gözlenen diğer elementler; H olası piki 656,951 nm (H I), O piki (O I) 777,435 nm, Al elementinin olası piki 396,821 nm, Na karakteristik pikleri 589,742 nm (Na I) ve 819,705 nm (Na I) de ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.3. Dokuz çeşit aromatik bitki türünün LIBS spektrumları

Baharatlarının spektrumları incelendiğinde baharatların kendi içlerinde üç farklı türünün majör ve minor pik konumları benzerlik gösterse de intensite farklılıkları söz konusu olmaktadır. Bununla birlikte farklı baharat türlerinin spektrum pik şiddetlerinin farklılıkları açıkça görülmektedir.

Mineral yoğunluklarına göre spektral görüntüleri dokuz baharat türünü üç alt gruba bölmektedir. Nane, fesleğen ve kekik baharatları en yüksek pik intensiteleri gösterirken, lavanta, defne ve ardıç en az şiddette pikler sergilemiştir. Baharatların sınıflandırılması için kümeleme analizi, kemometri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.1.4. Baharatların Spektral Veri Analizi

Spektroskopik yöntemler ile elde edilen spektrum oldukça büyük ve karmaşık bir veri barındırmaktadır. Çoğu zaman spektrumlar kullanılarak örnekler arasında bir sınıflandırma yapmak kolay değildir. Spektrum verileri üzerinden bileşen kompozisyonu tahmin edilebilmekte fakat kantifikasyonu için veri işleme yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla NIR ve LIBS spektrumları kemometrik analiz yöntemleri ile araştırılmıştır.

4.1.4.1. Baharatların NIR Spektrumlarının Veri Analizi

NIR spektrumu esas olarak, büyük bir grup üst ton ve band kompozisyonundan oluşmuştur. Bitkisel materyallerin karmaşık kimyasal kompozisyonu anlaşılması güç NIR spektrumuna sebep olmaktadır [95, 96]. Ek olarak, dalga boyuna bağlı saçılım etkisi, heterojen doku, enstrümantal gürültü, çevresel faktörler ve diğer değişken kaynaklar sebebi ile spektrum daha karmaşık hale gelebilmektedir [91, 95, 96]. Sonuç olarak, spesifik absorpsiyon bandlarını spesifik fonksiyonel gruplar ile ilişkilendirmek güçleşmektedir [91, 96]. Bununla birlikte, NIR spektroskopisi ile çok değişkenli analiz tekniklerinin birlikte uygulanması spektrumların yorumlanması ve analiz edilmesini kolaylaştırmaktadır. Kemometri olarak bilinen çok değişkenli istatistiksel tekniklerin kimyasal veriye uygulanması ile spektrumda gizli olan kompozisyonel özelliklerin bilgisi ortaya çıkmaktadır [88, 90, 148, 149]. Kemometride kullanılan birçok metot olmakla birlikte tez kapsamında PCA ve PLS metotları kullanılmıştır.

Baharatların NIR spektrumları ve uçucu yağlarının GC-MS analizinden elde edilen veriler ile PLS analizi yapılmıştır. Kalibrasyon ve validasyon veri seti tayini için Eigenvector yazılımından faydalanılmış ve Kennard-Stone algoritması

kullanılmıştır [150]. Algoritmaya göre, metot başlangıç olarak en uzak iki veriyi seçmekte, ardından daha önce seçilenleri dikkate alarak en uzak verileri birer birer veri setine seçmektedir. Seçim geride hiç veri kalmayana kadar devam etmektedir. Sonuç olarak, kümelenen noktalar için uniform bir dağılım sağlanmış olmaktadır. Kalibrasyon veri setinden validasyon veri setine ayrılacak olan örnek yüzdesi % 33 olarak belirlenmiştir. Bu durumda 80 örnekten 57'si kalibrasyon veri setinde iken, 27 örnek validasyon veri setindedir. PLS analizi için 'çapraz doğrulama' (cross validation) metodu olarak 'Tek çıkarımlı çapraz doğrulama' (leave one out) kullanılmıştır. Birini dışarda bırakma çapraz doğrulama metodunda, i sayısı kadar örneğin bulunduğu veri setinde, veri seti her seferinde bir örneği dışarda bırakır ve geride kalan $i - 1$ veri seti ile tahmin yapılır. Bu işlem veri setindeki tüm örnekler için sırası ile tekrarlanır. Sonuç olarak i adet hatanın ortalaması kullanılarak tahmin performansı ölçülmektedir [151].

PLS modeli geliştirilirken bazı istatistikî ön işlemlerden faydalanılmıştır. PLS modeli 'normalizasyon' ve 'detrend' ön işlemleri kullanılarak geliştirilmiştir. Spektroskopik uygulamalarda optik yol uzunluğu etkisi (optic path length effect), saçılım etkisi (scattering effect), ışık kaynağı ve dedektör varyasyonlarından bir takım ölçekleme farklılıkları meydana gelmektedir. Temelde, ölçeklendirme etkilerini düzeltmek için dâhili bir standart veya başka bir pseudo-sabit referans değeri kullanılır. Örnek *normalizasyonu* ön işlemi bir örnekten diğerine esasen sabit olması gereken karakteristik temel alınarak tüm değişkenlerin ölçeklenmesinin düzeltilmesi yoluyla her örneğin bazı yönlerini belirleyerek bu tür etkileri düzeltmeye çalışır. Her bir örneğin basit normalizasyonu, çarpımsal ölçeklendirme problemi için ortak bir yaklaşımdır. Tez çalışmasında kullanılan normalizasyon metodu ile verilen örnek için tüm değişkenlerin mutlak değerinin toplamına her bir değişken bölünmüştür (Eş. 4.1.).

$$w_i = \sum_{j=1}^n |x_{i,j}| \quad (4.1.)$$

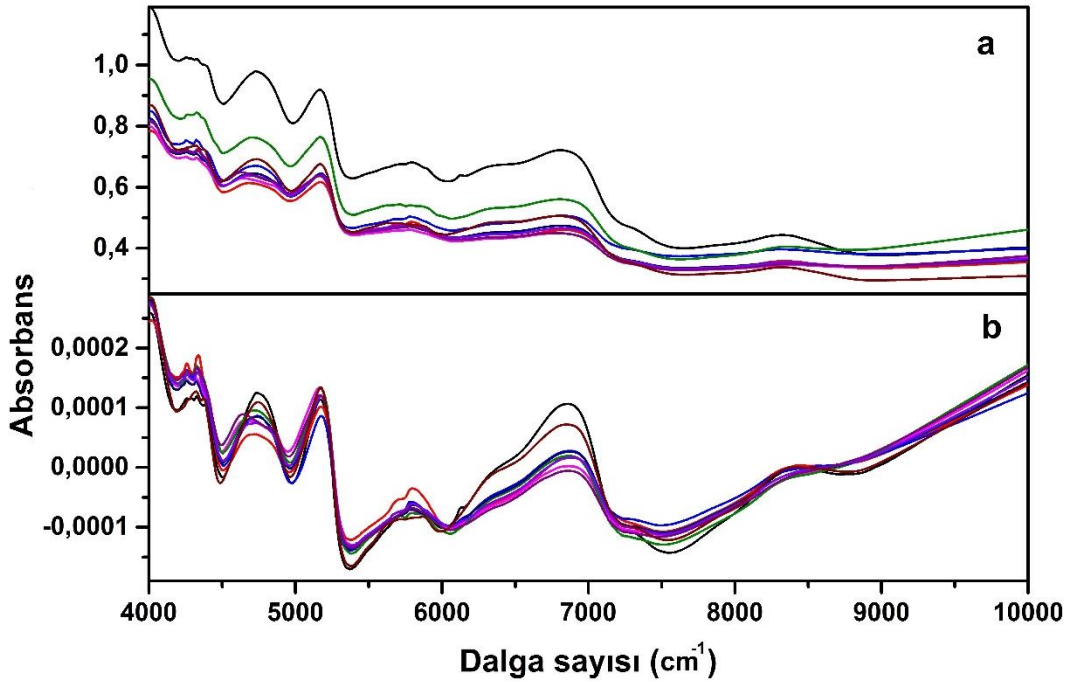
w_i , i örneği için normalizasyon ağırlığı. x_i , verilen örnek için gözlemlenen değerler vektörü. j , değişken sayısı, n , toplam değişken sayısı (x kolonu)

Verilen örnek için hesaplanan ağırlık daha sonra Eş. 4.2.'de normalleştirilmiş örnek hesabı için kullanılmıştır ($\mathbf{x}_{i,norm}$);

$$\mathbf{x}_{i,norm} = \mathbf{x}_i w_i^{-1} \quad (4.2.)$$

Bir diğerk kullanılan ön işlemler olan 'detrend' yöntemi sabit, doğrusal veya kavisli bir ofsetin bulunduğu durumlarda, bu etkileri ortadan kaldırmak için kullanılabilir [152]. Detrend, tüm numuneye verilen bir sıranın polinomuna uyar ve sadece bu polinomu çıkartır. Bu algoritma örnekte yalnızca başlangıç noktalarına uymaz, polinomu tüm noktalara, taban çizgisine ve sinyale uyarlar. Ancak her örnekteki en büyük sinyal kaynağının arka plan etkileşimi olduğunda çalışmaya eğilimlidir. Bu sebeple bu ön işlemler uygulanırken sinyalin kimyasal veya fiziksel uygulamalardan değil, genellikle aynı boyda olan arkaplan sinyalleri tarafından domine edildiğine emin olmak gerekmektedir.

Baharatların NIR spektrumuna uygulanan normalizasyon ve detrend ön işlemleri sonrasında spektrumdaki değişim Şekil 4.4.'de görülmektedir. Şekilde görüldüğü üzere ham spektrumda seçilemeyen farklılaşmalar ön işlemlerden sonra görülür hale gelmiştir.



Şekil 4.4. Geliştirilen PLS modelinde kullanılan baharatların a) ham NIR spektrumları ve b) ön işlemlerden sonra NIR spektrumları

24 adet terpenoidin % konsantrasyon oranı dokuz çeşit baharat için tahmin edilmiştir. Çizelge 4.1.'de modelin istatistiksel verileri gösterilmiştir. Çizelgede görüldüğü üzere determinasyon katsayısı (R^2), kalibrasyon hata kareler ortalamasının karekökü (RMSEC, root mean square error of calibration), tahmin hata kareler ortalamasının karekökü (RMSEP, root mean square error of

prediction), çapraz doğrulama hata kareler ortalamasının karekökü (RMSECV, root mean square error of cross validation) hesaplanmıştır. Buna göre; R² kalibrasyon için 0,984-1,000, validasyon için 0,960-1,000 aralığında hesaplanmıştır.

Oluşturulan PLS modelinin yöntem validasyonu tespit sınırı (LOD, limit of detection) ve kantitatif ölçme sınırları (limit of quantification, LOQ) değerlerinin hesaplanması ile sağlanmıştır (Çizelge 4.1.). LOD ve LOQ değerleri kalibrasyon grafiğinin eğimi ve cevabın standart hatasına göre hesaplanmıştır [153]. En düşük LOD değerine % 0,09 ile karvakrol, en büyük LOD değerine % 3,96 ile linalol tahmininde rastlanmıştır.

Çizelge 4.1. Baharatların NIR spektrumları ile geliştirilen PLS modelinin istatistiksel verileri ve yöntem validasyon değerleri (n=81)

Bileşen	Kalibrasyon R ²	Validasyon R ²	RMSEC	RMSECV	RMSEP	LOD (%)	LOQ (%)	Çalışılan konsantasyon aralığı (%)
α-terpinen	0,991	0,960	0,029	0,110	0,046	0,091	0,276	0,00-1,11
γ-terpinen	0,987	0,963	0,201	0,442	0,237	0,556	1,684	0,00-5,57
limonen	0,995	0,992	0,350	0,977	0,418	1,084	3,284	0,03-18,39
ρ-simen	0,997	0,994	0,077	0,398	0,099	0,230	0,698	0,00-4,12
mirsen	0,999	0,999	0,219	0,788	0,292	0,665	2,014	0,00-38,89
α-pinen	0,999	0,999	0,313	0,773	0,391	0,958	2,902	0,04-43,93
β-pinen	0,998	0,995	0,103	0,250	0,161	0,330	0,999	0,00-9,05
sabinen	0,998	0,992	0,088	1,062	0,171	0,258	0,781	0,00-6,82
karen	0,998	0,998	0,264	0,739	0,331	0,778	2,358	0,00-20,15
kamfen	0,990	0,990	0,072	0,212	0,091	0,238	0,720	0,01-3,34
terpineol	0,995	0,996	0,240	0,847	0,317	0,803	2,432	0,00-16,15
linalol	0,995	0,983	1,272	2,902	1,403	3,956	11,989	0,00-53,77
linalil asetat	0,997	0,995	0,182	0,903	0,205	0,410	1,242	0,00-22,25
borneol	0,986	0,991	0,296	0,909	0,405	0,887	2,688	0,00-10,23
metil öjenol	0,996	0,974	0,257	0,832	0,545	0,625	1,893	0,00-11,62
karvon	1,000	1,000	0,401	2,399	0,667	0,216	0,654	0,00-76,61
kafur	0,996	0,996	0,378	1,713	0,451	0,977	2,962	0,00-22,21
arcurcumen	1,000	0,999	0,221	0,426	0,332	0,536	1,623	0,00-28,05
ökaliptol	0,999	0,996	0,673	5,280	1,605	2,032	6,158	0,00-71,15
timol	0,984	0,974	0,100	0,167	0,113	0,225	0,683	0,00-2,61
karvakrol	0,990	0,982	3,028	7,271	3,458	3,810	11,545	0,00-74,20
estragol	0,996	0,984	1,386	3,845	2,562	3,307	10,022	0,00-69,34
β-karyofillen	0,999	0,992	0,395	1,815	0,723	1,232	3,733	0,00-48,52
zingiberen	0,999	0,999	0,502	1,012	0,637	1,049	3,177	0,00-40,11

Literatür araştırıldığında bitki dokularında bulunan terpenoid miktarlarının spektroskopik yöntemler ve kemometrinin birlikte kullanılarak araştırılmasına

yönelik kapsamlı çalışmalara rastlanmamıştır. Çalışmalara genellikle tek bir tür ile sınırlı kalmış veya gerçek örnek denemeleri yapılmamıştır. Ayrıca NIR çalışmalarında rastlanan kemometrik analizler sonucu düşük tahmin R^2 değerlerine rastlanmıştır. Fesleğen baharatında yapılan bir çalışmada ökaliptol, linalol, estragol, öjenol ve metil öjenol terpenoidleri NIR spektroskopisi kullanılarak araştırılmış ve PLS modeli geliştirilmiştir. Geliştirilen model ile terpenoidler sırasıyla 0,923, 0,967, 0,890, 0,939, 0,951 R^2 değerleri ile tahmin edilmiştir [15]. Genellikle bitkilerde terpenoid tespiti için analiz edilecek bitkilerden uçucu yağ edilerek analizler yürütülmüştür [134].

PCA, verilen örneklerin değişkenleri arasındaki bağımlılık bileşenlerinin ortadan kaldırılması veya boyut indirilmesi için kullanılmaktadır [154]. Değişkenlerin bağımsız olmamaları durumunda istatistiksel analizler oldukça güç olmaktadır. NIR spektrumları incelendiğinde örnekler arası spektral farklar anlamlı bir biçimde gözlemlenmemektedir. PCA algoritması spektral farkları tespit ederek ayrımı bu farklılıklar üzerinden yapmaktadır. Baharatların NIR spektrumlarında spektral farklılıkları öne çıkaracak ön işlemlere ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla, ikinci dereceden türev, ortalama merkez (mean center) ve düzgünleştirme (smoothing) ön işlemleri uygulanmıştır.

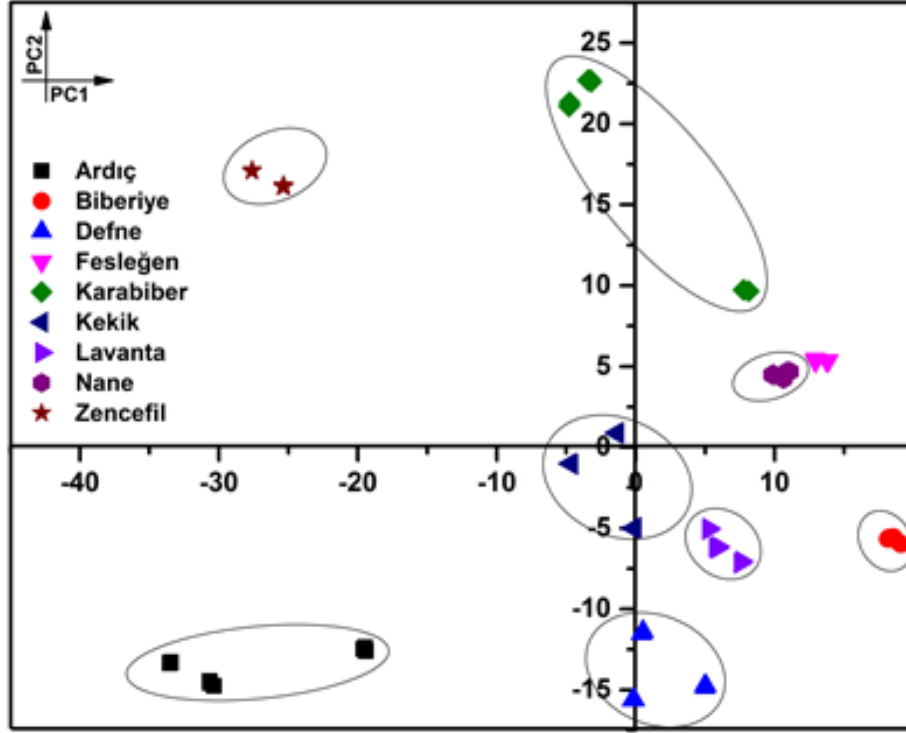
Türev ön işlemi, örnekten gelen önemsiz taban çizgisi (baseline) sinyallerini değişken sayısı veya diğer ilgili eksen ölçeğine ilişkin olarak (dalga boyu, dalga sayısı, vb.) ölçülmüş cevabın türevini alarak ortadan kaldırmak için kullanılmaktadır. Savitzky-Golay algoritması bu PCA modelinde tercih edilmiştir [155]. İkinci dereceden türev, seçiciliği arttırmak için kullanılmıştır.

Ortalama merkez, koordinat sisteminin ekseninin verinin gravite veya ağırlık merkezine dönüştürülmesini sağlamaktadır. Ön işlem her bir kolonun ortalamasını hesaplamakta ve kolondan çıkartmaktadır.

Düzgünleştirme örnekten gelen yüksek frekanslı gürültüleri ortadan kaldıran bir alçak geçiren filtredir (low-pass filter). Düzgünleştirme algoritması veri matrisinin içindeki yan yana değişkenlerin (komşu kolonlar vb.) birbirleri ile ilişkili ve benzer bilgi barındırdığını varsayarak, gürültüyü azaltmak için ilgili sinyalde önemli bir veri kaybı olmaksızın ortalamalarını alır.

PCA modeli oluşturmak için kullanılan veri seti dokuz çeşit baharat türü ve 76 örnek spektrumundan oluşturulmuştur. Geliştirilen model için varyansın % 66,55'ini

açıklayan PC1 ve varyansın % 14,87'sini açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır. Örneklerin NIR spektrumları ile geliştirilen PCA modeli sonucunda elde edilen ayırım Şekil 4.5.'de verilmiştir. Sınıflandırma incelendiğinde baharatlar arası ayırım gözlemlenebilmektedir. Bununla birlikte kemotip ayırımı da karabiber baharatları arasında gözlenmiştir. δ -3-karen/limonen/sabinen ve β -karyofilen kemotipleri birbirlerinden uzakta konumlanmışlardır.



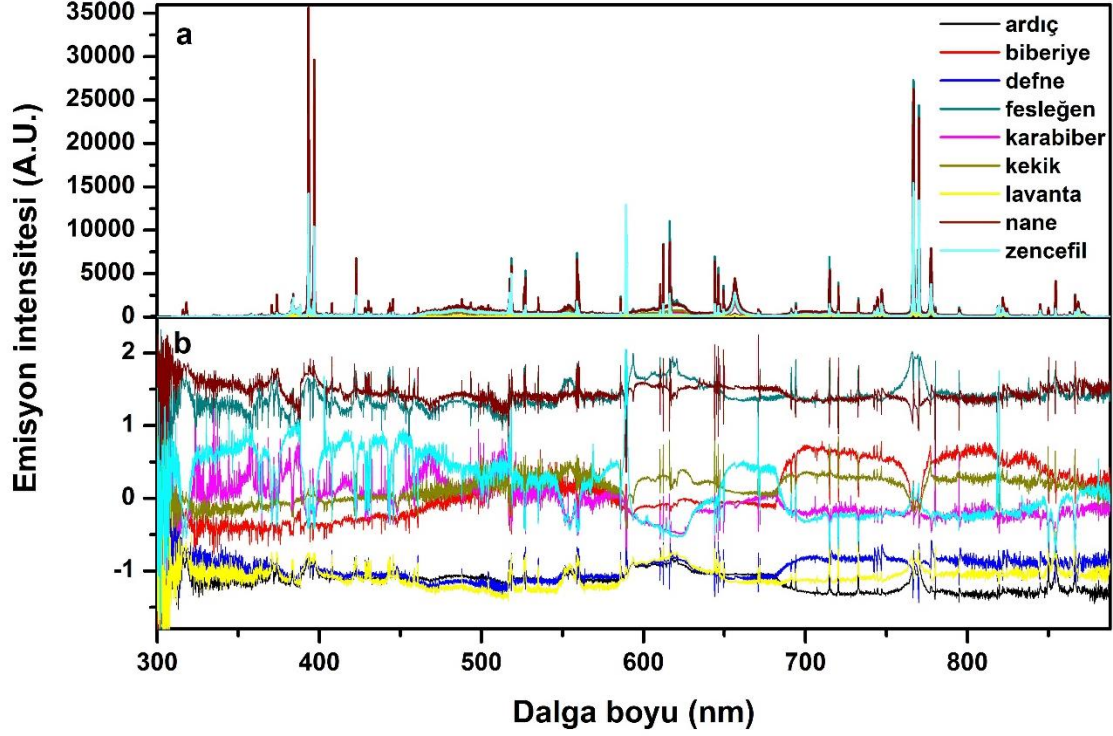
Şekil 4.5. NIR spektrumları kullanılarak geliştirilen PCA modeli dokuz çeşit baharat türünün sınıflandırılması. NIR spektrumları verilerinin PC1/PC2 skorları (n=76)

4.1.4.2. Baharatların LIBS Spektrumlarının Veri Analizi

LIBS analizi ile baharatların mineral kompozisyonları araştırılmıştır. NIST den elde edilen LIBS spektrumu emisyon çizgileri için elemental tayin tez kapsamında tartışılmıştır. Kemometrik analiz metotları LIBS spektrumundan elde edilen spektral veri ile de yapılmıştır.

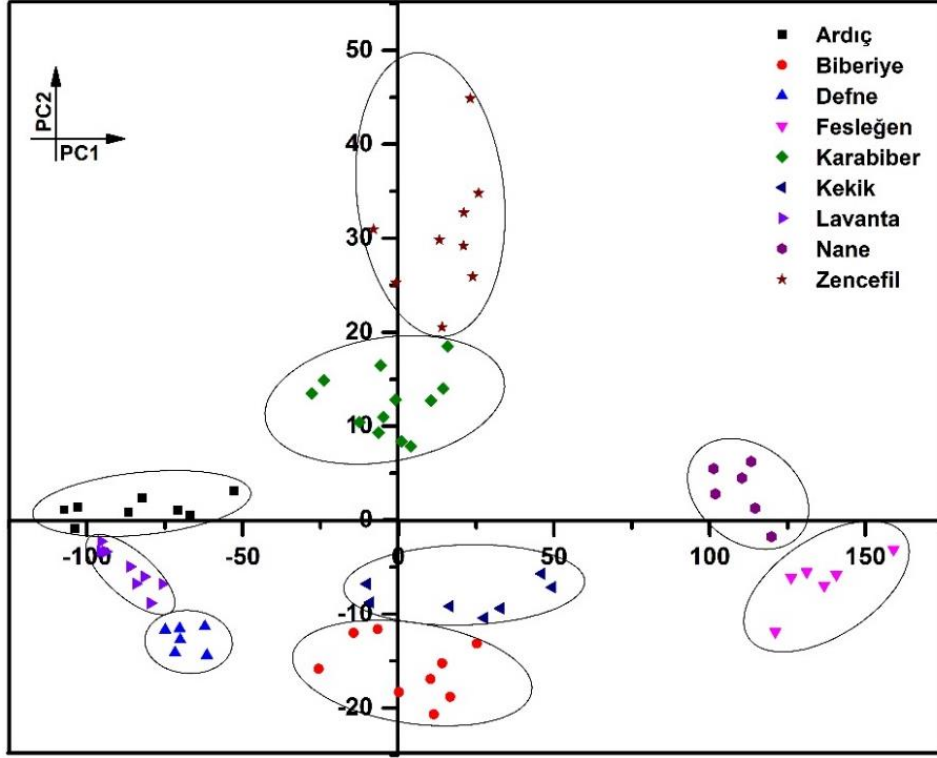
LIBS spektrumları kullanılarak PCA modeli geliştirilmiştir. Baharatların spektrumlarında sinyal şiddeti farkı gözlenmiş bununla birlikte farklı emisyon çizgilerine rastlanmamıştır. PCA algoritmasının spektral farklılıklardan faydalanması sebebi ile baharatları mineral yoğunluklarına göre sınıflandırmış ve bazı baharat gruplarının mineral kompozisyonlarının yakın olması sebebi ile net

ayrım sağlanamamıştır. İleri ön işlemlere ihtiyaç duyulması sonrasında 'sınıf merkez merkezleme ölçekleme' (Class centroid centering scaling) ön işlemi ile baharat gruplarının birbirlerinde daha çok ayrılarak kümelenmesi sağlanmıştır. Şekil 4.6.'de yapılan ön işlem sonrasında baharatların LIBS spektrumlarının modifikasyonu görülmektedir.



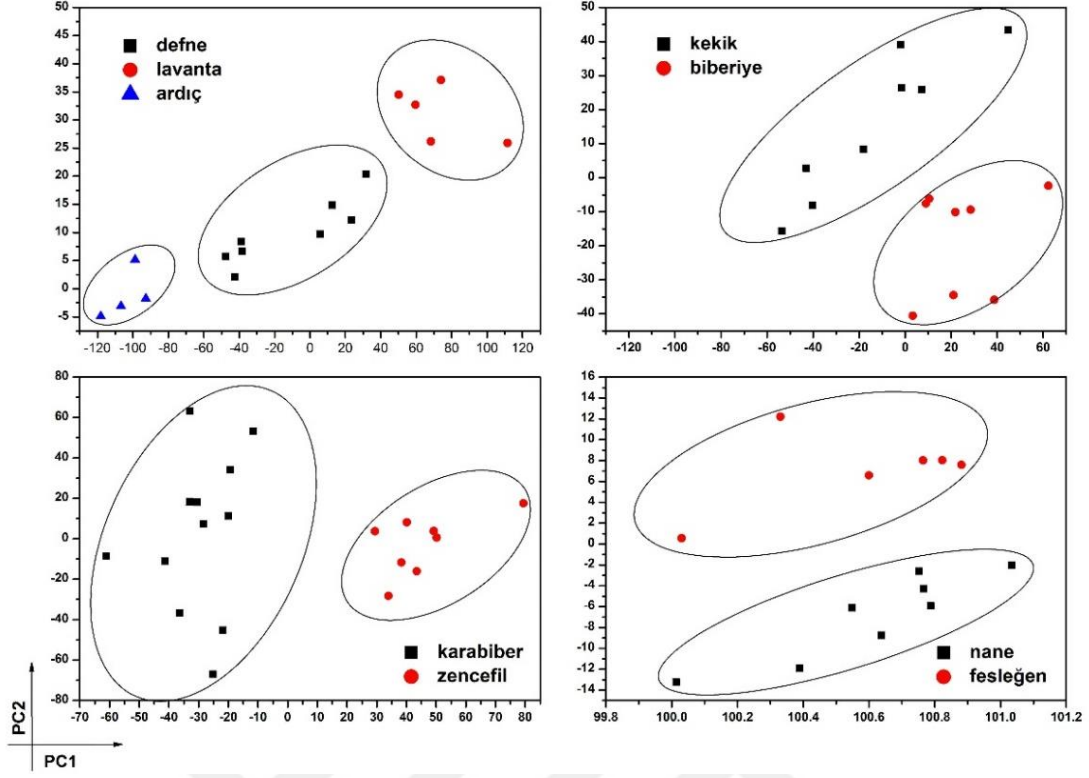
Şekil 4.6. Geliştirilen PCA modelinde kullanılan baharatların a: ham LIBS spektrumları ve b: ön işlemlerden sonra LIBS spektrumları

Geliştirilen PCA modelinin çıktısı olarak dokuz çeşit baharat türünün sınıflandırması Şekil 4.7.'da gösterilmiştir. Geliştirilen model için varyansın % 92,74'ünü açıklayan PC1 ve varyansın % 3,34'ünü açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır. LIBS spektrumları ile geliştirilen PCA modeli spektral veride görülebileceği gibi mineral yoğunlukları yakın olduğu düşünülen grupları kümelemiştir. Bununla birlikte net bir ayrım için daha ileri işlemler yapılmıştır. Buna göre PCA grafiğinde yakın kümeleşme davranışı gösteren kekik-biberiye, karabiber-zencefil, defne-lavanta-ardıç ve nane-lavanta grupları için ayrıca PCA modeli geliştirilmiş ve alt grup kümeleşmesi sağlanmıştır (Şekil 4.8.).



Şekil 4.7. LIBS spektrumları kullanılarak geliştirilen PCA modeli dokuz çeşit baharat türünün sınıflandırılması. LIBS spektrumları verilerinin PC1/PC2 skorları (n=75)

Dört alt grup için ayrıca geliştirilen PCA modellerinde ön işlemlerde değişiklik yapılmamıştır. Defne, lavanta ve ardıç için geliştirilen model için varyansın % 60,57'sini açıklayan PC1 ve varyansın % 8,79'sünü açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır. Kekik ve biberiye için geliştirilen model için varyansın % 37,75'ini açıklayan PC1 ve varyansın % 12,82'sini açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır. Karabiber ve zencefil için geliştirilen model için varyansın % 27,40'ını açıklayan PC1 ve varyansın % 16,58'ini açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır. Nane ve fesleğen için geliştirilen model için varyansın % 98,72'ini açıklayan PC1 ve varyansın % 0,7'sini açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır.



Şekil 4.8. LIBS spektrumları kullanılarak geliştirilen PCA modelleri ile dokuz çeşit baharat türünün dört alt grup halinde sınıflandırılması. LIBS spektrumları verilerinin PC1/PC2 skorları.

Sonuç olarak, baharatlarda LIBS ve NIR spektroskopisi kullanılarak geliştirilen PCA modelleri sayesinde bir ayırım sağlanmıştır. Ayırım baharatların mineral ve terpenoid farklılıkları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LIBS spektroskopisi kullanılarak baharatlara yönelik bir araştırma daha önce yapılmamıştır. Bu çalışma ile baharatların mineral analizlerinin LIBS spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilebileceği bu sayede baharat bitkilerinin yetiştiği toprak ve bitki hakkında hızlı bilgi sağlanabilmesine olanak sağladığı gösterilmiştir. Daha önce LIBS ile bitki çalışmalarında yapılan menşei ve biyosid kalıntısı analizlerinin aynı zamanda çeşnilendirici ve gıda katkı maddesi olarak kullanılan baharatların saha analizlerinde de kullanılabilme potansiyelinin olduğu görülmektedir. Bununla birlikte baharatların saha analizleri için terpenoid miktarlarını tespit edebilecek spektroskopik analiz metotlarına ihtiyaç duyulduğu literatürde görülmüştür. Bitkilerin analizine yönelik olarak yapılan literatür araştırmaları incelendiğinde, aynı türde bitki türleri için kemotip araştırmalarının yapıldığı görülmüş fakat bu kadar farklı bitki türünün konu alındığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dokuz farklı baharat türünde bulunan 24 terpenoid için geliştirilen PLS modeli ile baharatların

saha analizleri için hızlı bir analiz metodu sunulmuştur. Bu çalışma ile baharatların değişen terpenoid miktarları doğrultusunda taşıması ve depolama süresi hakkında bilgi verebilecek bir model geliştirilebileceği ve saha analizlerinde etkin olarak uygulanabileceği gösterilmiştir.

4.2. Uçucu Yağların Analizi

Bu bölümde dokuz aromatik bitki türünden hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilen ve yine hidrodistilasyon yöntemi ile üretilip ticari olarak satışı yapılan uçucu yağların kromatografik ve spektroskopik yöntemler kullanılarak yürütülen analizlerinin çıktıklarına yer verilmiştir. Ayrıca spektral veri kemometrik yöntemler ile işlenmiş uçucu yağların sınıflandırılması ve 24 çeşit terpenoidin kantifikasyonu ve validasyonu yapılmıştır.

4.2.1. Uçucu Yağların GC-MS Analizi

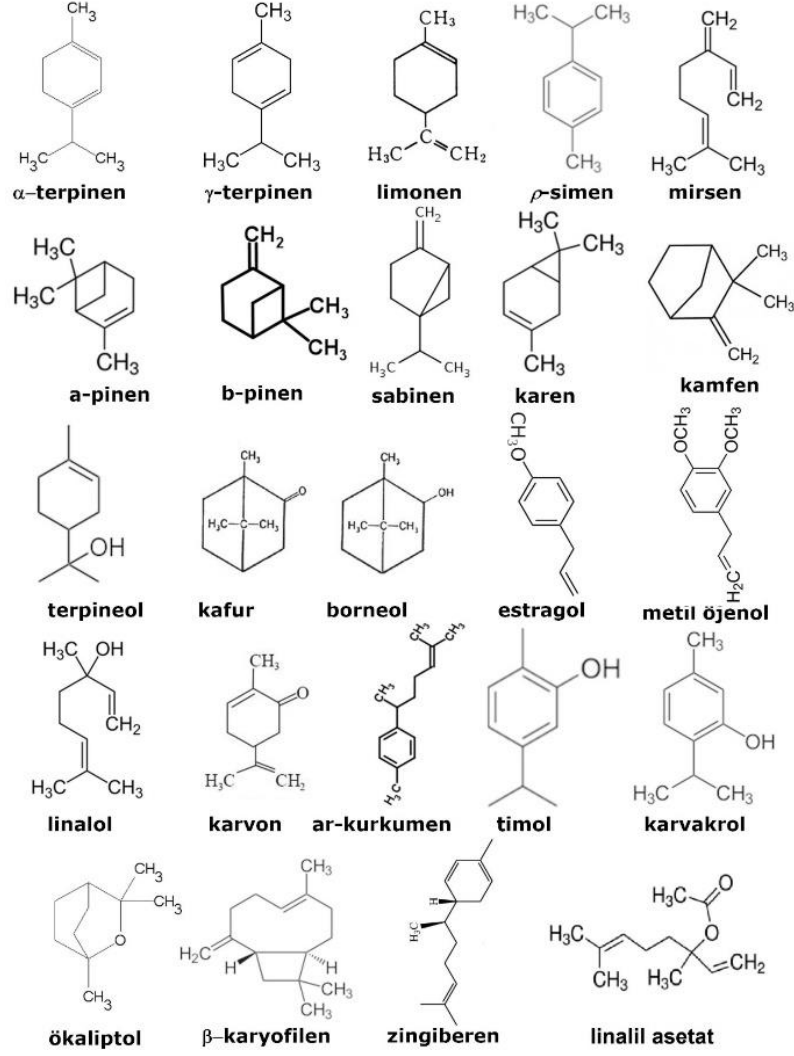
Uçucu yağlar, terpenoidler ve terpenoid olmayan hidrokarbonlar ve onların oksijenli türevleri olan uçucu bileşenleri içermektedir. Bununla birlikte bazıları nitrojen ve sülfür türevlerini de ihtiva etmektedir [12-14]. Uçucu yağ bileşenleri alkoller, aldehitler, esterler, ketonlar, asitler gibi farklı formlarda bulunmaktadır. Temel olarak bileşenler oksijenli türevleri de dâhil olmak üzere monoterpenler, seskiterpenler ve diterpenler şeklinde gruplanmaktadır [1-4,10]. Ek olarak, fenilpropanoidler, yağ asitleri ve esterleri veya yıkılma ürünleri de uçucu bileşenler olarak uçucu yağ kompozisyonuna dâhil olmaktadır [1,2,15-17]. Uçucu yağlar kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından tamamıyla farklı olan, yağ ve yağ benzeri maddeleri içeren ve uçucu olmayan sabit yağlar ile karıştırılmamalıdır. Filtre kâğıdında uçucu yağlar tamamen uçarken, sabit yağlar ısıtılsa dahi uçmayan kalıcı leke bırakmaktadır [2].

GC-MS, uçucu yağların ayrılması için en önemli ve yaygın teknikler arasındadır. Bileşenlerin ayrılması, analitlerin polaritesine ve uçuculuğuna bağlıdır. GC prensibi çözünen maddelerin mobil ve durağan faz arasındaki diferansiyel bölümlenmesine dayanmaktadır. Oldukça basit, güvenilir bir yöntem olup, 350-400°C'ye kadar olan sıcaklıkta kararlı olan uçucu maddelerin ayrılması için uygulanabilmektedir. Numune veya karışım uçucu değilse, numunenin uçucu hale getirilmesi için uygun bir şekilde türevlendirilmesi gerekmektedir.

Tez kapsamında 24 terpenoid değerlendirilmiştir. GC-MS analizleri sonucu laboratuvarında distile edilen uçucu yağlar ve ticari örneklerin bileşiminin tamamını

aydınlatsa da tez kapsamında 24 terpenoidin değerlendirilmesine yer verilmiştir (Şekil 4.9.). Bu terpenoidler her bir uçucu yağ çeşidi içinde majör olan terpenoidlerden seçilmiş olup laboratuvarda üretimi distile edilen örneklerin bileşiminde bulunan oranları Çizelge 4.2.'de ve ticari örneklerin bileşimde bulunan oranları Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Çizelgede alıkonma indeksi RI ile gösterilmiştir. Ardıç meyvesi uçucu yağları taze balzamik, çam kokusuna benzer bir aromaya sahiptir ve genellikle parfümeri, losyon, baharat karışımları ve farmasötik ihzaratlarda kullanılmaktadır. Daha iyi çözünmesi sebebi ile aromalarda seskiterpensiz yağları kullanılmaktadır [156]. Ardıç uçucu yağları temel olarak, mono- ve sekiterpen hidrokarbonları içermekle birlikte minör fakat oldukça önemli olan terpeinen-4-ol, α -terpineol, borneol ve geraniol gibi terpen alkollerini de ihtiva etmektedir. Ticari olarak satılan ardıç uçucu yağlarında distilasyona sıklıkla fermente meyveler, ardıcın odunsu kısımları ve dalları dâhil edilmektedir. Bununla birlikte, terebentin gibi daha ucuz uçucu yağlar da eklenebilmektedir [156]. Farklı kaynaklardan temin edilmiş kurutulmuş ardıç meyvesinin laboratuvarda distile edilen uçucu yağları ile ticari ardıç yağlarının GC-MS analizi sonuçları değerlendirildiğinde terpenoid kompozisyonunda belirgin farklılık görülmektedir. Öncelikle majör bileşenlerinden olan α -pinen laboratuvarda distile edilen uçucu yağlarda % 33,81-43,93 oranında iken, ticari örneklerde % 51,98-90,46 oranlarında çıkmıştır.

Bununla birlikte % 1'in üzerinde bulunan diğer terpenoid oranları karşılaştırıldığında; mirsen, limonen, β -pinen laboratuvarda distile edilen uçucu yağlarda sırası ile % 8,01-38,89, % 5,86-9,02, % 1,38-1,85 oranlarında iken ticarilerde sırası ile % 0,04-1,04, % 0,39-0,62, % 0,51-0,77 oranlarında bulunmuştur. Laboratuvar ortamında distile edilmiş örnekler ile ticari örneklerin kompozisyonu arasındaki bu durum literatür ile karşılaştırıldığında beklenildiği gibidir [156]. Ticari örneklerde yüksek oranda α -pinen rastlanırken mirsen, limonen ve β -pinen % 1'in altında görülmektedir. Ayrıca ticari örneklerde % 0,07-1,56 oranlarında dietil ftalata (DEP) rastlanmıştır.



Şekil 4.9. Değerlendirilen yirmidört terpenoidin kimyasal yapıları

Lavanta uçucu yağları taze, tatlı, çiçeksi bir kokuya sahip olup genellikle kullanıldığı parfüm, kolonya, gibi kozmetik ürünlerin yanısıra farmasötik ihzaratlarda da kullanılmaktadır. Linalil asetat ve linalol terpenoidleri majör bileşenleri olup, terpen hidrokarbonlar, alkoller, esterler, alifatik keton ve alkoller minör bileşenleridir. Ticari ürünler genellikle lavandin yağı, ada çayı, ökaliptus yağı gibi ucuz yağlar, sentetik linalol, linalil asetat veya plastikleştiriciler ile dilüe edilmektedir [156]. Laboratuvarda distile edilen uçucu yağlarda % 51,07-53,77 linalool, % 11,19-22,25 linalil asetat bulunmuştur. Bununla birlikte, % 3,05-5,49 α-terpineol, % 3,30-6,80 kafur, % 2,45-3,90 ökaliptol, % 2,92-4,51 oranında da borneol tespit edilmiştir. Ticari örneklerin GC-MS analiz sonuçları dikkat çekici olmuştur. % 20,90-22,00 linalil asetat, %10,30-11,20 oranlarında linalol tespit

edilirken % 52,00-53,73 oranında plastikleştirici olarak losyonlarda kullanılan dipropilen glikol (DPG) bulunmuştur.

Nane uçucu yağları, dünya çapında en çok ticareti yapılan uçucu yağ olması sebebi ile taşıdığı en çok yapılan uçucu yağdır. Genellikle farklı kemotiplerinin üretimi yapılmaktadır. Bazı kemotipleri % 40 mentol, % 5-10 metil asetat, % 15-30 menton içerirken, daha verimli karvon kemotipi % 60-80 oranında karvon, % 8-20 oranında limonen % 1-2 aralığında da ökaliptol, 3-oktanol ve menton içerdiği bildirilmiştir [156]. Genellikle diş macunları ve diğer diş bakım ürünleri, sakız, kozmetik, aroma ve farmasötik ihrazatlarda kullanılmaktadır [156]. Kurutulmuş nane yapraklarından laboratuvarında distile edilen uçucu yağlarda % 75,22-76,61 oranında karvon, % 4,84-5,69 ökaliptol, % 3,75-4,02 β -karyofillen, % 4,64-5,70 limonen tespit edilmiştir. Ticari örneklerde ise % 44,02-56,79 mentol ve % 28,39-38,37 oranında da menton bulunmuştur. GC-MS sonuçları doğrultusunda laboratuvarında uçucu yağı distile edilen nanelerin karvon kemotip olduğu, ticari örneklerin ise mentol kemotip olduğu yorumu yapılmıştır. Ticari nane örneklerinin birinde % 0,15 oranında DEP tespit edilmiştir.

Kekik uçucu yağı genellikle gıda aromalarında, farmasötik ihrazatlarda, diş bakım ürünlerinde ve dezenfektanlarda kullanılmaktadır [156]. Bileşen kompozisyonunu, büyük oranda timol ve karvakrol bileşikleri oluştururken, ρ -simen, kamfen, limonen diğer önemli bileşikleridir. Ayrıca ökaliptol, borneol, bornil asetat, kafur, linalol ve karyofillen de minör miktarlarda bulunmaktadır. Kurutulmuş kekik yapraklarından distilasyon yolu ile laboratuvarında üretimi yapılan kekik uçucu yağlarında, % 67,76-74,20 oranında karvakrol, % 1,44-2,61 timol, % 3,38-6,55 linalol, % 1,87-4,12 ρ -simen, % 2,87-5,57 oranında da α -terpinen tespit edilmiştir. Ticari kekik örneklerinde ise bu bileşen oranları sırası ile % 40,54-56,91 karvakrol, % 0,52-34,99 linalool, % 4,05-11,54 timol, % 2,84-12,28 ρ -simen, % 0,26-2,11 α -terpinen, % 1,94-4,78 estragol olarak saptanmıştır. Ayrıca % 0,02-0,09 oranlarında DEP'a rastlanmıştır. Analiz edilen tüm kekik uçucu yağı örneklerinin karvakrol kemotipi olduğu yorumu yapılmıştır [157].

Çizelge 4.2. Üretimi yapılan uçucu yağlardaki 24 adet terpenoidin konsantrasyon oranları

	Konsantrasyon oranı (%)									
	RI	Ardıç Üretim	Biberiye Üretim	Defne Üretim	Fesleğen Üretim	Karabiber Üretim	Kekik Üretim	Lavanta Üretim	Nane Üretim	Zencefil Üretim
α -terpinen	1173	0,10-0,20	0,22-0,25	0,27-0,49	0,03-0,15	0,04-0,15	0,63-1,11	0,01-0,02	0,05-0,05	0,00-0,07
γ -terpinen	1234	0,14-0,30	0,06-0,10	0,50-0,83	0,05-0,26	0,09-0,26	2,87-5,57	0,02-0,06	0,09-0,10	0,00-0,03
limonen	1192	5,86-9,02	1,48-4,20	0,42-1,09	0,19-1,67	3,72-18,39	0,08-0,17	0,32-0,38	4,64-5,7	0,03-0,26
ρ -simen	1266	0,24-0,85	2,26-3,03	0,86-1,94	0,00-0,05	0,12-1,85	1,87-4,12	-	0,01-0,03	0,00-0,02
mirsen	1163	8,01-38,89	0,83-1,23	0,04-0,47	0,00-0,12	-	0,49-0,92	0,50-0,69	0,09-0,17	-
α -pinen	1014	33,81-43,93	8,90-15,19	2,88-3,91	0,23-0,35	1,27-7,52	0,25-0,37	0,05-0,10	0,33-0,46	0,04-0,21
β -pinen	1095	1,38-1,85	0,18-0,35	2,26-2,83	0,30-0,38	2,79-9,05	0,05-0,08	0,05-0,08	0,49-0,57	0,00-0,07
sabinen	1111	0,05-0,12	-	2,46-6,82	0,11-0,16	0,15-4,08	0,00-0,01	0,02-0,02	0,22-0,29	0,00-0,01
karen	1143	-	-	-	-	1,58-20,15	0,03-0,05	-	-	0,00-0,17
kamfen	1054	0,21-0,46	2,10-3,34	0,10-0,17	0,03-0,04	0,03-0,15	0,08-0,10	0,13-0,16	0,01-0,01	0,05-0,44
α -terpineol	1695	0,65-2,18	1,90-3,83	6,52-16,15	0,31-0,53	-	0,23-0,37	3,05-5,49	0,96-1,04	0,37-0,52
linalol	1538	0,43-0,63	0,39-4,07	0,11-0,80	4,17-15,29	0,00-0,37	3,38-6,55	51,07-53,77	0,15-0,20	0,16-0,21
linalil asetat	1556	-	-	-	0,00-0,05	-	-	11,19-22,25	-	-
borneol	1702	0,09-0,15	5,08-10,23	-	0,06-0,13	-	0,90-1,39	2,92-4,51	-	0,57-1,12
metil öjenol	2009	-	-	-	6,75-11,62	-	0,03-0,08	-	-	-
karvon	1745	0,03-0,20	0,00-0,12	-	0,06-0,45	-	0,25-1,75	-	75,22-76,61	-
kafur	1524	0,05-0,28	8,40-22,21	-	0,19-0,26	0,00-0,03	-	3,30-6,80	-	0,03-0,04
arcurcumen	1777	-	-	-	-	-	-	-	-	25,84-28,05
ökaliptol	1198	-	15,42-59,87	56,26-71,15	4,32-5,13	-	-	2,45-3,90	4,84-5,69	-
timol	2170	-	-	-	-	-	1,44-2,61	-	-	-
karvakrol	2202	-	-	-	-	-	67,76-74,20	-	-	-
estragol	1677	-	-	-	43,89-69,34	-	-	-	-	-
β -karyofilen	1603	0,00-3,69	-	-	1,24-2,54	25,64-48,52	0,00-3,37	0,15-0,30	3,75-4,02	0,10-0,24
zingiberen	1719	-	-	-	-	-	-	-	-	36,56-40,11
mentol	1598	-	-	-	-	-	-	-	-	-
menton	2093	-	-	-	-	-	-	-	-	-
benzil alkol	1874	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dietil ftalat	2346	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dipropilen glikol	1826	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.3. Ticari uçucu yağlardaki 24 adet terpenoidin konsantrasyon oranları

	Konsantrasyon oranı (%)									
	RI	Ardıç Ticari	Biberiye Ticari	Defne Ticari	Fesleğen Ticari	Karabiber Ticari	Kekik Ticari	Lavanta Ticari	Nane Ticari	Zencefil Ticari
α -terpinen	1173	-	0.17-0.25	0.11-0.41	-	-	0.26-2.11	0.06-0.06	-	-
γ -terpinen	1234	0.00-0.44	0.51-0.74	0.18-0.84	-	0.00-0.31	2.46-6.12	0.07-0.07	0.00-0.01	-
limonen	1192	0.39-0.62	2.17-4.89	0.85-1.11	0.28-0.28	1.48-3.28	0.15-0.34	2.31-2.31	0.05-0.10	0.56-0.61
ρ -simen	1266	0.32-1.77	2.41-4.20	0.57-1.91	0.3-0.3	000-0.54	2.84-12.28	0.12-0.12	0.00-0.07	0.00-1.02
mirsen	1163	0.04-1.04	0.54-1.59	0.46-0.62	0.09-0.09	-	0.20-1.55	0.04-0.04	-	-
α -pinen	1014	51.98-90.46	19.17-21.44	5.03-65.21	0.37-0.37	0.00-2.92	0.27-1.00	-	0.00-0.22	0.92-1.14
β -pinen	1095	0.51-0.77	2.31-4.49	1.34-3.42	0.52-0.52	0.44-2.72	0.07-0.14	-	-	0.18-0.70
sabinen	1111	-	0.00-0.03	2.51-4.15	0.20-0.20	0.19-1.49	-	-	-	-
karen	1143	-	0.00-0.31	0.02-0.12	-	0.14-2.70	0.00-0.10	-	-	-
kamfen	1054	0.20-0.48	3.82-7.01	0.18-0.54	0.09-0.09	-	0.08-0.38	0.79-0.79	-	3.10-4.01
α -terpineol	1695	-	0.00-5.27	0.00-6.60	0.34-0.34	0.00-0.13	0.19-0.25	0.63-0.63	0.60-0.62	-
linalol	1538	-	0.70-1.39	0.16-0.63	5.54-5.54	0.13-0.94	0.52-34.99	10.31-10.31	0.00-0.19	-
linalil asetat	1556	-	-	-	-	-	-	20.9-20.96	-	-
borneol	1702	0.05-0.07	1.44-17.12	-	0.08-0.08	-	0.45-1.40	0.28-0.28	-	0.00-0.41
metil öjenol	2009	-	-	-	0.68-0.68	0.00-0.10	-	-	-	-
karvon	1745	-	-	-	0.01-0.01	-	0.03-0.12	-	-	-
kafur	1524	0.08-0.44	3.66-21.31	0.00-0.07	0.67-0.67	0.00-0.10	0.02-0.05	0.71-0.71	-	-
arcurcumen	1777	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00-6.96
ökaliptol	1198	-	22.43-26.80	19.89-55.24	5.68-5.68	0.00-0.98	0.00-0.12	0.79-0.79	0.00-0.16	-
timol	2170	-	-	-	-	-	4.05-11.54	-	-	-
karvakrol	2202	-	-	-	0.32-0.32	-	40.54-56.91	-	-	1.11-19.38
estragol	1677	-	0.00-0.07	-	71.92-71.92	-	1.94-4.78	-	-	-
β -karyofilen	1603	-	0.73-1.49	-	-	8.76-11.97	-	0.36-0.36	0.11-0.67	-
zingiberen	1719	-	-	-	-	-	-	-	-	12.08-19.31
mentol	1598	-	-	-	-	-	-	-	44.02-56.79	0.00-5.75
menton	2093	-	-	-	-	-	-	-	28.39-38.37	0.00-5.56
benzil alkol	1874	-	-	-	-	0.00-50.05	-	-	-	-
dietil fitalat	2346	0.07-1.56	0.00-0.68	0.04-0.51	0.12-0.12	0.00-8.60	0.02-0.09	-	0.00-0.15	1.80-2.97
dipropilen glikol	1826	-	0.08-0.21	0.00-0.10	-	0.00-0.75	-	53.00-53.73	-	-

Biberiye uçucu yağları % 25'in üzerinde ökaliptol içeren güçlü, taze, kafur-benzeri aroması ile kozmetikte, parfümeride, aroma bileşenlerinde, dezenfektanlarda kullanılmaktadır. İhtiva ettiği diğer terpenoidler ökaliptol, kafur, bornil asetat ve yüksek oranda monoterpenik hidrokarbonlardır. Çoğunlukla, ökaliptus yağı, kafur yağı, terebentin yağı ile tağışış edilmektedir [156]. Laboratuvarda distilasyonu yapılan kurutulmuş biberiye iğne yapraklarının bileşen kompozisyonu % 15,42-59,87 ökaliptol, % 8,40-22,21 kafur, % 8,90-15,19 α -pinen, % 5,08-10,23 borneol, % 2,10-3,34 kamfen, % 2,26-3,03 ρ -simen tespit edilmiştir. Ticari örneklerin GC-MS analizi sonucunda % 22,43-26,80 ökaliptol, % 19,17-21,44 α -pinen, % 3,66-21,31 kafur, % 1,44-17,12 borneol, % 3,82-7,01 kamfen, % 2,31-4,49 β -pinen, % 2,41-4,20 ρ -simen, % 2,17-4,89 limonen bulunmuştur. Bununla birlikte % 0,00-0,68 oranlarında DEP ve % 0,21-0,08 oranlarında DPG saptanmıştır.

Olgunlaşmamış karabiber ağacının meyvelerinin kurutulması ile elde edilen karabiber tanelerinin distilasyonu ile elde edilen uçucu yağlar acı, keskin bir aromaya sahip olup renksizden çok açık maviye dönen bir renge sahiptir. Uçucu yağ fraksiyonu % 30-70 oranında α - ve β -pinen, limonen, sabinen, mirsen, α -fellandren ve δ -3-karen gibi monoterpen hidrokarbonlar tarafından domine edilmiştir. α - ve β -karyofillen ve β -farnesen gibi seskiterpenler toplam uçucu yağ bileşiminin % 25-45'ini oluşturmaktadır. Bununla birlikte terpenoid bileşiminin coğrafi konuma, iklim ve olgunlaşma evresine göre değişiklik gösterdiği bildirilmiştir [134]. Laboratuvarda hidrodistilasyon yöntemi elde edilen karabiber uçucu yağlarının kompozisyonu iki kemotip ile çalışıldığı için değişiklik göstermektedir [134]. δ -3-karen/karyofillen/limonen kemotipinde; karyofillen % 25,64-32,71, δ -3-karen % 20,00-20,15, sabinen % 0,15-4,08, β -pinen % 7,20-9,05, α -pinen % 5,22-7,52, limonen % 12,59-18,39, saptanmışken, karyofillen kemotipinde; karyofillen % 48,52-57,29, δ -3-karen % 1,58-5,81, sabinen % 0,10-1,52, β -pinen % 2,01-2,79, α -pinen % 0,98-1,27, limonen % 3,72-4,98 oranlarında tespit edilmiştir. Ticari örneklerin GC-MS sonuçları değerlendirildiğinde ise bir markada % 50 oranda benzil alkol tespit edilmiştir. Başka bir markada ise % 8,60 oranında dietil ftalat ve % 0,75 oranında dipropilen tespit edilmiştir. Diğer terpenoid oranları ise, β -karyofillen % 8,76-11,97, limonen bileşimi % 1,48-3,28, α -pinen %

0-2,92, β -pinen % 0,44-2,72 arasında tespit edilmiştir. GC-MS sonuçları karabiber uçucu yağlarının seyreltindiğini göstermiştir.

Fesleğen uçucu yağları bazı fesleğen kemotiplerinden üretilmektedir. Genellikle estragol oranı yüksek kemotipler tercih edilmektedir [15]. Laboratuvarında distile edilen kurutulmuş fesleğen yapraklarının uçucu yağları % 43,89-69,34 oranında içerdiği estragol oranı ile domine olmuştur. Bununla birlikte % 4,17-15,29 oranında linalol, % 4,32-5,13 ökaliptol, % 1,24-2,54 β -karyofillen, % 0,19-1,67 oranında limonen içermektedir. Distile edilen bu uçucu yağların kimyasal kompozisyonu değerlendirildiğinde estragol kemotip uçucu yağlar olduğu yorumu yapılmıştır. Ticari olarak satışı yapılan fesleğen uçucu yağlar da benzer şekilde estragol kemotip olarak tespit edilmiştir. Ticari uçucu yağların bileşimleri ise şöyledir; % 68,80-71,92 estragol, % 5,68-6,70 ökaliptol, % 5,54-5,70 linalol. Bununla birlikte ticari örneklerin bileşiminde % 0,12 oranında dietil ftalata rastlanmıştır. Estragol ve metil öjanolün genotoksik ve karsinogenik etkileri bilinmektedir. Avrupa konseyinin metil öjanol ve estragol için tespit limitleri mevcuttur. Metil öjanol için bu değer 0 iken, estragol için gıda ürünlerinde 0,05 mg/kg olarak belirlenmiştir [15].

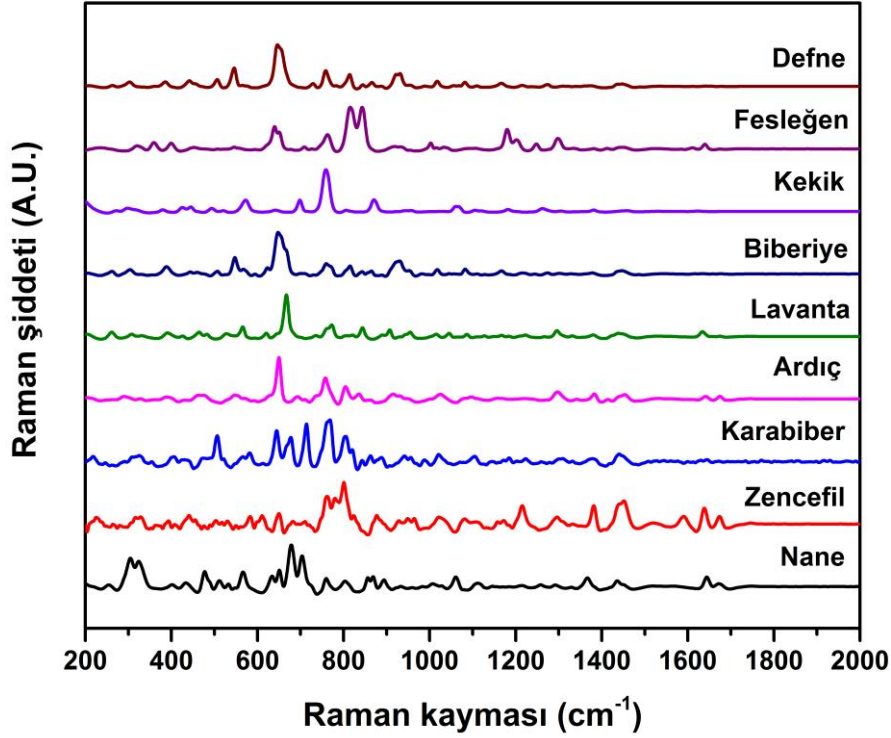
Zencefil uçucu yağlarının gıda aromalarında ve koruyucularında (hardal yağı) ve farmasötik ihrazatlarda kullanıldığı literatürde bildirilmiştir [158]. Zencefil uçucu yağ bileşimi monoterpen hidrokarbonlar, seskiterpen hidrokarbonlar, ve oksijenli monoterpenlerden oluşmuştur. Oksijenli monoterpenler minör bulursa da asıl aroma karakteridir [158]. Zencefilin terpenoid bileşimi % 31,79-53,12 oranlarında zingiberen içeriği ile domine edildiği, diğer majör bileşenin de % 4,45-15,88 oranlarında bulunan ar-curcumen olduğu görülmüştür. Ayrıca % 3,10-4,01 oranında kamfen tespit edilmiştir [158, 159]. Ticari örnekler incelendiğinde bileşim kompozisyonun zingiberen % 12,08-19,31, ar-curcumen % 0,00-6,96, kamfen % 3,10-4,01, karvakrol % 1,11-19,38 oranlarında olduğu tespit edilmiş ayrıca % 1,80-2,97 oranında da DEP bileşiğine rastlanmıştır.

Ticari uçucu yağların tamamı değerlendirildiğinde ticari nane örneklerinden biri dışında hepsinin bileşiminde yabancı maddeye rastlanmıştır.

4.2.2. Uçucu yağların Raman Spektrumu Analizi

Çalışılan uçucu yağ örneklerine ait Raman spektrumları arasındaki farklar ve özellikleri açıklamak için dokuz çeşit uçucu yağın ortalama Raman spektrumları Şekil 4.10.'da verilmiştir. Görselde dokuz çeşit yağın ortalama Raman spektrumları

yatay eksen temel alınarak (baseline corrected) düzeltilmiş ve maksimum pike normalize edilmiştir.



Şekil 4.10. Dokuz çeşit baharat türünün Raman spektrumları

Normalizasyon işlemi dokuz örnek için gözlemlenen tüm değişkenlerin maksimum değerine yapılmıştır. Ölçeklemede Sadece en büyük değer bulunduğ ağırlıklı normalizasyon dikkate alınmıştır (Eş 4.3.).

$$w_i = \max(x_i) \quad (4.3.)$$

w_i örnek için normalizasyon ağırlığı, x_i verilen örnek için gözlenen değer vektörü simgelemektedir. Eş. 4.4. verilen denklemde her bir örnek için hesaplanan ağırlık normalize örneği hesaplamak için kullanılmıştır;

$$x_{i,norm} = x_i w_i^{-1} \quad (4.4.)$$

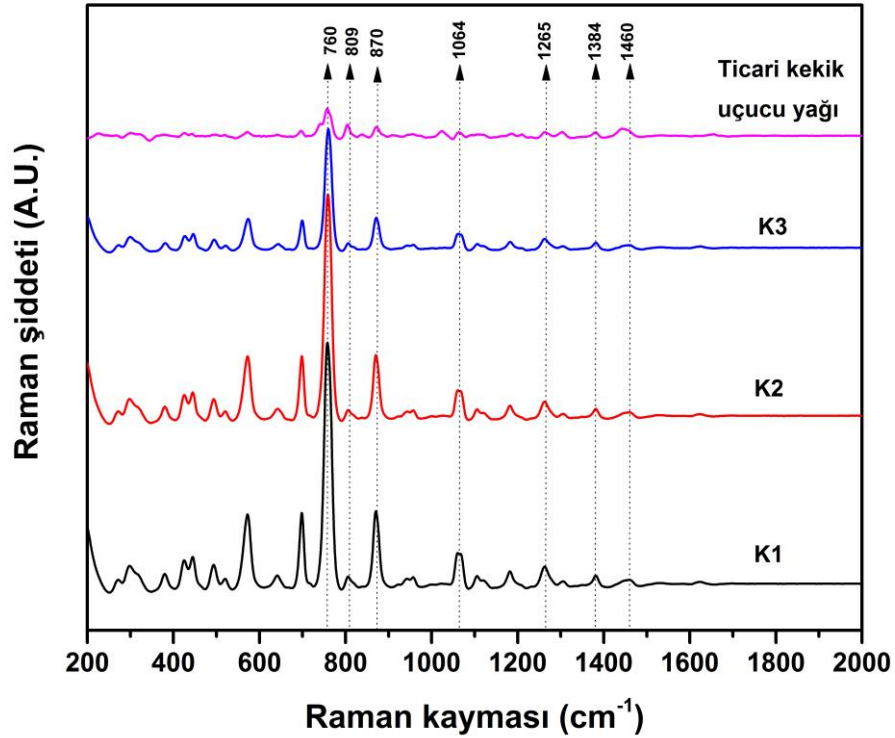
Raman spektrumu, analiz edilen materyalin kompozisyonundan türetildiği için, spektrumdaki hatlardan (band) elde edilen bilgiler yağların tanımlanması ve sınıflandırılması için kullanılmıştır. Ardıç, biberiye, defne, fesleğen, karabiber, kekik, lavanta, nane ve zencefil uçucu yağları bu çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Uçucu yağların kompozisyonuna GC-MS analiz sonuçlarına ait çizelgelerde yer verilmiştir (Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.). Uçucu yağ bileşimi

incelendiğinde terpenik maddeler, aromatik bileşikler, düz zincirli hidrokarbonlar, azot ve kükürt taşıyan bileşiklerden oluştuğu görülmekle birlikte terpenoidler uçucu yağ bileşimindeki en önemli bileşenlerdir. Uçucu yağların % 90'ı terpenik bileşiklerden oluşmuştur. Uçucu yağların kendine özgü aroma ve terapik özelliklerini veren oksijenli türevler, terpenlerin oksitlenme reaksiyonları sonucu oluşmaktadır. Uçucu yağ bitkileri araştırılırken bu oksijenli bileşikler dikkate alınmaktadır [160]. Bu sebeple, terpenlerin kimyasal karakteristiklerinin uçucu yağların Raman spektrumunda açıklanması beklenmektedir. Bununla birlikte, ikincil bileşenlerin Raman bandları, uçucu yağ profilinde oldukça küçük konsantrasyonlara sahip olması sebebiyle düşük sinyal vermesi, daha büyük sinyaller ile örtüşmesi veya arka plandan (background) ayırt edilememesi sonucunda Raman spektrumunda minimum etki göstereceği veya etki göstermeyeceği beklenmektedir.

Uçucu yağların Raman spektrumlarında gözlenen karakteristik bandlar detaylı incelenmiştir. Benzer dalga sayılarında gözlemlenen bandlar daha önceki Raman spektroskopisi çalışmalarında tayin edilmiştir. Bununla birlikte, kullanılan enstrüman hassasiyet ve doğruluğu dikkate alınarak bu çalışmada band tayini yapılmıştır. Sabit bitkisel yağların Raman spektrumlarındaki varyasyonlar benzerlik gösterirken [131] uçucu yağlarda spektrum profili oldukça farklılık göstermektedir. Uçucu yağ bitkilerindeki farklı terpenik madde profili sebebi ile Raman spektrumlarında belirgin bandlarda ayırım gözlemlenebilmektedir.

Her bir türü için üç farklı kaynaktan temin edilmiş kekik baharatından (K1, K2, K3) üretilen uçucu kekik yağı spektrumları incelendiğinde Raman bandlarının konumlanması farklılık teşkil etmezken band intensitelerinde bileşen konsantrasyonuna bağlı olarak farklılık gözlemlenmiştir (Şekil 4.11.). Rodriguez-Solana ve ark. [157] kekik yağlarında farklı kemotiplerin karakterizasyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada timol, ρ -simen ve karvakrol standartlarının spesifik Raman bandlarını göstermişlerdir. Bu çalışmaya göre, timol standartına ait spektrumda görece güçlü bandlar 1622 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} , 1261 cm^{-1} , 1065 cm^{-1} , 870 cm^{-1} ve karakteristik band olan 740 cm^{-1} (halka titreşimi) görülmektedir. Bununla birlikte ρ -simen bileşenine ait karakteristik bandlardan (1611 cm^{-1} , 1209 cm^{-1} , 804 cm^{-1}) 804 cm^{-1} dolaylarındaki band örnek spektrumunda görülmektedir. Karvakrol standardına ait spektrumda en yüksek intensite gösteren pik 760 cm^{-1} de ortaya

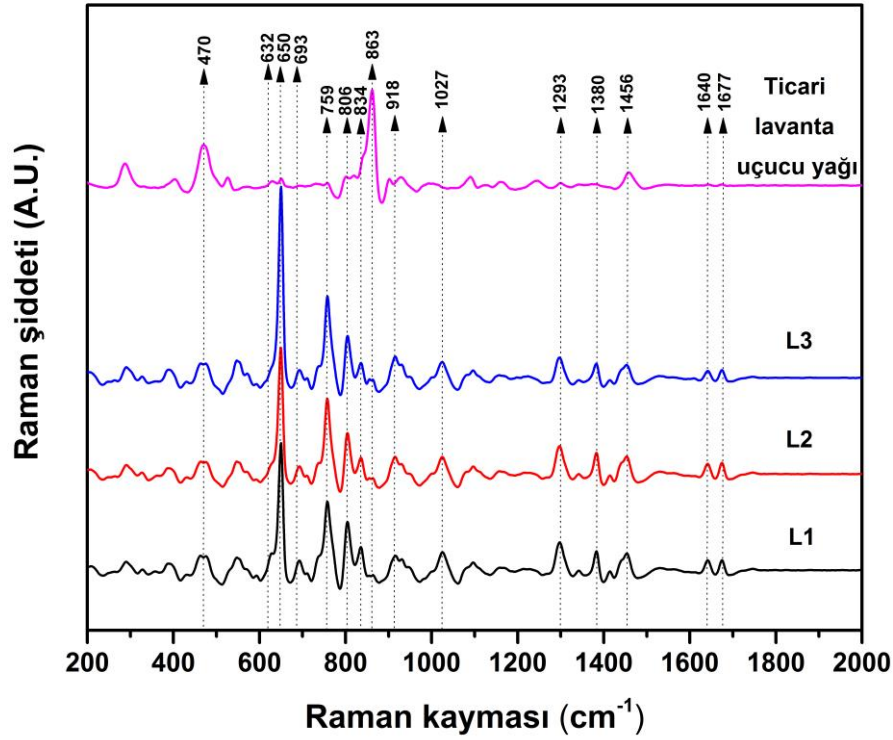
çıkmakta olup diğer ilgili bandlar 1460 cm^{-1} , 1265 cm^{-1} , 1064 cm^{-1} ve 870 cm^{-1} de görülmektedir. γ -terpinen molekülü ile ilişkili bandlar (sikloheksadienin konjuge olmayan C=C bağı ile ilişkili 1701 cm^{-1} ve 1428 cm^{-1}) literatürde belirtildiği gibi örnek spektrumlarında da gözlenmemiştir [157]. Tez kapsamında değerlendirilen karvakrol tip uçucu kekik yağı spektrumlarında bu bandlar benzerlik gösterip literatürle desteklenmektedir. Her bir kekik yağında da intensitesi en yüksek pik 760 cm^{-1} de görülmekte olup terpinen halka molekülü ile ilişkilidir [157]. Üretimi yapılan uçucu kekik yağları ve ticari örnek spektrumları karşılaştırıldığında önemli ölçüde intensitede düşüşü görülmektedir. Ticari yağların birinde 760 cm^{-1} deki pike en olarak 740 cm^{-1} de omuz oluşumu gözlemlenmektedir. Örneklerin GC sonuçları ile ilişkilendirildiğinde Raman spektrumları bileşen konsantrasyonları paralellik göstermektedir.



Şekil 4.11. Üretimi yapılan kekik uçucu yağları ve ticari kekik uçucu yağının ham Raman spektrumu

Lavanta uçucu yağlarında ana bileşenler linalol, linalil asetat, borneol, ökaliptol, β -karyofilen ve kafurdur. Lafhal ve ark.'larının [161] lavanta türlerinde Raman spektroskopisi kullanarak teşhis ve bileşen tayini yaptıkları çalışmada, lavantadaki

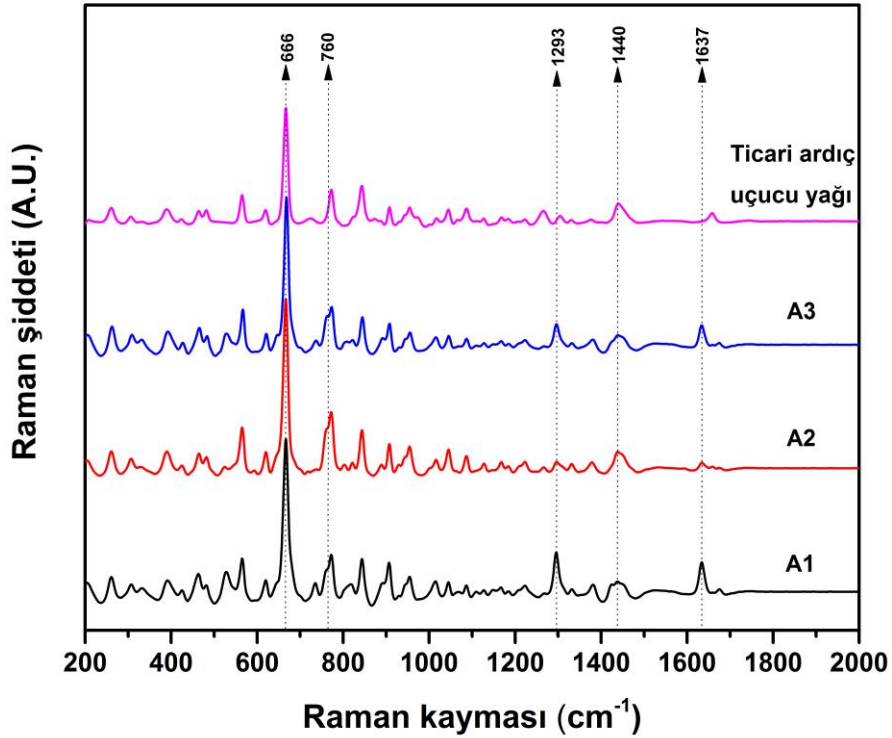
karakteristik bileşenler için Raman spektrumu parmak izi tayini yapmışlardır. Çalışmada tayin edilen Raman bandları ile tez kapsamında laboratuvar ortamında distile edilen uçucu yağların Raman analizinde elde edilen bulgular (L1, L2, L3) uyumluluk göstermektedir (Şekil 4.12.). Uçucu yağdaki linalool, linalil asetat, borneol, ökaliptol, β -karyofilen ve kafur ana bileşenlerindeki CH_2 bükülme titreşimi (δ_{CH_2}) 1430 ve 1480 cm^{-1} arasındaki Raman bandında açığa çıkmaktadır. Altı üyeli halka titreşimi sebebi ile 650 cm^{-1} de ortaya çıkan pik borneol, kafur ve ökaliptol ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca 834 cm^{-1} dolaylarında gözlemlenen bandın borneol bileşiğinden kaynaklandığı yorumu yapılmaktadır. β -karyofilene ait bandlar 806 ve 770 cm^{-1} dolaylarında ortaya çıkmaktadır (halka bükülme titreşimi). Asimetrik ve simetrik C-O gerilme titreşimleri ($\nu_{\text{C-O}}$) sırası ile 1214 ve 1078 cm^{-1} 'de ökaliptol, 1174 cm^{-1} 'de linalil asetat ve 1165 cm^{-1} 'de linalol için pik ortaya çıkarmaktadır. Linalol, linalil asetat ve β -karyofilen spektrumunda gözlenen 1674 - 1677 ve 1640 - 1645 cm^{-1} bandları sırasıyla $\nu_{\text{C=CH}}$ $\nu_{\text{C=CH}_2}$ modlarını karakterize eder ve lavanta uçucu yağlarında da gözükmemektedir. 1640 cm^{-1} deki pik linalol ve linalil asetata ait olup 1630 dolaylarında β -karyofileni temsil eden omuz piki ile örtüşmüştür. Ticari lavanta uçucu yağlarına ait Raman spektrumları incelendiğinde spektral farklar gözle görülebilmektedir. Lavanta uçucu yağlarında izlenen parmak izi spektrumu ticari yağlarda gözlemlenememiştir. Bu durum GC sonuçları ile de paralellik göstermektedir. GC sonuçlarında lavanta uçucu yağındaki majör terpenoid oranları ticari örneklerde beklenildiği gibi çıkmamış bununla birlikte yüksek oranda yabancı bileşen konsantrasyonlarına rastlanmıştır. Tespit edilen dipropilen glikol oranı % $58,81$ olmuştur. Bununla birlikte üretimi yapılan yağlar kendi aralarında karşılaştırıldığında bileşen içerikleri ve Raman spektrumları da uyumluluk göstermektedir. L3 uçucu yağında en yüksek kafur içeriği (% $6,8$) görülmekte iken L1 de en düşük (% $3,3$) kafur içeriği saptanmıştır. Kafura ait 916 cm^{-1} dalga sayısı dolaylarındaki pik takip edildiğinde GC sonuçları ile paralel davranış gösterdiği görülmektedir. Ek olarak en şiddetli pik olduğu görülen 650 cm^{-1} deki pik kafur, ökaliptol ve borneolu karakterize etmektedir. GC sonuçları ile karşılaştırıldığında bu bileşenlerin toplam ihtivaları L3 de en çok (% $13,76$), L1 (% $10,25$) de ve L2 (% $10,66$) de yakın tespit edilmiştir. Raman spektrumunda da en şiddetli piki veren uçucu yağın L3 olduğu görülmektedir.



Şekil 4.12. Üretimi yapılan lavanta uçucu yağları ve ticari lavanta uçucu yağının ham Raman spektrumu

Üretimi yapıldıktan sonra Raman spektrumu alınan ardıç uçucu yağlarında (A1, A2, A3) parmak izi niteliğini taşıyan spektral benzerlik gözükmemektedir (Şekil 4.13.). Bununla birlikte bileşen konsantrasyonu farklılıkları sebebi ile pik şiddetleri değişkenlik göstermektedir. 666 cm^{-1} dalga sayısında görülen bükülme titreşimine ait pik (δ_{halka}) α -pinen bileşiği ile ilişkilendirilmektedir [12]. 760 cm^{-1} de gözlenen omuz piki limonen halka deformasyonu (δ_{halka}) ile ilişkilendirilmiştir. Ardıç yağlarında bulunan bir diğer önemli bileşen olan mirsen karakteristik pikleri 1293 ve 1637 cm^{-1} de ortaya çıkmaktadır. C=C gerilme titreşimini ($\nu_{\text{C=C}}$) gösteren 1637 cm^{-1} piki aynı zamanda β -pinen bileşiğinden de kaynaklanmaktadır. β -pinen bileşiğinin bir diğer karakteristik piki 1440 cm^{-1} dalga sayısındadır (δ_{CH_2} ve δ_{CH_3}). GS-MS sonuçlarına göre A2 uçucu yağı diğer üretimi yapılan A1 ve A3 uçucu yağlarına kıyasla daha az mirsen, daha fazla limonen ve α -pinen içeriğine sahiptir. Raman spektrumu incelendiğinde bileşen oranlarına paralel bir spektrum gözlenmektedir. Bu farklılık uçucu yağları elde edilen kurutulmuş ardıç meyvelerinin tedarik edildiği işletmelerin farklı üretim teknolojileri ve ham

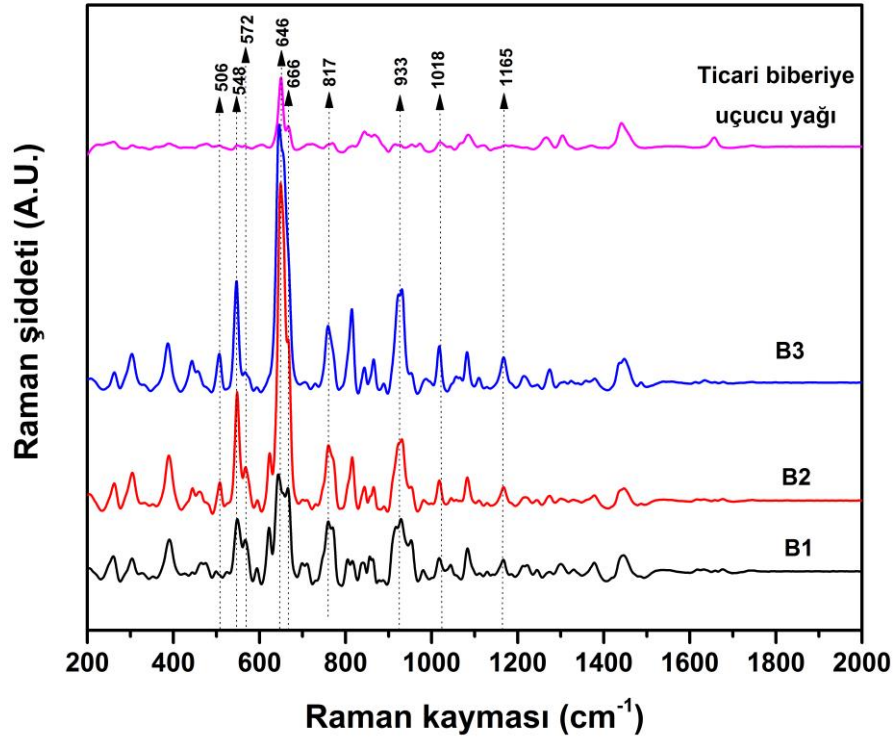
maddelerine bağılı olarak değişkenlik göstermiştir. Ticari ardıç yağ spektrumları değerlendirildiğinde limonen bileşiminin çok düşük olduğu görölmektedir. Üretimi yapılan yağlarda limonen içeriği % 5,86-9,02 arasında iken ticari yağlarda bu oran % 0,39-0,62 aralığındadır. 1637 cm^{-1} 'de gözlenen mirsen karakteristik piki ticari uçucu yağlarda kaybolmuştur. Bu sonuçlar ile paralel olarak spektrumlar analiz edildiğinde limonen bileşiminin karakteristik piki olan ve 740 cm^{-1} de görölen omuz pikinin ticari örneklerde tamamen kaybolduğu gözlemlenmektedir. Benzer olarak mirsen içerikleri üretimi yapılan saf örneklerde % 8,01-38,89 aralığında tespit edilirken, ticari örneklerde bu oran % 0,04-1,04 aralığında kalmaktadır. Spektrumda mirsen bileşimine ait karakteristik bandların ticari örneklerde kaybolduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte α -pinen içerikleri saf örneklerden daha düşük şiddette de olsa spektrumda gözlemlenmektedir.



Şekil 4.13. Üretimi yapılan ardıç uçucu yağları ve ticari ardıç uçucu yağının ham Raman spektrumu

Biberiye uçucu yağlarında ana bileşenler kafur, ökaliptol, α -pinendir. Bileşiklerin saf hallerine ait Raman spektrumları literatürde mevcuttur [162]. Üretimi yapılan örnekleri (B1, B2, B3) Raman spektrumları incelendiğinde bileşiklere ait

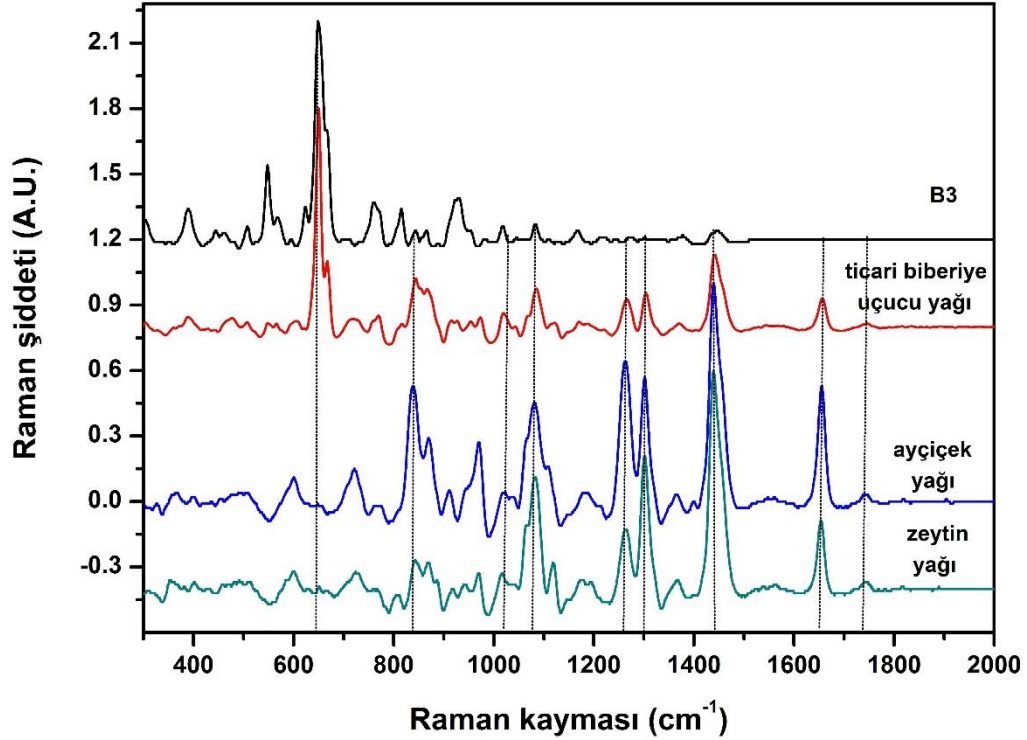
karakteristik bandlar görülmektedir (Şekil 4.14.). Spektrumda görülen en şiddetli pik 646 cm^{-1} dalga sayısında olup, kafur, ökaliptol ve borneolün karakteristik pikidir. Bu pikin sağ tarafında 666 cm^{-1} dalga sayısında bulunan omuz piki α -pinen aittir. Kafurun karakteristik pikleri; 572, 933, 1018, 1165 cm^{-1} 'de görülürken, ökaliptol için karakteristik pikler 506, 548, 817, 933, 1018, 1165 cm^{-1} dalga sayısında ortaya çıkmaktadır. Ticari yağların Raman spektrumları üretimi yapılan biberiye uçucu yağ spektrumlarından farklılık göstermektedir. Farklılık sebepleri araştırılırken GC-MS, Raman spektrumları ve literatür bilgisinden yararlanılmıştır. Ticari ve saf örneklerin bileşen oranları incelenmiş ve bu tez kapsamında GC-MS sonuçlarının değerlendirilmesi bölümünde tartışılmıştır. Bazı ticari örneklerin GC-MS sonuçları literatürle uygunluk gösterdiği halde (nane, kekik, fesleğen biberiye uçucu yağları) spektral farklılık dikkat çekmiştir.



Şekil 4.14. Üretimi yapılan biberiye uçucu yağları ve ticari biberiye uçucu yağının ham Raman spektrumu

Ticari örneklerin Raman spektrumları incelendiğinde biberiye uçucu yağının karakteristik ve en şiddetli piki olan 646 cm^{-1} dalga sayısında görülmektedir. Bununla birlikte biberiye uçucu yağına ait başka bir karakteristik pike ticari örnek

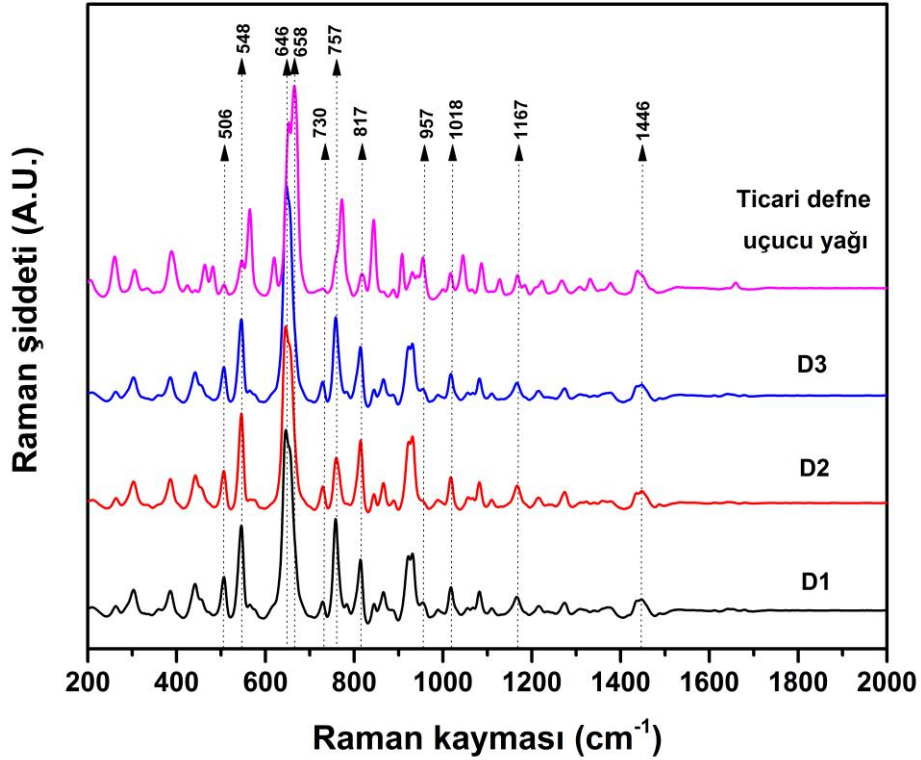
spektrumlarında rastlanmıştır. Şekil 4.15.'de ticari örnek spektrumları yemeklik bitkisel yağların spektrumları ile karşılaştırılmıştır [131]. Şekilde üzere 646 cm^{-1} dalga sayısındaki karakteristik pik haricinde zeytinyağı ve biberiye spektrumları oldukça benzerlik göstermiştir. Omar ve ark.'larının [162] bir çalışmasında zeytin yağ ve biberiye uçucu yağlarının çeşitli oranlardaki karışımlarının Raman spektrumları verilmiştir. Sonuç olarak biberiye uçucu yağlarında bitkisel yağ ile taşıyış yapılmış olduğu yorumu yapılmıştır.



Şekil 4.15. Ticari biberiye uçucu yağın Raman spektrumu ile bitkisel yağların ve laboratuvarında distile edilen uçucu yağın (B3) Raman spektrumunun karşılaştırılması

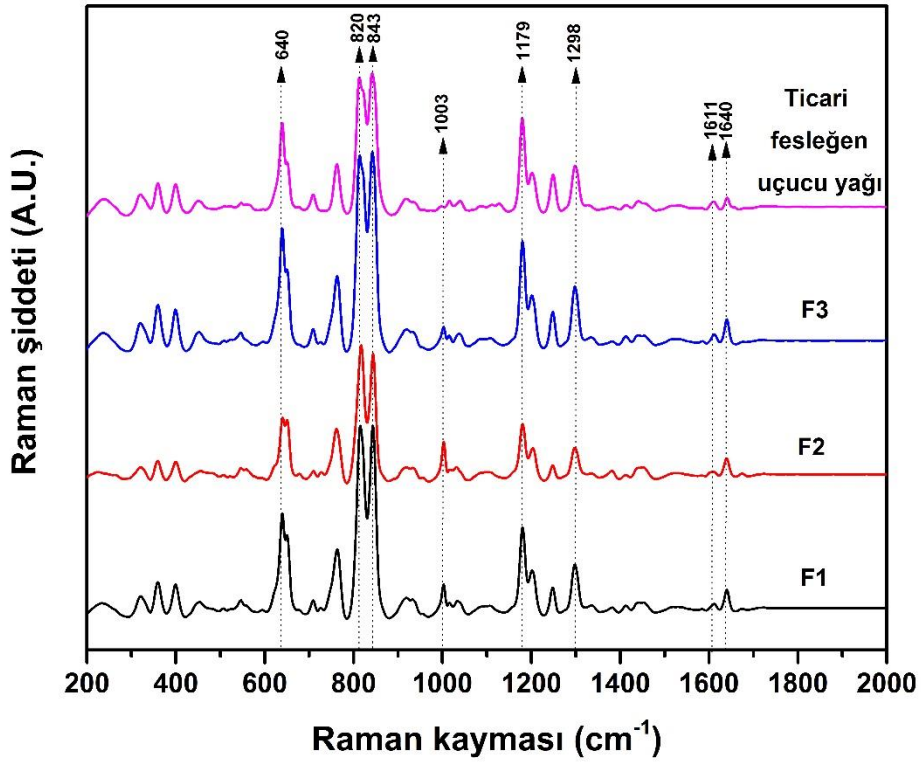
Üretimi yapılan defne uçucu yağlarına (D1, D2, D3) ait Raman spektrumunda gözlemlenen en şiddetli pik 649 cm^{-1} de ökaliptolun karakteristik pikidir (Şekil 4.16.). Uçucu yağların GC analizleri dikkate alındığında defne uçucu yağlarında bulunan ve majör bileşenler olan, α -terpineol, α -pinen, β -pinen ve sabinene ait karakteristik pikler araştırılmıştır. α -pinen, β -pinen ve sabinen, 658 cm^{-1} dolaylarındaki omuz pikinde gözlenmekle birlikte ökaliptol piki ile örtüşmüştür [87]. Yalnızca ökaliptol takip edilmek istendiğinde $506, 548, 817, 1018$ ve 1165 cm^{-1} dalga sayılarındaki karakteristik pikleri ile GC-MS sonuçlarının paralel olduğu ortaya çıkmaktadır [87]. Bir diğer majör bileşen olan α -terpineol bileşiğine ait

karakteristik pik 757 cm^{-1} dalga sayısı dolaylarında ortaya çıkmıştır [163]. Sabinene ait karakteristik bandlar 957 cm^{-1} dalga sayısındaki omuz piki ve 1446 cm^{-1} ile görülmektedir [87]. Defne uçucu yağlarına ait ticari yağlar çeşitlilik göstermiştir. Ticari yağlardan birinde GC sonuçları ile paralel olarak beklenildiği üzere Raman bandlarının şiddeti düşük olsa da parmak izi spektrumunun uyumlu olduğu gözlenmiş yabancı bir Raman bandına rastlanmaması sebebi ile içeriğinde yabancı madde olmadığı yorumu yapılmıştır. Bununla birlikte bir diğer ticari yağda beklenmeyen Raman bandlarına rastlanmıştır. Söz konusu ticari yağın GC analiz sonuçları incelendiğinde tespit edilen yüksek oranda α -pinen bandları spektrumda gözlenmektedir. Bununla birlikte normalden oldukça düşük oranda tespit edilen ökaliptol uçucu yağ spektrumunda da daha düşük şiddete bandlar ile gözlemlenmektedir. Bu ticari uçucu yağda başka bir uçucu yağ karıştırıldığı yorumu yapılmaktadır.



Şekil 4.16. Üretimi yapılan defne uçucu yağları ve ticari defne uçucu yağının ham Raman spektrumu

Fesleğen uçucu yağlarında ana bileşenine göre Raman spektrumunda tür tayini çalışmaları Schulz ve ark. [15] tarafından yapılmıştır. Tez kapsamında uçucu yağları elde edilen fesleğenlerin (F1, F2, F3) estragol kemotip olduğu yorumu yapılmıştır (estragol bileşiği oranı daha yüksek). Bununla birlikte piyasada satışı yapılan fesleğen uçucu yağların da spektrumu incelendiğinde estragol kemotip olduğu sonucuna varılmıştır. Üretimi yapılan fesleğen uçucu yağları ve ticari fesleğen uçucu yağının ham Raman spektrumu Şekil 4.17.'da verilmiştir.

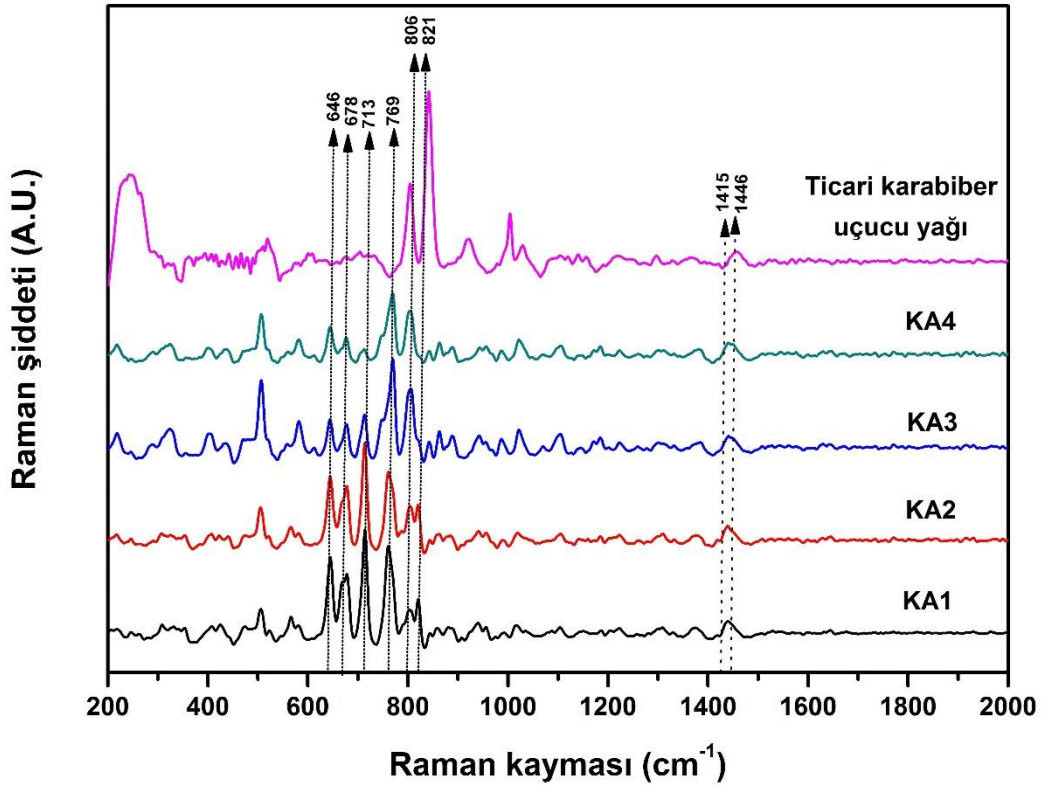


Şekil 4.17. Üretimi yapılan fesleğen uçucu yağları ve ticari fesleğen uçucu yağının ham Raman spektrumu

640 cm⁻¹ dalga sayısında görülen pik estragole ait düzlem içi halka bükülme titreşimidir. Estragolün karakteristik pikleri fesleğen spektrumunda oldukça baskın olup, fesleğen uçucu yağındaki diğer bileşen hatları ile örtüşmektedir. 795-880 cm⁻¹ arası gözlenen hatlar estragolden kaynaklanan *p*-disübstitüe benzenlerin C-H dalgalanma titreşimlerinin sonucudur. 1003 cm⁻¹ dalga sayısındaki pik mono sübstitüe benzenlerin karakteristik gerilme ve bükülme vibrasyonları sonucu görülmektedir. 1179 cm⁻¹ dolaylarında görülen hat düzlem içi halka C-H bükülme

modu titreşimidir. 1298 cm^{-1} estragolün $=\text{CH}$ sallanma modu titreşimidir (ρ). 1611 cm^{-1} halka quadrant gerilmesi, 1640 cm^{-1} ise $\text{C}=\text{C}$ gerilme titreşimleri ile ilgili piklerdir. GC-MS sonuçları ve Raman spektrumları birlikte değerlendirildiğinde spektrum band şiddetlerinin bileşen oranları ile uyumlu olduğu yorumu yapılmıştır. Estragol oranı en çok olan F3 uçucu yağına ait spektrumda estragol ile ilişkili pikler en şiddetli iken, estragol oranı en az olan F2 en düşük şiddette estragol pikleri göstermiştir. Bununla birlikte 1003 cm^{-1} dolaylarındaki hat metil öjenol ile ilişkili olup GC-MS sonuçları ile paralel olduğu görülmektedir [15, 87].

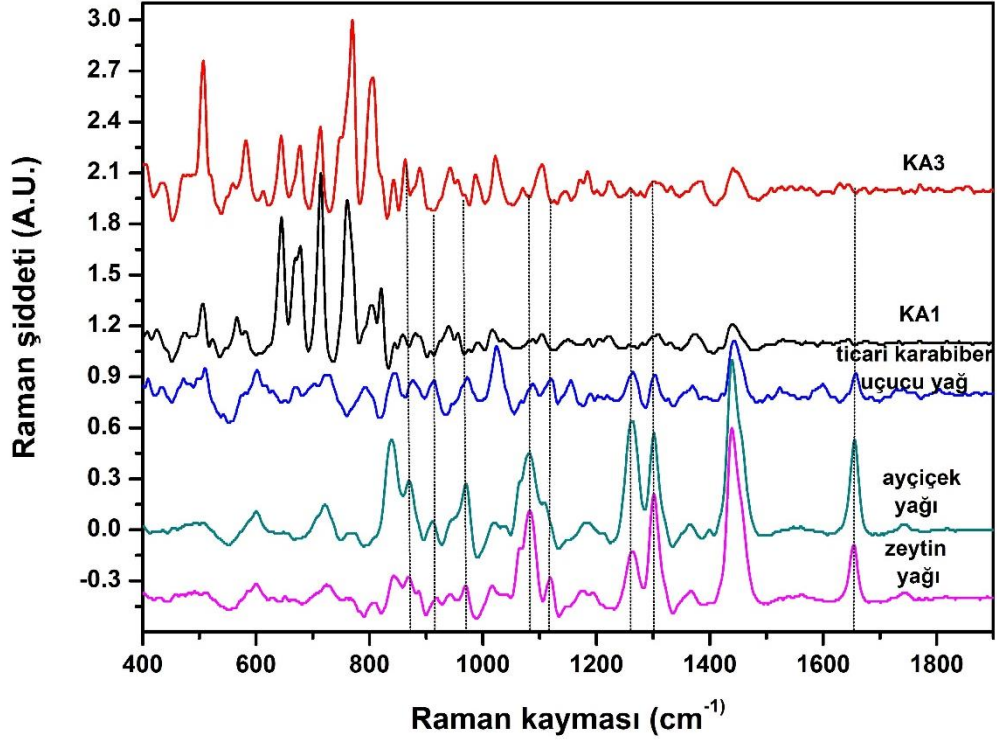
Karabiber uçucu yağlarında ana bileşenler; δ -3-karen, sabinen, β -pinen, limonen, β -karyofilen olup bu bileşiklerin bulunma oranı karabiberin tipini isimlendirmede kullanılmaktadır [24]. Karabiber uçucu yağlarından elde edilen Raman spektrumları incelendiğinde iki tip öğütülmüş karabiberden elde edilen uçucu yağların parmak izi spektrumları ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. Üretimi yapılan karabiber uçucu yağları ve ticari karabiber uçucu yağının ham Raman spektrumu

δ -3-karen içeriği daha çok olan δ -3-karen/karyofillen/limonen kemotip [134] KA1 ve KA2 karabiber uçucu yağlarında δ -3-karen ile ilişkili pikler olan 678 cm^{-1} , 713 cm^{-1} ve 821 cm^{-1} dalga sayılarındaki Raman band şiddetlerinin farklılaşması bu iki tip arasında bileşen oranı farkının Raman spektrumunda gözlemlenebildiğini ortaya koymuştur [134]. Bununla birlikte karyofilen içeriği daha yüksek olan karyofilen kemotip karabiber uçucu yağları olan KA3 ve KA4 uçucu yağlarına ait spektrumda bu bileşene ait pikler olan 508 , 582 , 769 , 806 ve 1446 cm^{-1} de gözlenmektedir. 1446 cm^{-1} de gözlenen geniş pik CH_2 deformasyon titreşimine aittir [134]. 760 cm^{-1} de ortaya çıkan limonen karakteristik piki 769 cm^{-1} deki majör karyofillen bandı girişimi sebebi ile domine edilmektedir. Literatürde 1671 ve 1632 cm^{-1} de ortaya çıktığı bildirilen $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ gerilme titreşimi pikleri gözlemlenmemiştir. Sabinen bileşiğine ait δ_{CH_2} titreşiminin karakteristik piki 1415 cm^{-1} de yalnızca K2 de omuz piki olarak gözlenmiştir [134]. Diğer yağlarda bu bileşen oranı oldukça düşük olduğu için diğer piklerin girişimi sebebi ile gözlenmemektedir. 646 cm^{-1} deki Raman pikinin β pinen ile ilişkili olduğunu yorumu yapılmıştır [87].

Ticari karabiber uçucu yağlarına ait spektrumlarında bu uçucu yağda olması gereken karakteristik pikler gözlenmemiştir. Bununla birlikte değerlendirilen ticari yağlardan birinde 830 - 860 cm^{-1} arasında majör, yabancı bir pik gözlenmiştir. Bu pik karabiber uçucu yağlarının kemotiplerinde gözlenen bir pik olmamıştır [134]. Ayrıca Şekil 4.19.'de verildiği üzere bir başka ticari yağda da bitkisel yağlara benzer karakteristik pikler gözlenmiştir. Spetrumlar GC-MS analiz sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde yukarıda bahsedildiği gibi δ -3-karen ile ilişkilendirilen pikler incelenirse, KA1 ve KA2 de δ -3-karen pikleri daha şiddetli görölmektedir. Bununla birlikte β -karyofilen ile ilişkilendirilen Raman pikleri de KA3 ve KA4 de daha şiddetli pikler vermiştir. β -pinen içeriği en çok olan KA1 uçucu yağında bu bileşik ile ilişkili 646 cm^{-1} piki en şiddetli, β -pinen içeriği en düşük olan KA4 en düşük şiddette pik oluşturmuştur.

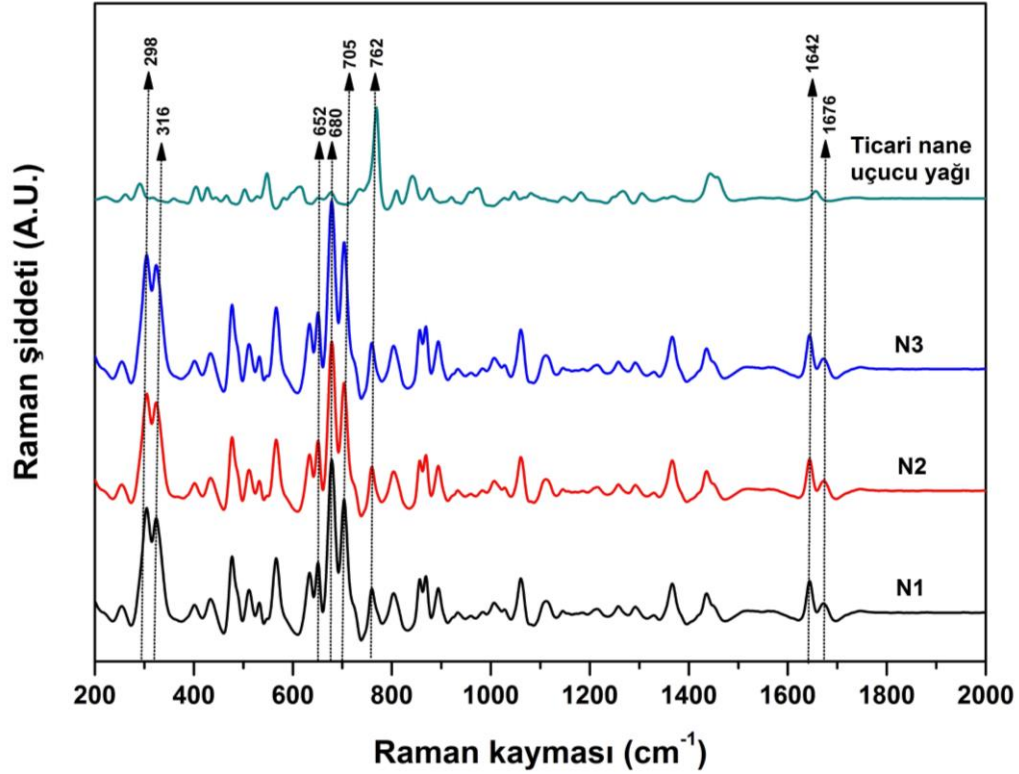


Şekil 4.19. Ticari karabiber uçucu yağın Raman spektrumu ile bitkisel yağların ve laboratuvarıda distile edilen uçucu yağların (KA1 ve KA3) Raman spektrumunun karşılaştırılması

Nane uçucu yağlarında (N1, N2, N3, N4) nane tedarigi yapılırken dört farklı kaynaktan materyal sağlanmıştır. Elde edilen uçucu yağların GC analizi ile tespit edilen bileşen oranları ve Raman spektrumları paralellik göstermiştir. Sonuç olarak uçucu yağları elde edilen nane türlerinin *M. spicata* (karvon tip) nane olduğu yorumu yapılmıştır. Ticari olarak alınan nane uçucu yağlarında mentol oranı yüksek çıkarken (*M. piperita*) baharat olarak satışı yapılan *M. spicata* (spearmint) türü nanelerin karvon içerik oranı daha yüksek bulunmuştur. Üretimi yapılan dört çeşit nane baharatı yağlarının ve ticari uçucu yağların Raman spektrumları incelendiğinde bu bileşenlerin spektrumda band tespiti yapılabilmiştir (Şekil 4.20.). 298, 316, 680 ve 705 cm^{-1} piklerinin karvon bileşiğine, 770 cm^{-1} pikinin ise mentol bileşiğine ait halka deformasyon titreşiminin karakteristik piki olduğu yorumu yapılmakta ve literatürle desteklenmektedir [87, 164]. Ticari uçucu yağların Raman spektrumu ve GC sonuçları karşılaştırmalı incelendiğinde mentol ve menton bileşiklerinin pikine spektrumda rastlanmıştır.

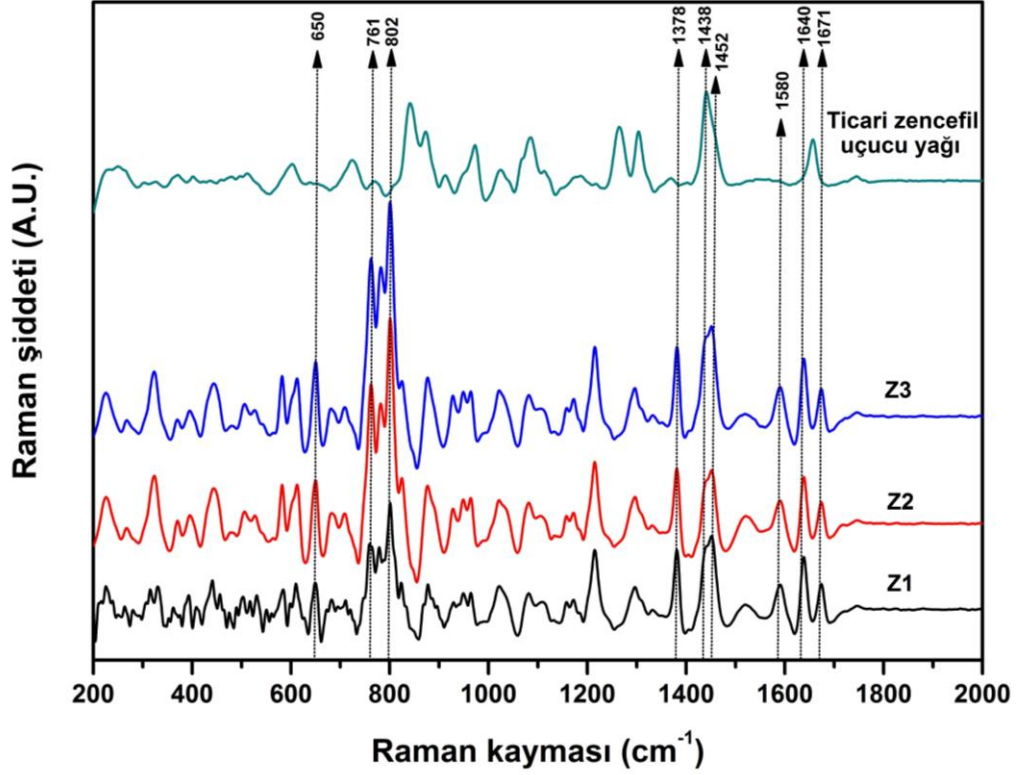
Üretimi yapılan nane uçucu yağlarında, 760 cm^{-1} dolaylarında limonen karakteristik piki gözlenmektedir (Şekil 4.20.). Ticari uçucu yağlarda bu pik mentol piki ile

girişimde bulunmuştur. 1642 ve 1676 cm^{-1} deki piklerin β -karyofillen ve mirsen bileşiklerine ait $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ titreşimlerinin karakteristik pikleri olduğu bildirilmiştir [87]. Farklı kaynaklardan elde edilen uçucu yağların bileşen kompozisyonları gc sonuçlarına göre oldukça benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte Raman spektrumları incelendiğinde GC sonuçları ile benzer olarak uçucu yapıların spektral benzerlikleri oldukça açıktır. Spektrumda Raman şiddetleri birbirlerine yakın olsalar dahi kemometrik analiz yöntemleri ile bileşenler tahmin edilebilmiştir.



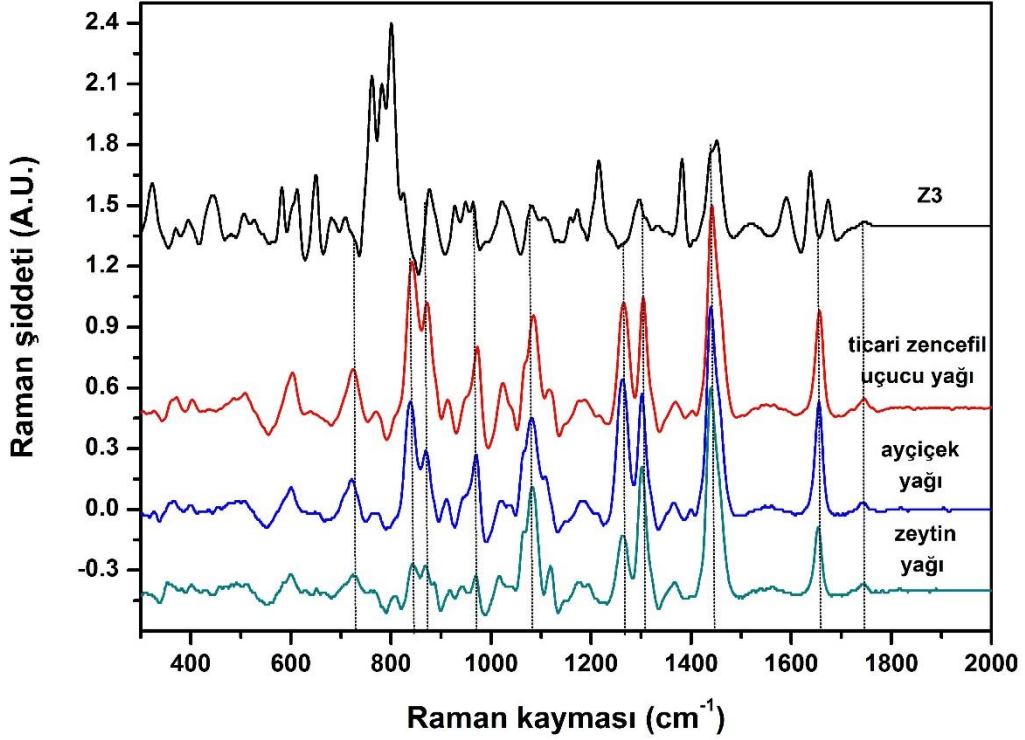
Şekil 4.20. Üretimi yapılan nane uçucu yağları ve ticari nane uçucu yağının ham Raman spektrumu

Zencefil uçucu yağlarından (Z1, Z2, Z3) elde edilen Raman spektrumu incelendiğinde majör bileşenlerin karakteristik bandlarının 1000-1700 cm^{-1} dalga sayısı aralığında olduğu bilinmektedir (Şekil 4.21.). Zencefilin majör bileşenlerinden zingiberen için C=C bağları ve CH_2 ve CH_3 grupları ile ilişkili titreşimler spektrumda görülmektedir [87]. 1671, 1640, 1589 cm^{-1} de dolaylarında gözlenen bandlar $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ titreşimleri ile ilişkilidir. 1452 ve 1438 cm^{-1} görülen Raman pikleri CH_3/CH_2 bükülme modu titreşimden kaynaklanmaktadır. 1378 cm^{-1} dalga sayısı CH_3 bükülme modu titreşimi ile ilişkilendirilmiştir [87].



Şekil 4.21. Üretimi yapılan zencefil uçucu yağları ve ticari zencefil uçucu yağının ham Raman spektrumu

Zencefil uçucu yağlarına ait ticari örneklerin Raman spektrumları incelendiğinde karakteristik pikler gözlenmemekle birlikte sabit bitkisel yağ spektrumuna benzer spektrum elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.22.). Bitkisel yağlara ait spektrum ile karşılaştırıldığında benzerlik açıkça görülmektedir. Ticari olarak satışı yapılan bu uçucu yağlara sabit yağ karıştırıldığı yorumu yapılmıştır.



Şekil 4.22. Ticari zencefil uçucu yağın Raman spektrumu ile bitkisel yağların ve laboratuvarıda distile edilen uçucu yağın (Z3) Raman spektrumunun karşılaştırılması

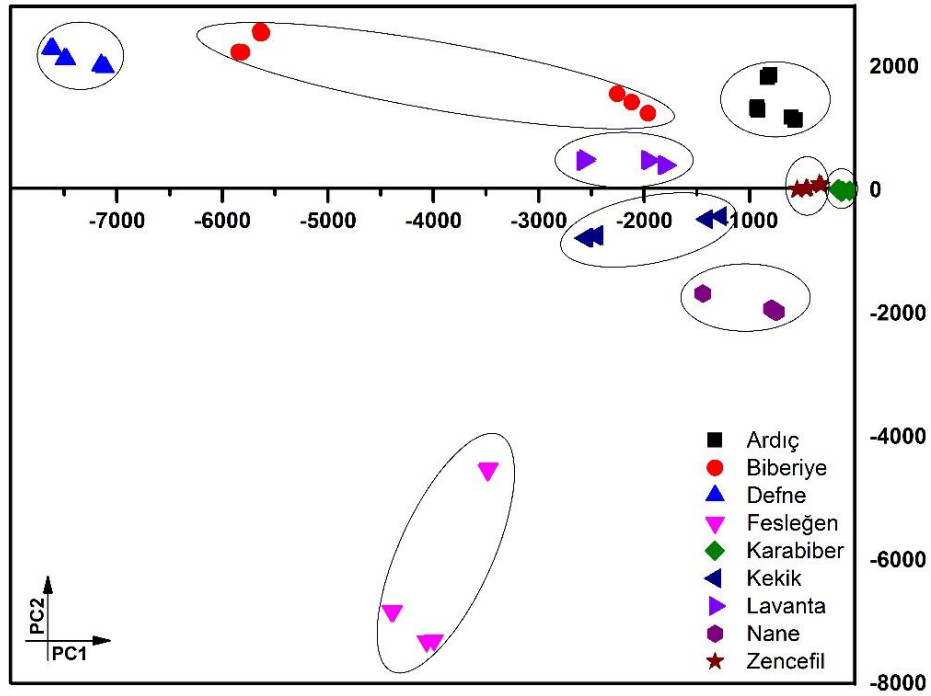
4.2.3. Uçucu Yağların Raman Spektrumlarının Veri Analizi

Dokuz farklı aromatik bitkiden elde edilmiş uçucu yağların Raman spektrumları değerlendirildiğinde aralarında spektral farklılaşma gösterdikleri yukarıda belirtilmiştir. Tez çalışmasının kemometrik analiz evresinde her bir uçucu yağ örneği için elde edilen 200-2000 cm^{-1} dalga sayısı arasındaki 1801 adet Raman spektrumu verisi kullanılarak PCA ve PLS modelleri geliştirilmiş bununla birlikte PLS modelinde kantifikasyon için GC analiz sonuçları kullanılmıştır.

İlk olarak oluşturulan PCA modelinde elde edilen ayırım Şekil 4.23.'de görülmektedir. Model, her biri üç farklı yerden temin edilmiş dokuz farklı aromatik bitkiden elde edilen toplam 27 uçucu yağ ile oluşturulmuştur. Model geliştirirken en iyi ayırım için birden fazla ön işlem kombinasyonları denenmiştir. Modelde ikinci dereceden türev ve detrend ön işlemleri en iyi ayırımı sağladığı için tercih edilmiştir. Oluşturulan model için varyansın % 30,32'sini açıklayan PC1 ve varyansın % 35,85'ini açıklayan PC3 temel bileşenleri kullanılmıştır. Raman spektrumları kullanılarak oluşturulan PCA modeli ile uçucu yağlar birbirinden ayrılarak

kümeleşme davranışı göstermiştir. Bununla birlikte aynı uçucu yağ grubunda olup birbirinden uzaklaşan örnekler de gözlenmiştir.

Raman spektrumu değerlendirmesi yapılırken değinildiği üzere, spektrum terpenoid bileşenler tarafından domine edilmiştir. Dolayısı ile bileşen oranları benzer olan örnekler yaklaşırken, aynı uçucu yağ sınıfında olsa dahi bileşen oranları majör farklılıklar gösteren örneklerde uzaklaşma eğilimi olmuştur. Örneğin biberiye uçucu yağlarında yan yana toplanan biberiye uçucu yağları yanı sıra bu gruba uzakta kümeleşen bir biberiye uçucu yağ grubu daha söz konusu olmuştur. GC analiz sonuçları dikkate alındığında, uzaklaşan grubun α -pinen oranının diğerlerinden çok daha düşük ökaliptol oranında diğerlerinden çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. Böylece yaklaşma gösterdiği defne uçucu yağlarının terpenoid bileşimine benzer bir kompozisyona sahip olduğu GC sonuçları ile destelenmekte ve PCA ayırımında bu farklılık ve korelasyonu kullanıldığı yorumu yapılabilmektedir.

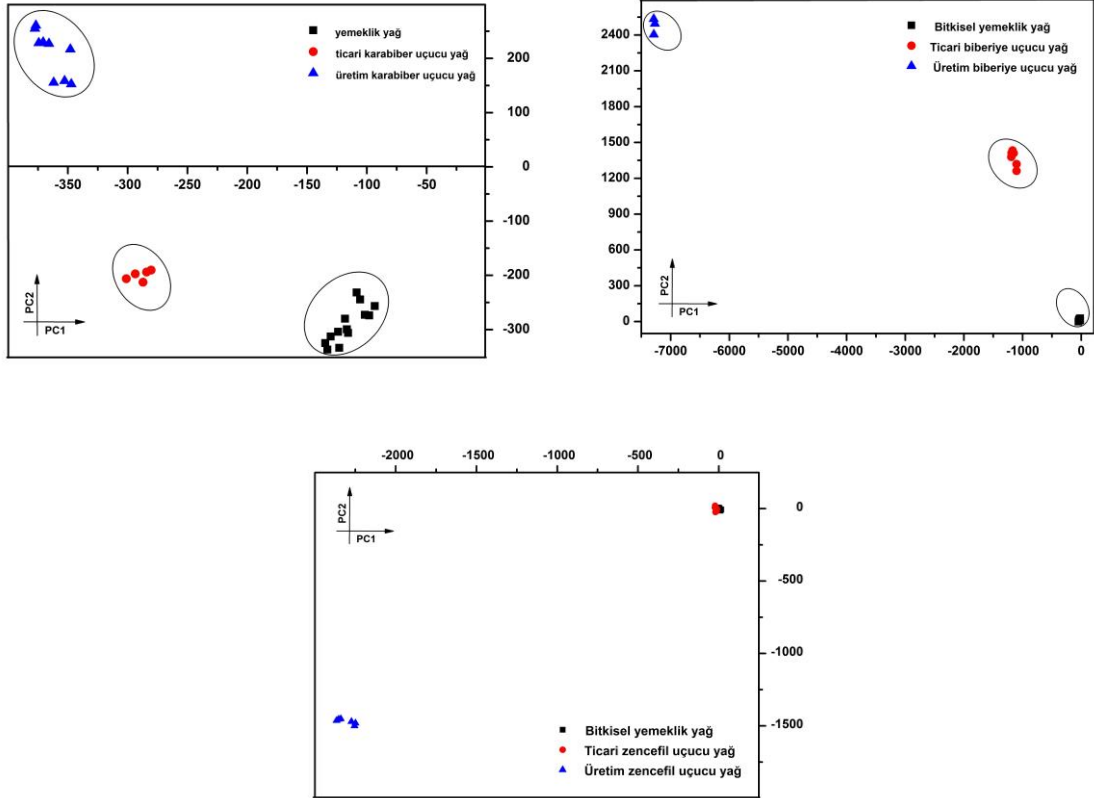


Şekil 4.23. Raman spektrumları kullanılarak geliştirilen PCA modeli dokuz çeşit uçucu yağın sınıflandırılması (n=75)

Diğer bir örnek fesleğen uçucu yağları örnek grubunda gözlenmiştir. Farklılaşan grup üyelerinin GC sonuçları araştırıldığında diğer gruba kıyasla daha düşük estragol içeriği ve daha yüksek linalol bileşiği oranına sahip olduğu görülmektedir.

Özellikle uçucu yağların karakteristik majör terpenoidlerindeki farklılaşmalar PCA başarısını etkilemektedir.

Biberiye, karabiber ve zencefil yağlarına ait Raman spektrumunda gözlenen sabit yağlara ait spektral benzerlik geliştirilen PCA modelinde gösterilmiştir (Şekil 4.24.). Karabiber grubu için oluşturulan model için varyansın % 33,10'unu açıklayan PC1 ve varyansın % 30,31'ini açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır. Biberiye grubu için oluşturulan model için varyansın % 75,15'ini açıklayan PC1 ve varyansın % 15,11'ini açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır. Zencefil grubu için oluşturulan model için varyansın % 53,21'ini açıklayan PC1 ve % 38,96'sını açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır.



Şekil 4.24. Karabiber, biberiye ve zencefil uçucu yağları için çizilen PCA grafikleri.

Şekil 4.24.'deki PCA grafiklerinden de görüleceği gibi karabiber ve biberiye yağ gruplarında, ticari örnekler üretimi yapılan saf uçucu yağ örnekleri ile sabit yemeklik yağlar arasında konumlanmıştır. Dahası ticari biberiye uçucu yağı bitkisel yağlara daha yakında kümelenmiştir. Bu ticari yağların Raman spektrumundaki

sabit yağlara benzer bandlar PCA grafiğinin şekillenmesini sağlamıştır. Bununla birlikte, ticari zencefil uçucu yağı sabit yemeklik yağlar ile aynı bölgede kümelenmiştir. Ticari zencefil uçucu yağlarının Raman spektrumlarının sabit yemeklik yağların Raman spektrumuna yüksek benzerliği PCA grafiğinde de gözlenmiş ve bitkisel yağlar ile aynı davranışı göstermiştir.

Tez kapsamında yirmidört terpenoidin kantitatif analizi için PLS metodundan faydalanılmıştır. Her bir terpenoid için model geliştirilmiştir. Dokuz aromatik bitki türüne ait uçucu yağların hepsine her bir modelde yer verilmiştir. Kalibrasyon ve validasyon veri setlerinin tayini için yazılımda bulunan ve yukarıda daha önce değinilen Kennard-Stone algoritması kullanılmıştır [128]. Toplam 81 örnek veri setinin 54'ü kalibrasyonda kalırken 27'si validasyon için ayrılmıştır. *Normalizasyon* ve *Pareto* ön işlemler olarak seçilmiştir. Daha önce bahsedilen normalizasyon ön işlemi gibi pareto algoritması da bir ölçeklendirme ön işlemidir. En çok kullanılan yöntemlerden biri olan , standart sapmanın ölçeklendirme faktörü olarak kullanıldığı, birim veya birim varyans ölçeklendirme olarak da isimlendirilen *oto-ölçeklendirme* yöntemine benzemektedir. Fakat ölçeklendirme faktörü olarak standart sapmanın karekökünü kullanılmaktadır. Son olarak pareto uygulandığında büyük kat değişiklikleri (son değer başlangıca oranını gösteren bir ölçü birimi), küçük kat değişikliklerinden daha fazla azaltıldığından, büyük kat değişiklikleri, ham verilere kıyasla daha az hakimiyet sergilemektedir [165].

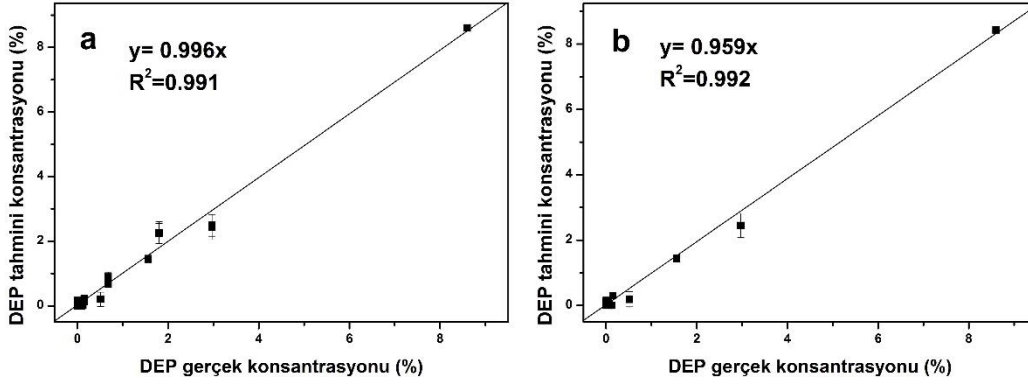
Geliştirilen modelin hesaplanan kalibrasyon ve validasyon R^2 , RMSEC, RMSECV, RMSEP Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Kalibrasyon R^2 değerleri 0,988-1,000 aralığında, validasyon R^2 değerleri ise 0,983-1,000 arasındadır. Ayrıca model için yöntem validasyonu LOD ve LOQ değerlerinin kalibrasyon grafiğinin eğimi ve cevabın standart hatasına göre hesaplanması ile yapılmıştır. [153]. Hesaplanan LOD ve LOQ değerleri Çizelge 4.4.'de verilmiştir. En küçük LOD değeri % 0,08 ile kamfen modelinde hesaplanmıştır. Bununla birlikte en büyük LOD değeri de % 1,47 ile karvakrol bileşiğine ait model için hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. Uçucu yağların Raman spektrumları ile geliştirilen PLS modelinin istatistiksel verileri ve yöntem validasyon değerleri (n=81)

Bileşen	Kalibrasyon R ²	Validasyon R ²	RMSEC	RMSECV	RMSEP	LOD (%)	LOQ (%)	Çalışılan konsantrasyon aralığı (%)
α-terpinen	0,990	0,988	0,027	0,046	0,029	0,089	0,271	0,00-1,11
γ-terpinen	0,988	0,983	0,028	0,066	0,036	0,095	0,288	0,00-5,57
limonen	0,999	0,997	0,114	0,805	0,299	0,383	1,162	0,03-18,39
ρ-simen	0,996	0,990	0,080	0,344	0,163	0,239	0,725	0,00-4,12
mirsen	1,000	0,996	0,107	0,420	0,331	0,333	1,008	0,00-38,89
α-pinen	1,000	0,995	0,660	1,393	0,291	0,286	0,866	0,04-43,93
β-pinen	1,000	0,990	0,033	0,419	0,347	0,107	0,324	0,00-9,05
sabinen	0,997	0,997	0,096	0,795	0,126	0,273	0,827	0,00-6,82
karen	1,000	0,999	0,040	0,155	0,572	0,112	0,339	0,00-20,15
kamfen	0,999	0,999	0,023	0,169	0,023	0,078	0,236	0,01-3,34
terpineol	0,998	0,990	0,174	0,575	0,410	0,587	1,779	0,00-16,15
linalol	1,000	0,999	0,243	0,696	0,396	0,798	2,418	0,00-53,77
linalil asetat	0,999	0,998	0,173	0,709	0,197	0,344	1,043	0,00-22,25
borneol	0,999	0,995	0,099	0,444	0,149	0,300	0,909	0,00-10,23
metil öjenol	0,998	0,998	0,111	0,231	0,191	0,345	1,046	0,00-11,62
karvon	1,000	1,000	0,264	0,716	0,428	0,710	2,152	0,00-76,61
kafur	0,999	0,992	0,162	0,680	0,262	0,480	1,456	0,00-22,21
arcurcumen	1,000	1,000	0,104	0,720	0,177	0,257	0,779	0,00-28,05
ökaliptol	1,000	1,000	0,274	0,808	0,205	0,823	2,493	0,00-71,15
timol	0,997	0,988	0,041	0,133	0,072	0,108	0,326	0,00-2,61
karvakrol	1,000	0,999	0,458	0,869	0,509	1,467	4,446	0,00-74,20
estragol	1,000	0,999	0,375	1,037	0,646	1,043	3,160	0,00-69,34
β-karyofillen	0,999	0,989	0,325	3,605	1,563	1,001	3,034	0,00-48,52
zingiberen	1,000	1,000	0,140	0,956	0,199	0,294	0,892	0,00-40,11

Son olarak nane örneklerinden birinin dışında tüm ticari örneklerde saptanan dietil ftalat için PLS modeli geliştirilmiştir. Geliştirilen PLS modeline ait kalibrasyon ve validasyon grafikleri Şekil 4.25.'de verilmiştir. Ticari uçucu yağlarında dietil ftalat oranı GC-MS analizi ile % 0,00-8,60 oranlarında tespit edilmiştir. Model oluşturulurken pareto ve normalizasyon ön işlemleri seçilmiştir. Kalibrasyon ve validasyon için R² değerleri, 0,991 ve 0,992 bulunmuştur. Ayrıca RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri sırasıyla % 0,135, % 0,327, % 0,154 bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri de % 0,41 ve % 1,25 olarak hesaplanmıştır. Benzil alkol ve DPG kalibrasyonları için daha büyük örnek data setine ihtiyaç duyulmuştur. Raman spektroskopisi ve GS-MS sonuçlarının ilişkilendirilmesi ile oluşturulan DEP

kalibrasyonu ile ticari uçucu yağlarda bulunan katkı maddelerinin daha ileri çalışmalar ile araştırılabileceği gösterilmiştir.



Şekil 4.25. DEP bileşiğinin bilinen konsantrasyonu ile PLS modelinin tahmin ettiği değerlerin karşılaştırılması a) kalibrasyon grafiği b) validasyon grafiği

Literatür ile karşılaştırıldığında terpenoid tahmin sonuçlarının daha başarılı olduğu görülmüştür. Ayrıca daha önceki çalışmalarda bu kadar farklı türde bitki çeşiti kullanılarak terpenoid araştırması yapılmamıştır. Ökalyptus yağlarında ökalyptol miktarının araştırılması için FT-Raman, Raman ve ATR-IR spektroskopileri kullanılmış, geliştirilen PLS modeli ile ökalyptol miktarları sırasıyla 0,92, 0,81, 0,95 R^2 değerleri ile tahmin edilmiştir [166]. ATR-IR ve NIR Raman spektral verisi ile oluşturulan PLS modeli ile çeşitli sitrus uçucu yağlarında limonen, mirsen, α -pinen, β -pinen, sabinen, γ -terpinen bileşikler sırasıyla 0,999, 0,938, 0,992, 0,998, 0,980, 0,998, 0,998 R^2 değerleri ile tahmin edilmiştir [167]. Fesleğen kemotiplerinde ATR-IR ve NIR spektroskopisi ile yapılan bir çalışmada ökalyptol, linalol, estragol, timol, öjenol, metil öjenol ve β -karyofillen bileşiklerin araştırılmış, iki spektroskopik metodun terpenoid bileşimini kemometrik metotlar ile tahminindeki başarısı karşılaştırılmıştır. Tahmin değerleri 0,930-1,000 arası bulunmuştur. Karabiber uçucu yağlarında yapılan terpenoid tespiti çalışmasında Raman spektroskopisi ile elde edilen veriler PLS modeli geliştirilmiştir. α -pinen, β -pinen, sabinen, mirsen, δ -3-karen, limonen ve β -karyofillen için tahmin başarısı için R^2 değerleri sırasıyla 0,95, 0,97, 1,00, 0,99, 0,99, 0,95, 0,99 bulunmuştur [134]. Ayrıca kekik uçucu yağları için de çeşitli terpenoid bileşimi araştırmaları PLS

kullanılarak yapılmıştır [102]. Bu çalışmalar kapsamında kekik kemotiplerinin ayrımı araştırılmıştır.

Literatür incelendiğinde, uçucu yağlarda spektroskopik yöntemler ve kemometrinin birlikte kullanımı ile terpenoid miktarının tahminine yönelik çalışmalara yeterince yer verilmemiştir. Çalışmalar daha çok tür ayrımı veya uygulanan referans yöntem sonuçları ile spektrumu (band tayini yaparak) ilişkilendirme üzerine yapılmış kapsamlı bir terpenoid bileşimi analizi ortaya konmamıştır [13, 14, 163, 168]. Terpenoid bileşen kantifikasyonuna yer veren çalışmalar da Raman spektroskopisi ve kemometrinin birlikte çalışılması ile ortaya konan tahmin hassasiyetine bu çalışmada olduğu gibi yaklaşmamıştır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında dokuz farklı baharat türünden elde edilen uçucu yağlar birlikte değerlendirilmiş ve tamamından elde edilen spektral veri kullanılarak bir PLS modeli geliştirilmiştir. 24 terpenoid başarıyla tahmin edilmiştir (< % 1,47 LOD değeri). Literatürde varolan kemometrik yöntemler ile yapılan kantitatif araştırmalar genellikle tek bir türün araştırılması ile sınırlı kalmış veya gerçek örnek denemeleri yapılmamıştır. Bella ve ark. [169] ftalat bileşiklerini hem üretim hacmi hem de satış hacmi bakımından en büyük plastikleştirici ajan grubunu olarak bildirmiş, politropik toksin (genel toksin) olduğuna geniş olduğuna değinmişlerdir (Hepatotoksiktir, gastrointestinal sistemde hasara neden olurlar ve kanserojendirler). Çalışmalarında ayrıca sitrus uçucu yağlarında bazı dietil ftalat türevlerini saptamışlar ve ftalat taşımasının oldukça yaygın olduğuna değinmişlerdir [169]. Tez çalışması kapsamında ticari olarak satışı yapılan uçucu yağların incelenmesi ile yalnızca DEP, DPG ve benzil alkol gibi katkı maddelerinin değil sabit yağlarında uçucu yağlara katıldığı tespit edilmiştir. Daha önce uçucu yağların analizine yönelik yapılan çalışmalarda ticari örneklerin taşımasına yönelik konulara değinmişler fakat spektroskopik yöntemleri ile analizini gerçekleştirmemişlerdir. Tez kapsamında geliştirilen analiz metodu ticari olarak satışı yapılan uçucu yağlardaki katkı maddelerinin ve sabit yağ karışımlarının tespitine yönelik hızlı bir analiz yöntemi olarak sunulmuştur.

5. SONUÇ VE YORUM

Tez kapsamında değerlendirilen bazı aromatik bitkilerin ve uçucu yağların sınıflandırılması, terpenoid ve mineral içeriklerinin araştırılması için spektroskopik yöntemler ve kemometri birlikte kullanılarak hızlı, kolay, doğaya zarar vermeyen (yeşil kimya) bir analiz metodu geliştirilmeye çalışılmıştır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında baharat olarak kullanılan ardıç, biberiye, defne, fesleğen, karabiber, kekik, lavanta, nane, zencefil olmak üzere dokuz farklı aromatik bitki türünün üç farklı kaynaktan temini sağlanmıştır. Bitkiler öğütülüp, pellet formuna getirilerek spektroskopik analize hazır hale getirilmiştir.

Raman spektroskopisi ile analiz edilen baharatların pellet formları işlenebilir spektrumlar sağlamamıştır. Bitki örneklerinin Raman spektrumu analizleri sırasında floresans özelliğe sahip biyomateryallerin spektrumlarının Stokes pikleri ile girişim yapması sebebi ile parazit meydana gelmiş ve elde edilen spektrum kemometrik analize uygun bulunmamıştır. NIR spektroskopisi analizlerinde 4000-10000 cm^{-1} dalga sayısı aralığı kullanılmış, 4255, 4313, 4744, 5185, 5644, 6854, 8290 cm^{-1} dalga sayılarındaki karakteristik absorpsiyon bandları gözlenmiştir. Baharatların sınıflandırılması için 76 baharat örneğine ait NIR spektrumunun tamamı kullanılarak PCA modeli geliştirilmiştir. Model başarısının artırılması için ikinci dereceden türev, ortalama merkez ve düzleştirme ön işlemleri uygulanmıştır. PCA modelinin geliştirilmesinde varyansın % 66,55'ini açıklayan PC1 ve varyansın % 14,87'sini açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır. Baharatlar arası ayırım net bir şekilde gözlenmiş bunun yanısıra aynı tür baharatlar arasında kemotip ayırımı da GC-MS sonuçlarına paralel olarak gözlemlenebilmiştir. 81 baharat örneğine ait NIR spektrumları ve referans yöntem olarak baharatların uçucu yağlarının GC-MS analiz sonucunda elde edilen terpenoid içerikleri, PLS modelini oluşturan bağımlı ve bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Geliştirilen PLS modelinde 24 terpenoid için kalibrasyon R^2 değeri 0,984-1,000 aralığında, validasyon R^2 değeri ise 0,963-1,000 bulunmuştur. RMSEC değeri % 0,029-3,028, RMSECV değeri % 0,110-5,280, RMSEP değeri % 0,046-3,458 tespit edilmiştir. Ayrıca LOD ve LOQ değerleri de hesaplanmış sırası ile, % 0,09-3,96 ve % 0,28-11,98 aralıklarında bulunmuştur. RMSEP değeri % 1'in üzerinde olan terpenoidler linalol (% 1,403), ökaliptol (% 1,605), karvakrol (% 3,458), estragol (% 2,562) olup, diğer terpenoidlerin RMSEP değerleri % 1'in altında tespit edilmiştir. RMSEP

değerleri % 1'in üzerinde olan terpenoidlerin LOD değerleri de beklenildiği üzere diğerlerinden yüksek bulunmuştur. Terpenoid kantifikasyonu için geliştirilen modeller arasında hassasiyeti en yüksek model (LOD değeri % 0,09) α -terpinen için bulunmuştur.

LIBS spektroskopisi analizlerinde 186,260-886,600 nm dalga boyu araştırılmıştır. LIBS spektrumlarında Ca II 393,360, Ca II veya Al 396,821, Ca II veya K II 422,626, Mg I 518,453, Fe I 527,096, Ca I 558,096, Na I 589,742, Ca II 612,364, Ca II 616,325, Ca II 644,041, Ca II 646,384, H I 656,951, Ca I 714,901, N I 744,430, Zn II 747,110, K I 766,568, K I 770,000, O I 777,435, Na I 819,705, N I 821,826, Ca II 854,372 nm dalga boylarında elementler tespit edilmiştir. LIBS spektrumlarından yararlanılarak 75 baharat örneği için PCA modelleri geliştirilmiştir. Elementel kompozisyonları benzer olsa da baharatlar mineral yoğunluklarına göre dört gruba ayrılmıştır. Nane, fesleğen ve kekik en şiddetli emisyon bandlarına sahipken, lavanta, defne ve ardıç şiddeti en düşük emisyon bandlarına sahip olmuştur. Geliştirilen PCA modeli için varyansın % 92,74'ünü açıklayan PC1 ve varyansın % 3,34'ünü açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır. PCA modeli ile aynı baharat grupları arasında kümeleşme eğilimi görülmüştür. Bununla birlikte daha net bir ayırım için veri setinde birbirine yakın kümeleşen baharat türleri için ayrıca bir alt grup PCA modeli geliştirilmiştir. Defne, lavanta ve ardıç için geliştirilen model için varyansın % 60,57'sini açıklayan PC1 ve varyansın % 8,79'ünü açıklayan PC2 temel bileşenleri, kekik ve biberiye için geliştirilen model için varyansın % 37,75'ini açıklayan PC1 ve varyansın % 12,82'sini açıklayan PC2 temel bileşenleri, karabiber ve zencefil için geliştirilen model için varyansın % 27,40'ını açıklayan PC1 ve varyansın % 16,58'ini açıklayan PC2 temel bileşenleri, nane ve fesleğen için geliştirilen model için varyansın % 98,72'ini açıklayan PC1 ve varyansın % 0,07'ünü açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır. Alt grupların sınıflandırılması net bir şekilde ortaya konulmuştur.

Tez çalışmasının ikinci kısmında aromatik bitkilerden hidrodistilasyon yolu ile uçucu yağ elde edilmiştir. Distilasyonu yapılan uçucu yağların ve ticari olarak satışı yapılan ticari örneklerin bileşen tespiti ve kantifikasyonu için referans yöntem olarak seçilen GC-MS analizleri yürütülmüştür. GC-MS sonuçları değerlendirildiğinde laboratuvar ortamında gerçekleştirilen hidrodistilasyon

ürünlerinin uçucu bileşik kompozisyonu ve oranları literatür ile paralellik göstermiştir. Ayrıca karabiber uçucu yağlarında iki farklı kemotip ortaya çıkmıştır. Uçucu yağların sınıflandırılması ve terpenoid kantifikasyonu için Raman spektroskopisi ve kemometri birlikte kullanılmıştır. Raman spektroskopisi analizlerinde 200-2000 cm^{-1} dalga sayısı aralığı kullanılarak PLS ve PCA modelleri geliştirilmiştir. Laboratuvar ortamında distilasyonu yapılan uçucu yağlar ve ticari olarak satışı yapılan uçucu yağların Raman spektrumlarında belirgin farklar gözlenmiştir. Laboratuvar ortamında distile edilen uçucu yağlar kendi içinde değerlendirildiğinde spektral intensite farklılıkları GC-MS sonuçları ile de paralellik göstermiştir. Spesifik olarak bir terpenoid içeriği daha düşük uçucu yağlarda karşılık olarak bu yağların Raman spektrumlarındaki o terpenoide ait karakteristik bandın da daha düşük şiddette olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte ticari uçucu yağ örneklerinin GC-MS sonuçlarında bazı terpenoidler daha yüksek oranda görüldüğü halde Raman intensitelerinin düşük olması, GC-MS sonuçlarının toplam uçucu bileşen üzerinden oran vermesinden ve ticari örneklerin bileşen kompozisyonunun homojen dağılım göstermemesinden kaynaklandığı yorumu yapılmıştır. Dolayısı ile GC-MS sonuçlarında literatürle belirgin bir karşıtlık olmayan ticari uçucu yağ örneklerinde dahi gözlemlenen bu intensite düşüklüğü bu uçucu yağlarda yabancı madde olabileceği yorumunu getirmiştir. Ayrıca bazı ticari örneklerin GC-MS sonuçlarında ortaya çıkan plastikleştirici ve çoğaltıcı olarak kozmetikte kullanılan benzil alkol, dietil ftalat (DEP) ve dipropilen glikol (DPG) Raman spektrumlarında yabancı bandlar olarak gözlenmiştir.

Laboratuvarda distile edilen ardıç uçucu yağları ve ticari ardıç uçucu yağları karşılaştırıldığında, Raman spektrumlarında bazı terpenoidlere ait karakteristik bandlarda düşük intensite gözlenmiştir. Bununla birlikte ticari örneklerde yabancı bir Raman bandına rastlanmamıştır.

Laboratuvarda distile edilen biberiye uçucu yağları ve ticari biberiye uçucu yağları karşılaştırıldığında, Raman spektrumlarında bazı terpenoidlere ait karakteristik bandlarda düşük intensite gözlenirken, büyük oranda karakteristik band kayıpları ve yabancı Raman bandları dikkat çekmiştir. Bununla birlikte özellikle 1000 cm^{-1} dalga sayısından sonra gözlenen spektral özellikler yemeklik sabit yağların (ayçiçek, zeytin ve mısır yağları) karakteristik Raman spektrumları ile büyük benzerlik göstermiştir.

Defne uçucu yağları için, laboratuvar ortamında distile edilen ve ticari uçucu yağların Raman spektrumlarında gözlenen farklılıklar ticari yağlar arasında değişiklik göstermiştir. Bir ticari yağda parmak izi spektrumu ve GC-MS sonuçları literatürle uyumlu iken bir diğesinde yabancı Raman bandları ve GC-MS analizinde beklenmeyen bileşik konsantrasyonları gözlenmiştir. GC-MS analizinde yüksek oranda α -pinen terpenoidinin ortaya çıkması Raman spektrumunda da gözlenmiştir. Dolayısıyla, bu ticari defne uçucu yağında başka bir uçucu yağ karışımı olabileceği yorumu yapılmıştır.

Laboratuvarda distile edilen ve ticari fesleğen uçucu yağlarının GC-MS sonuçları ve Raman spektrumları benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte % 0,12 oranında dietil ftalata GC-MS sonuçlarında rastlanmıştır.

Karabiber uçucu yağları değerlendirildiğinde laboratuvar ortamında distile edilen ve ticari uçucu yağlara ait GC-MS analiz sonuçları ve Raman spektrumları oldukça farklıdır. Ticari örneklerin Raman spektrumları yemeklik bitkisel yağlar ile benzerlik göstermiştir. Uçucu yağ olarak satışı yapılan bu örneklerle sabit yağ karıştırıldığı yorumu yapılmıştır. Ayrıca yağlardan birinde % 50 oranında benzil alkol, % 0,75 oranında propilen glikol tespit edilmiştir. Bir diğere ticari örnekte ise % 8,60 oranında dietil ftalat tespit edilmiştir.

Laboratuvarda distile edilen ve ticari kekik uçucu yağları karşılaştırıldığında büyük oranda Raman intensite farkları gözlenmiştir. Bununla birlikte GC-MS sonuçlarında benzer bilgiler sunmuştur. Karakteristik majör bileşenler daha düşük konsantrasyonda görülmüştür.

Lavanta örnekleri değerlendirildiğinde, ticari örneklerin oldukça başka bir Raman spektrumu ortaya çıkardığı görülmüştür. GC-MS sonuçları dikkate alındığında ticari lavanta örneklerinde % 22-23 dolaylarında dipropilen glikole rastlanmıştır.

Farklı kaynaklardan toplanmış ve laboratuvarda distile edilen nane örneklerinin her birinin karvon kemotipi olması buna karşın, ticari örneklerde mentol terpenoidinin oldukça yüksek çıkması ticari örneklerin mentol kemotipi olduğunu düşündürmüştür. Ticari örneklerin GC-MS analizlerinde yüksek oranda çıkan mentol ve menton terpenoidleri bu örneklerle ait Raman bandlarında da gözlenmiştir. Bununla birlikte Nane baharatı olarak satışı yapılan örneklerin karvon kemotipi olduğu (mentol içermiyor ya da eser miktarda içeriyor) yorumu yapılmıştır.

Ticari zencefil örneklerine ait GC-MS analizlerinde karakteristik terpenoidlere rastlanmamış veya beklenenden oldukça az miktarda rastlanmıştır. Raman spektrumları değerlendirildiğinde ise yemeklik bitkisel yağlara ait parmak izi spektrumu görülmüştür. Ticari olarak satışı yapılan zencefil uçucu yağlarında sabit yağ karışımları vardır yorumu yapılmıştır.

81 örneğe ait Raman spektrumları ile geliştirilen PLS modelinde 24 terpenoid için kalibrasyon R^2 değeri 0,988-1,000 aralığında, validasyon R^2 değeri ise 0,983-1,000 bulunmuştur. RMSEC değeri % 0,023-0,660, RMSECV değeri % 0,046-3,605, RMSEP değeri % 0,023-1,563 tespit edilmiştir. Yöntem validasyonu için hesaplanan LOD ve LOQ değerleri de sırası ile % 0,08-1,47 ve % 0,24-4,45 bulunmuştur. RMSEP değeri % 1'den yüksek tespit edilen yalnızca karyofillen (% 1,001) terpenoidi olmuştur. Beklenildiği üzere bu terpenoide ait LOD değerleri diğerlerine oranla daha yüksek hesaplanmıştır. Kurulan modellerde hassasiyeti en yüksek model (LOD değeri % 0,08) kamfen için bulunmuştur. Bununla birlikte karvakrol ve estragol için hesaplanan LOD değeride 1'den yüksek bulunmuştur.

81 örneğin Raman spektrumu kullanılarak PCA modeli geliştirilmiştir. Oluşturulan model için varyansın % 30,32'sini açıklayan PC1 ve varyansın % 15,95'ini açıklayan PC3 temel bileşenleri seçilmiştir. Model geliştirilirken denenen önışlem yöntemlerinden ikinci dereceden türev ve detrend önışlemleri en başarılı bulunmuştur. Ayrıca biberiye, karabiber ve zencefil ticari yağlarında görülen yemeklik bitkisel yağlar ile olan Raman spektrumu benzerliği için PCA modelleri geliştirilmiştir. Karabiber grubu için oluşturulan model için varyansın % 33,10'unu açıklayan PC1 ve varyansın % 30,31'ini açıklayan PC2, biberiye grubu için oluşturulan model için varyansın % 75,15'ini açıklayan PC1 ve varyansın % 15,11'ini açıklayan PC2, zencefil grubu için oluşturulan model için varyansın % 53,21'ini açıklayan PC1 ve varyansın % 38,96'sını açıklayan PC2 temel bileşenleri kullanılmıştır. PCA grafikleri incelendiğinde, karabiber ve biberiye gruplarında ticari örnekler sabit yağlar ve uçucu yağlar arasında konumlanmıştır. Bununla birlikte ticari zencefil örneklerinin Raman spektrumlarının tamamının sabit yağ benzeri olması PCA sonucu da ortaya çıkmış ve ticari örnekler sabit yağ örnekleri ile birlikte kümeleşme davranışı göstermiştir.

Uçucu yağların analizi için birçok spektroskopik metot karşısında, Raman spektroskopisinin belirgin avantajı örneklerin optik netliğe sahip olmasının gerek

olmadığının yanı sıra sıvı örnekler için kolay analiz yapılabilmesi olmuştur. Raman spektroskopisinde en yaygın problem, bazı örneklerdeki floresansdan kaynaklanan parazit oluşturması ve bu parazitin bazen spektrumu tamamen anlaşılması güç bir hale getirmesidir. Bu gibi durumlarda biyolojik örnekte bu etkiyi ortadan kaldırmak için yakın kızılötesi (NIR) kullanılmaktadır. Tez kapsamında da uçucu yağlar Raman spektroskopisinde sorunsuz analiz edilirken baharat örneklerinin Raman spektroskopisi ile analizinde benzer bir etki görülmüş ve baharat örneklerinin analizleri NIR spektroskopisi ile yürütülmüştür. Terpenoid analizleri için her iki yöntemden de elde edilen spektral veri ile oluşturulan kalibrasyon modellerinin sağladığı sonuçlar tatmin edici olmuştur. LIBS analizleri ile baharatların mineral içeriğinin araştırılmasının olanaklı olduğu görülmüş, LIBS spektrumları ile geliştirilen PCA modelindeki ayırım NIR spektrumları ile oluşturulan PCA modeli ile sağlanan ayırımdan daha tatmin edici bulunmuştur. Rutin baharat analizi için LIBS ve NIR spektroskopisinin birlikte kullanabileceği görülmüştür. Uçucu yağların Raman spektrumları ile geliştirilen PLS modeli ile test örneklerinde % 0,023-1,563 arasında hata tahmin değeri ile % 98 in üzerinde tahmin yeteneği ortaya konulmuştur. Piyasadaki uçucu yağ analizleri için Raman spektroskopisinin hızlı, kolay ve kimyasal atıksız bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] M. Tanker and N. Tanker, *Farmakognozi*, Ankara Üniversitesi Yayınları, Ankara, **1991**.
- [2] A. Akgül, Erzurum'da yetişen aromatik bitkilerin uçucu yağ verimleri ile bazılarında ana uçucu bileşenlerin araştırılması, *Journal of the Faculty of Agriculture*, 18, 1-4, **2011**.
- [3] N. Sadıkoğlu, *Cumhuriyet dönemi türk etnobotanik araştırmalar arşivi*, Yüksek Lisans, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, **1998**.
- [4] S. Başaran, Elmalı yöresinde doğal olarak yetişen bazı bitkilerin etnobotanik özellikleri, *Batı Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Dergisi, Çevre ve Orman Bakanlığı*, 211, 5, **2003**.
- [5] G. Kendir and A. Güv, Etnobotanik ve Türkiye'de yapılmış etnobotanik çalışmalara genel bir bakış, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 30, 1, 49-80, **2010**.
- [6] M. Clay and M. Muggeridge, Quality specifications for herbs and spices, *Handbook of herbs and spices*, vol.1, (Eds:K. V. Peter), Woodhead Publishing Limited, London, 13-21, **2001**.
- [7] M. G. Sajilata and R. S. Singhal, Quality indices for spice essential oils, *Handbook of Herbs and Spices*, (Eds:K. V. Peter), Woodhead Publishing, 42-54, **2012**.
- [8] Ü. Karık and M. Öztük, Uçucu yağ sektörünün ulusal ekonomimizdeki yeri, sorunları ve çözüm önerileri, *Alatırım, Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü*, 9, 2, **2010**.
- [9] S. Lohumi, S. Lee, H. Lee, and B.-K. Cho, A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration, *Trends in Food Science & Technology*, 46, 1, 85-98, **2015**.
- [10] E. Y. Backheet, Micro determination of eugenol, thymol and vanillin in volatile oils and plants, *Phytochemical Analysis*, 9, 3, 134-140, **1998**.
- [11] H. Schulz and M. Baranska, Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 43, 1, 13-25, **2007**.
- [12] M. Baranska *et al.*, Vibrational spectroscopic studies to acquire a quality control method of Eucalyptus essential oils, *Biopolymers*, 78, 5, 237-248, **2005**.
- [13] G. Gudi, A. Kraehmer, H. Krueger, L. Hennig, and H. Schulz, Discrimination of fennel chemotypes applying ir and raman spectroscopy: Discovery of a new gamma-asarone chemotype, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 16, 3537-3547, **2014**.
- [14] H. Schulz, G. Özkan, M. Baranska, H. Krüger, and M. Özcan, Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 39, 2, 249-256, **2005**.
- [15] H. Schulz, B. Schrader, R. Quilitzsch, S. Pfeffer, and H. Krüger, Rapid classification of basil chemotypes by various vibrational spectroscopy

- methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 9, 2475-2481, **2003**.
- [16] F. J. D. September, *Detection and quantification of spice adulteration by near infrared hyperspectral imaging*, Master, Department of Food Science Faculty of Agri Sciences, Stellenbosch University, **2011**.
- [17] F. Çelik *et al.*, Therapeutic effects of thymoquinone in a model of neuropathic pain, *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*, 76, 11-16, **2014**.
- [18] S. A. Haughey, P. Galvin-King, Y. C. Ho, S. E. J. Bell, and C. T. Elliott, The feasibility of using near infrared and Raman spectroscopic techniques to detect fraudulent adulteration of chili powders with Sudan dye, *Food Control*, 48, 75-83, **2015**.
- [19] S. Lohumi *et al.*, Detection of starch adulteration in onion powder by FT-NIR and FTIR spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9246–9251, **2014**.
- [20] D. C. V. Anibal, L. F. Marsal, M. P. Callao, and R. I. Itziar, Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate analysis as a screening tool for detecting Sudan I dye in culinary spices, *Spectrochimica Acta Part A*, 87, 135-141, **2012**.
- [21] A. Zalacain, E. M. Diaz-Plaza, I. Blazquez, M. Carmona, and G. L. Alonso, FT-NIR spectrometry approach for determining Saffron origin, presented at the *Proceedings Of The 1st International Symposium On Saffron Biology And Biotechnology*, **2004**.
- [22] M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernandez-Lopez, and J. A. Perez-Alvarez, Spices as functional foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 1, 13-28, **2011**.
- [23] S. Raghavan, *Handbook of spices, seasonings and flavorings*, CRC Press, Florida, 330, **2006**.
- [24] R. Tisserand and R. Young, Essential oil profiles, *Essential Oil Safety*, Churchill Livingstone, St. Louis, 187-482, **2014**.
- [25] N. R. Farnsworth and D. D. Soejarto, Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs, *Economic Botany*, 39, 3, 231-240, **1985**.
- [26] S. J. Ameh¹, O. O. Obodozie, U. S. Inyang, M. S. Abubakar, and M. Garba, Current phytotherapy - A perspective on the science and regulation of herbal medicine, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 2, 72-81, **2010**.
- [27] S. Bektaşoğlu, *Uçucu yağlar*, T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi Raporu, **2006**.
- [28] E. Yıldırım, *Melisa, adaçayı ve nane yağlarının bilimsel olarak incelenmesi, piyasa analizi ve kalite tayini*, Yüksek lisans, Eczacılık Fakültesi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, **2014**.
- [29] E. J. Parry, Monographs on Essential oils, *The Chemistry of Essential oils and Artificial Perfumes*, vol.1, Forgotten Book, **2012**.

- [30] E. V. S. Prakasa Rao, C. T. Gopinath, R. S. Ganesh Rao, and S. Ramesh, Agronomic and distillation studies on rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in a semi arid tropical environment, *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 6, 3, 25-30, **1999**.
- [31] B. Sasikumar, Rosemary, *Handbook of herbs and spices*, vol.2, (Eds:K. V. Peter), CRC Press, Florida, **2004**.
- [32] S. Kumar, J. Singh, and A. Sharma, Bay leaves, *Handbook of herbs and spices*, vol.1, (Eds:K. V. Peter), CRC Press, Florida, 52-59, **2001**.
- [33] M. Syed, M. Riaz, and F. M. Chaudhuri, The antibacterial activity of the essential oils of the Pakistani *Acorus calamus*, *Callistemon lanceolatus* and *Laurus nobilis*, *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 34, 11, 456-8, **1991**.
- [34] P. J. Rahari Velomanaana, G. P. Terrom, J. P. Bianchini, and P. Coulanges, Study of the antimicrobial action of various essential oils extracted from Malagasy plants. II. Lauraceae, *Archives De l'Institut Pasteur De Madagascar*, 56, 1, 261-71, **1989**.
- [35] J. T. MacGregor, L. L. Layton, and R. G. Buttery, California bay oil II. biological effects of constituents, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 22, 77-8, **1974**.
- [36] F. U. Afifi, E. Khalil, S. O. Tamini, and A. Sisi, Evaluation of the gastro-protective effect of *Laurus nobilis* seeds on ethanol induced gastric ulcer in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 58, 1, 9-17, **1997**.
- [37] L. A. Ashaeva, L. I. Anchikova, N. A. Alkanova, and V. V. Buzuev, The study of sugar decreasing action of *Laurus nobilis* leaves, *Farmatsiya*, 33, 49-51, **1984**.
- [38] S. Yanardağ and S. Can, Effect of *Laurus nobilis* L. leaves on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic rabbits, *Chemica Acta Turcica*, 22, 169-75, **1994**.
- [39] P. N. Ravindran and J. A. Kallapurackal, Black pepper, *Handbook of herbs and spices*, vol.1, (Eds:K. V. Peter), CRC Press, Cambridge, 62-110, **2001**.
- [40] E. Stahl-Biskup, Thyme, *Handbook of herbs and spices*, vol.2, (Eds:K. V. Peter), CRC Press, Florida, **2004**.
- [41] S. E. Kintzios, Oregano, *Handbook of herbs and spices*, vol.2, (Eds:K. V. Peter), CRC Press, Florida, **2004**.
- [42] M. T. Lis-Balchin, Lavender, *Handbook of herbs and spices*, vol.2, (Eds:K. V. Peter), CRC Press, Florida, **2004**.
- [43] P. Pushpangadan and S. K. Tewari, Peppermint, *Handbook of herbs and spices*, vol.3, (Eds:K. V. Peter), CRC Press, Florida, 460-478, **2006**.
- [44] R. J. Grayer, G. C. Kite, F. J. Goldstone, S. E. Bryan, A. Paton, and E. Putievsky, Infraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*, *Phytochemistry*, 43, 5, 1033-1039, **1996**.

- [45] P. A. Vasala, Ginger, *Handbook of herbs and spices*, vol.1, (Eds:K. V. Peter), CRC Press, Cambridge, 195-205, **2001**.
- [46] E. Hernandez, Distillation, *Essential oils*, Academic Press, **2000**.
- [47] A. Yağcıoğlu, Defne yaprağının (*laurus nobilis* L.) farklı kurutma havası koşullarındaki kuruma teknikleri, Ege üniv. araştırma fonu proje raporu, Ege Üniv. Ziraat Fak. Tarım Mak. Bölümü, **1999**.
- [48] D. J. Charles and J. E. Simon, Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil, *Journal of the American Chemical Society for Horticulture Science*, 115, 3, 458-462, **1990**.
- [49] G. Takeoka, S. Ebeler, and W. Jennings, Capillary gas chromatographic analysis of volatile flavor compounds, *Characterization and Measurement of Flavor Compounds*, vol.289, American Chemical Society, 95-108, **1985**.
- [50] F. Chialva, G. Gabri, P. A. P. Liddle, and F. Ulian, Qualitative evaluation of aromatic herbs by direct head space (GC)² analysis. Applications of the method and comparison with the traditional analysis of essential oils, *Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects*, (Eds:N. Margaris, A. Koedam, and D. Vokou), Springer Netherlands, Dordrecht, 183-195, **1982**.
- [51] A. J. Burbott and W. D. Loomis, Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint, *Plant Physiology*, 42, 1, 20-28, **1967**.
- [52] R. Kasting, J. Andersson, and E. von Sydow, Volatile constituents in leaves of parsley, *Phytochemistry*, 11, 7, 2277-2282, **1972**.
- [53] M. Godefroot, P. Sandra, and M. Verzele, New method for quantitative essential oil analysis, *Journal of Chromatography A*, 203, 325-335, **1981**.
- [54] C. Bicchi, A. D'Amato, G. M. Nano, and C. Frattini, Improved method for the analysis of small amounts of essential oils by microdistillation followed by capillary gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 279, 409-416, **1983**.
- [55] K. H. C. Baser and G. Buchbauer, *Handbook of essential oils science, technology, and applications*, (Eds:K. H. C. Baser and G. Buchbauer), CRC Press, Florida, 991, **2009**.
- [56] R. Tisserand and R. Young, Constituent profiles, *Essential Oil Safety*, Churchill Livingstone, St. Louis, 483-647, **2014**.
- [57] M. Tanker and M. K. Sakar, Fitokimyasal analizler tanım, miktar tayini ve İzolasyon, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, 9, 134-140, **1998**.
- [58] R. Tisserand and R. Young, Essential oil composition, *Essential Oil Safety*, Churchill Livingstone, St. Louis, 5-22, **2014**.
- [59] Anonim, American spice trade association, spice adulteration, *White Papers Documents*, **2004**.
- [60] J. H. Kim and S. H. Baik, Molecular identification of economically motivated adulteration of red pepper powder by species-specific PCR of nuclear

- rDNA-its regions in garlic and onion, *Food Analytical Methods*, 9, 12, 3287-3297, **2016**.
- [61] K. Dhanya, S. Syamkumar, S. Siju, and B. Sasikumar, SCAR markers for adulterant detection in ground chilli, *British Food Journal*, 113, 4-5, 656-668, **2011**.
- [62] H. Sun, F. Wang, and L. Ai, Determination of banned 10 azo-dyes in hot chili products by gel permeation chromatograph-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1164, 1-2, 120-128, **2007**.
- [63] K. Dhanya and B. Sasikumar, Molecular marker based adulteration detection in traded food and agricultural commodities of plant origin with special reference to spices, *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 4, 1, 454-489, **2010**.
- [64] R. V. Sudershan, P. Rao, and K. Polasa, Food safety research in India: a review, *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2, 3, 412-433, **2009**.
- [65] Anonim, Association of official agricultural chemists international (AOAC), Adulterants in spices (Method 916.01), *AOAC Official methods of Analysis*, **2005**.
- [66] E. Çelik and Y. G. Çelik, Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5, 2, 1-6, **2007**.
- [67] F. Maudsley and K. G. Kerr, Microbiological safety of essential oils used in complementary therapies and the activity of these compounds against bacterial and fungal pathogens, *Supportive Care in Cancer*, 7, 2, 100-102, **1999**.
- [68] T. S. S. Dikshith, S. N. Kumar, G. S. Tandon, R. B. Raizada, and P. K. Ray, Pesticide residues in edible oils and oil seeds, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 42, 1, 50-56, **1989**.
- [69] C. J. Briggs and L. D. McLaughlin, Low-temperature thin-layer chromatography for detection of polybutene contamination in volatile oils, *Journal of Chromatography A*, 101, 2, 403-407, **1974**.
- [70] A. Bélanger, Residues of azinphosmethyl, cypermethrin, benomyl and chlorotalonil in monarda and peppermint oil, Leuven, Belgium, 67-74: International Society for Horticultural Science (ISHS), **1989**.
- [71] A. Kumar, G. Nadda, and A. Shanker, Determination of chlorpyrifos 20% EC (Dursban 20 EC) in scented rose and its products, *Journal of Chromatography A*, 1050, 2, 193-199, **2004**.
- [72] S. M. Garland, R. C. Menary, and N. W. Davies, Dissipation of propiconazole and tebuconazole in peppermint crops (*Mentha piperita* (Labiatae)) and their residues in distilled oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1, 294-298, **1999**.
- [73] D. Wabner, Purity and pesticides, *International Journal of Aromatherapy*, 5, 2, 27-29, **1993**.
- [74] E. C. Y. LiChan, The applications of Raman spectroscopy in food science, *Trends in Food Science & Technology*, 7, 11, 361-370, **1996**.

- [75] A. Ersöz, *Aletli analiz*, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, **2010**.
- [76] Y.-S. Li and J. S. Church, Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials, *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 1, 29-48, **2014**.
- [77] D. B. Chase and J. F. Rabolt, *Fourier transform Raman spectroscopy: from concept to experiment*, Academic Press, **1994**.
- [78] S. Keller, T. Löchte, B. Dippel, and B. Schrader, Quality control of food with near-infrared-excited Raman spectroscopy, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 346, 6, 863-867, **1993**.
- [79] H. Jin, Q. Lu, X. Chen, H. Ding, H. Gao, and S. Jin, The use of Raman spectroscopy in food processes: a review, *Applied Spectroscopy Reviews*, 51, 1, 12-22, **2016**.
- [80] R. S. Uysal, E. A. Soykut, I. H. Boyaci, and A. Topcu, Monitoring multiple components in vinegar fermentation using Raman spectroscopy, *Food Chemistry*, 141, 4, 4333-4343, **2013**.
- [81] Q. Wang, Z. Li, Z. Ma, and L. Liang, Real time monitoring of multiple components in wine fermentation using an on-line auto-calibration Raman spectroscopy, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 426-432, **2014**.
- [82] İ. H. Boyaci *et al.*, A rapid method for determination of the origin of meat and meat products based on the extracted fat spectra by using of Raman spectroscopy and chemometric method, *European Food Research and Technology*, 238, 5, 845-852, **2014**.
- [83] İ. H. Boyaci, H. T. Temiz, R. S. Uysal, H. M. Velioglu, R. J. Yadegari, and M. M. Rishkan, A novel method for discrimination of beef and horsemeat using Raman spectroscopy, *Food Chemistry*, 148, 37-41, **2014**.
- [84] H. M. Velioglu, H. T. Temiz, and I. H. Boyaci, Differentiation of fresh and frozen-thawed fish samples using Raman spectroscopy coupled with chemometric analysis, *Food Chemistry*, 172, 283-290, **2015**.
- [85] V. Baeten, P. Hourant, M. T. Morales, and R. Aparicio, Oil and fat classification by FT-Raman spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 7, 2638-2646, **1998**.
- [86] S. D. Velioglu, H. T. Temiz, E. Ercioglu, H. M. Velioglu, A. Topcu, and I. H. Boyaci, Use of Raman spectroscopy for determining erucic acid content in canola oil, *Food Chemistry*, 221, 87-90, **2017**.
- [87] P. Jentzsch, L. Ramos, and V. Ciobotă, Handheld Raman spectroscopy for the distinction of essential oils used in the cosmetics industry, *Cosmetics*, 2, 2, 162, **2015**.
- [88] M. Blanco and I. Villarroya, NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21, 4, 240-250, **2002**.
- [89] E. Deaville and P. Flinn, Near infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake, *Forage evaluation in ruminant nutrition.*, (Eds: D. Givens, E. Owen, R. Axford, and H. Omedi), CABI Publishing, Wallingford, 301-311, **2002**.

- [90] C. Miller, Chemical principles of near infrared technology, *Near infrared technology in the agricultural and food industries*, (Eds:P. Williams and K. Norris), American Association of Cereal Chemist, St. Paul, 9-29, **2001**.
- [91] B. G. Osborne, T. Fearn, P. H. Hindle, and P. T. Hindle, *Practical NIR Spectroscopy with applications in food and beverage analysis*, Longman Scientific & Technical, **1993**.
- [92] Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, and N. Jent, A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 3, 683-700, **2007**.
- [93] H. Huang, H. Yu, H. Xu, and Y. Ying, Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: a review, *Journal of Food Engineering*, 87, 3, 303-313, **2008**.
- [94] P. Williams, Implementation of near infrared technology, *Near infrared technology in the agricultural and food industries*, (Eds:P. Williams and K. Norris), American Association of Cereal Chemist, St Paul, 145-196, **2001**.
- [95] D. Cozzolino, R. Damberg, L. Janik, W. Cynkar, and M. Gishen, Review: Analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 14, 5, 279-289, **2006**.
- [96] W. McClure, Review: 204 years of near infrared technology: 1800–2003, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 11, 6, 487-518, **2003**.
- [97] G. D. Batten, Plant analysis using near infrared reflectance spectroscopy: the potential and the limitations, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38, 7, 697-706, **1998**.
- [98] B. M. Nicolai *et al.*, Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review, *Postharvest Biology and Technology*, 46, 2, 99-118, **2007**.
- [99] J. Workman, Near-infrared spectrophotometers, *Near infrared spectroscopy in agriculture*, (Eds:C. Roberts, J. Workman, and I. J. Reeves), ASA, CSSA, SSSA, Madison, 11-3, **2004**.
- [100] H. Schulz, H. H. Drews, R. Quilitzsch, and H. Kruger, Application of near infrared spectroscopy for the quantification of quality parameters in selected vegetables and essential oil plants, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, vol.6, (Eds:A. M. C. Davies), 125-130, **1998**.
- [101] B. Steuer, H. Schulz, and E. Läger, Classification and analysis of citrus oils by NIR spectroscopy, *Food Chemistry*, 72, 1, 113-117, **2001**.
- [102] H. Schulz, R. Quilitzsch, and H. Krüger, Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy, *Journal of Molecular Structure*, 661–662, 299-306, **2003**.
- [103] B. Sezer, G. Bilge, and I. H. Boyaci, Laser-induced breakdown spectroscopy based protein assay for cereal samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 49, 9459-9463, **2016**.

- [104] G. Bilge, H. M. Velioglu, B. Sezer, K. E. Eseller, and I. H. Boyaci, Identification of meat species by using laser-induced breakdown spectroscopy, *Meat Science*, 119, 118-122, **2016**.
- [105] S. Moncayo, J. D. Rosales, R. Izquierdo-Hornillos, J. Anzano, and J. O. Caceres, Classification of red wine based on its protected designation of origin (PDO) using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), *Talanta*, 158, 185-191, **2016**.
- [106] C. F. Begemann, P. Jander, and H. Wotruba, Laser-based online analysis of minerals, presented at the *Symposium Sensor Based Sorting*, Aachen Germany, **2012**.
- [107] D. Santos Jr *et al.*, Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: a review, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 71-72, 3-13, **2012**.
- [108] D. A. Cremers and A. K. Knight, Laser-induced breakdown spectroscopy, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, **2006**.
- [109] J. P. Singh and S. N. Thakur, *Laser-induced breakdown spectroscopy*, Elsevier Science, Amsterdam, **2007**.
- [110] J. A. Aguilera and C. Aragón, Characterization of laser-induced plasmas by emission spectroscopy with curve-of-growth measurements. Part II: Effect of the focusing distance and the pulse energy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63, 7, 793-799, **2008**.
- [111] G. Bilge, B. Sezer, K. E. Eseller, H. Berberoglu, A. Topcu, and I. H. Boyaci, Determination of whey adulteration in milk powder by using laser induced breakdown spectroscopy, *Food Chemistry*, 212, 183-188, **2016**.
- [112] F. Ma and D. Dong, A measurement method on pesticide residues of apple surface based on laser-induced breakdown spectroscopy, *Food Analytical Methods*, 7, 9, 1858-1865, **2014**.
- [113] V. Juvé, R. Portelli, M. Boueri, M. Baudelet, and J. Yu, Space-resolved analysis of trace elements in fresh vegetables using ultraviolet nanosecond laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63, 10, 1047-1053, **2008**.
- [114] L. C. Trevizan *et al.*, Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of micronutrients in plant materials, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 64, 5, 369-377, **2009**.
- [115] J. Wang, P. Zheng, H. Liu, and L. Fang, Classification of Chinese tea leaves by laser-induced breakdown spectroscopy combined with discriminant analysis method, *Analytical Methods*, 8, 3204-3209, **2016**.
- [116] M. d. S. Gomes, D. Santos Junior, L. C. Nunes, G. G. A. de Carvalho, F. de Oliveira Leme, and F. J. Krug, Evaluation of grinding methods for pellets preparation aiming at the analysis of plant materials by laser induced breakdown spectrometry, *Talanta*, 85, 4, 1744-1750, **2011**.
- [117] G. G. Arantes de Carvalho, D. Santos Junior, L. C. Nunes, M. d. S. Gomes, F. d. O. Leme, and F. J. Krug, Effects of laser focusing and fluence on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown

- spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 74-75, 162-168, **2012**.
- [118] F. M. V. Pereira, D. M. B. P. Milori, A. L. Venâncio, M. d. S. T. Russo, P. K. Martins, and J. Freitas-Astúa, Evaluation of the effects of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools, *Talanta*, 83, 2, 351-356, **2010**.
- [119] J. W. B. Braga, L. C. Trevizan, L. C. Nunes, I. A. Rufini, D. Santos Jr, and F. J. Krug, Comparison of univariate and multivariate calibration for the determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 65, 1, 66-74, **2010**.
- [120] M. d. G. Andrade Korn *et al.*, Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods: a review, *Applied Spectroscopy Reviews*, 43, 2, 67-92, **2008**.
- [121] R. Fantoni, L. Caneve, F. Colao, L. Fornarini, V. Lazic, and V. Spizzichino, Methodologies for laboratory Laser Induced Breakdown Spectroscopy semi-quantitative and quantitative analysis—a review, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63, 10, 1097-1108, **2008**.
- [122] L. C. Nunes *et al.*, Optimization and validation of a LIBS method for the determination of macro and micronutrients in sugar cane leaves, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25, 9, 1453-1460, **2010**.
- [123] A. Ciucci, M. Corsi, V. Palleschi, S. Rastelli, A. Salvetti, and E. Tognoni, New procedure for quantitative elemental analysis by laser-induced plasma spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 53, 8, 960-964, **1999**.
- [124] E. Tognoni, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, and V. Palleschi, Calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy: state of the art, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 65, 1, 1-14, **2010**.
- [125] I. Reinholds, V. Bartkevics, I. C. J. Silvis, S. M. van Ruth, and S. Esslinger, Analytical techniques combined with chemometrics for authentication and determination of contaminants in condiments: a review, *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 56-72, **2015**.
- [126] S. Esslinger, J. Riedl, and C. Fauhl-Hassek, Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control, *Food Research International*, 60, 189-204, **2014**.
- [127] J. M. Shaver, Chemometrics for Raman spectroscopy, *Handbook of Raman spectroscopy from the research laboratory to the process line*, (Eds: I. R. Lewis and H. G. M. Edwards), CRC Press, New York, 275-307, **2001**.
- [128] I. T. Jolliffe, *Principal component analysis*, Springer, New York, **2002**.
- [129] S. M. Clegg, E. Sklute, M. D. Dyar, J. E. Barefield, and R. C. Wiens, Multivariate analysis of remote laser-induced breakdown spectroscopy spectra using partial least squares, principal component analysis, and related techniques, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 64, 1, 79-88, **2009**.

- [130] J. Riedl, S. Esslinger, and C. Fauhl-Hassek, Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication, *Analytica Chimica Acta*, 885, 17-32, **2015**.
- [131] S. D. Velioglu, E. Ercioglu, H. T. Temiz, H. M. Velioglu, A. Topcu, and I. H. Boyaci, Raman spectroscopic barcode use for differentiation of vegetable oils and determination of their major fatty acid composition, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 93, 5, 627-635, **2016**.
- [132] Y. Garaude-Verdier, Use of near infrared spectroscopy to measure carnosic acid content in rosemary leaves, in *Proceedings 12th Near Infrared Conference*, Hamilton, New Zealand, 2007.
- [133] Y.-W. Wu, S.-Q. Sun, Q. Zhou, and H.-W. Leung, Fourier transform mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR) spectroscopy for rapid quality assessment of Chinese medicine preparation Honghua Oil, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 3, 498-504, **2008**.
- [134] H. Schulz, M. Baranska, R. Quilitzsch, W. Schütze, and G. Lösing, Characterization of peppercorn, pepper oil, and pepper oleoresin by vibrational spectroscopy methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9, 3358-3363, **2005**.
- [135] G. R. Burling-Claridge, S. E. Holroyd, and R. M. W. Sumner, Near infrared spectroscopy : proceedings of the 12th international conference, Auckland, New Zealand, 9th-15th April, 2005, Hamilton, N.Z.: New Zealand Near Infrared Spectroscopy Society.
- [136] H. R. Juliani *et al.*, Application of near-infrared spectroscopy in quality control and determination of adulteration of African essential oils, *Phytochemical Analysis*, 17, 2, 121-8, **2006**.
- [137] Anonim, *European pharmacopoeia*, Council of Europe, Strasbourg, 1387, **2000**.
- [138] N. Gierlinger and M. Schwanninger, The potential of Raman microscopy and Raman imaging in plant research, *Spectroscopy*, 21, 2, 69-89, **2007**.
- [139] M. Lutz and W. Mäntele, Vibrational Spectroscopy of Chlorophylls, *Chlorophylls*, (Eds:H. Scheer), CRC Press, Boca Raton, FL, **1991**.
- [140] K. Okada, E. Nishizawa, Y. Fujimoto, Y. Koyama, S. Muraishi, and Y. Ozaki, Nondestructive structural analysis of photosynthetic pigments in living rhodospirillum rubrum mutants by near-infrared fourier transform Raman spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 46, 3, 518-523, **1992**.
- [141] L. Salguero-Chaparro, A. J. Gaitán-Jurado, V. Ortiz-Somovilla, and F. Peña-Rodríguez, Feasibility of using NIR spectroscopy to detect herbicide residues in intact olives, *Food Control*, 30, 2, 504-509, **2013**.
- [142] A. M. C. Davies and A. Grant, Review: Near infra-red analysis of food, *International Journal of Food Science & Technology*, 22, 3, 191-207, **1987**.
- [143] S. E. Kays, W. R. Windham, and F. E. Barton, Prediction of total dietary fiber in cereal products using near-infrared reflectance spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 8, 2266-2271, **1996**.

- [144] H. Li *et al.*, Application of NIR and MIR spectroscopy for rapid determination of antioxidant activity of Radix Scutellariae from different geographical regions, *Phytochemical Analysis*, 27, 1, 73-80, **2016**.
- [145] Anonim, NIST, Atomic spectra database: National Institute of Standards and Technology, **2016**. [Online]. Available.
- [146] H. Marschner, Functions of mineral nutrients: macronutrients, *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, London, 229-312, **1995**.
- [147] H. Marschner, Functions of mineral nutrients: micronutrients, *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, London, 313-404, **1995**.
- [148] T. Naes, T. Isakson, T. Fearn, and T. A. Davies, *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*, NIR Publications, Chichester, 420, **2002**.
- [149] M. Adams, Chemometrics in analytical spectroscopy, *RSC Spectroscopy monographs*, vol.126, The Royal Society of Chemistry, Letchworth, 216, **1995**.
- [150] R. W. Kennard and L. A. Stone, Computer aided design of experiments, *Technometrics*, 11, 1, 137-8, **1969**.
- [151] A. Narin, Y. İşler, and M. Özer, Konjestif kalp yetmezliği teşhisinde kullanılan çapraz doğrulama yöntemlerinin sınıflandırıcı performanslarının belirlenmesine olan etkilerinin karşılaştırılması, *Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16, 48, 1-8, **2014**.
- [152] R. J. Barnes, M. S. Dhanoa, and S. J. Lister, Standard normal variate transformation and detrending of near-infrared diffuse reflectance spectra, *Applied Spectroscopy*, 43, 5, 772-777, **1989**.
- [153] P. Hubert *et al.*, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures - A SFSTP proposal - Part II, (in English), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 1, 70-81, **2007**.
- [154] S. F. Arnold, *The theory of linear models and multivariate analysis*, Wiley-Blackwell, USA, 476, **1981**.
- [155] A. Savitzky and M. J. E. Golay, Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Analytical Chemistry*, 36, 8, 1627-1639, **1964**.
- [156] K.-H. Kubeczka and V. Formáček, *Essential oil analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy*, Wiley, **2002**.
- [157] R. Rodriguez-Solana, D. J. Daferera, C. Mitsi, P. Trigas, M. Polissiou, and P. A. Tarantilis, Comparative chemotype determination of Lamiaceae plants by means of GC-MS, FT-IR, and dispersive-Raman spectroscopic techniques and GC-FID quantification, *Industrial Crops and Products*, 62, 22-33, **2014**.
- [158] Z. Kamaliroosta, L. Kamaliroosta, and A. H. Elhamirad, Isolation and identification of ginger essential oil, *Journal Of Food Biosciences And Technology*, 3, 3, 73-80, **2013**.

- [159] Z.-n. Yang *et al.*, Volatile phytochemical composition of rhizome of ginger after extraction by headspace solid-phase microextraction, petrol ether extraction and steam distillation extraction, *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 4, 2, 8, **2009**.
- [160] K. Cellat, *Bazı endemik bitkilerin uçucu yağ bileşenlerinin ekstrakte edilmesi ve İçeriklerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana, **2011**.
- [161] S. Lafhal, P. Vanloot, I. Bombarda, R. Valls, J. Kister, and N. Dupuy, Raman spectroscopy for identification and quantification analysis of essential oil varieties: a multivariate approach applied to lavender and lavandin essential oils, *Journal of Raman Spectroscopy*, 46, 6, 577-585, **2015**.
- [162] J. Omar, A. Sarmiento, M. Olivares, I. Alonso, and N. Etxebarria, Quantitative analysis of essential oils from rosemary in virgin olive oil using Raman spectroscopy and chemometrics, *Journal of Raman Spectroscopy*, 43, 8, 1151-1156, **2012**.
- [163] D. J. Daferera, P. A. Tarantilis, and M. G. Polissiou, Characterization of essential oils from Lamiaceae species by fourier transform Raman spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 20, 5503-5507, **2002**.
- [164] K. R. Strehle, P. Rösch, D. Berg, H. Schulz, and J. Popp, Quality control of commercially available essential oils by means of Raman spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 19, 7020-7026, **2006**.
- [165] R. A. van den Berg, H. C. J. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, and M. J. van der Werf, Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data, *BMC Genomics*, 7, 142-142, **2006**.
- [166] M. Baranska *et al.*, Investigation of eucalyptus essential oil by using vibrational spectroscopy methods, *Vibrational Spectroscopy*, 42, 2, 341-345, **2006**.
- [167] H. Schulz, B. Schrader, R. Quilitzsch, and B. Steuer, Quantitative analysis of various citrus oils by ATR/FT-IR and NIR-FT Raman spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 56, 1, 117-124, **2002**.
- [168] P. V. Jentsch and V. Ciobota, Raman spectroscopy as an analytical tool for analysis of vegetable and essential oils, *Flavour and Fragrance Journal*, 29, 5, 287-295, **2014**.
- [169] G. Di Bella, M. Saitta, M. Pellegrino, F. Salvo, and G. Dugo, Contamination of Italian citrus essential oils: presence of phthalate esters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3, 1009-12, **1999**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Elif Ercioğlu

Doğum Yeri : Eskişehir

Medeni Hali : Bekar

E-posta : elifercioglu@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Ünüversitesi Beytepe Kampüsü Araştırma Lab. 1

Eğitim

Lise : 75. Yıl Lisesi

Lisans : Uludağ Ünüversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Ünüversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (YDS : 86,25)

İç Deneyimi

2007 - Nestle A.ř.

2014 - TİKTA A.ř.

2015 - Unilever A.ř.

Deneyim Alanları

Spektroskopi, Kemometri

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş, Tebliğ ve /veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

..... GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 25/01/2017

Tez Başlığı / Konusu: Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Esansiyel Yağlar ve
Bakırda Bazı Kalite Özelliklerinin Spektrometrik Yöntemlerle Tespiti

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç ve e) Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 110 sayfalık kısmına ilişkin, 25/01/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 1.1 tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/danışman
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Elif ERGİOĞLU

Öğrenci No: 113219857

Anabilim Dalı: GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Programı: GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

25.01.2017

E. Ergioğlu

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. İsmail Hakkı Bayacı

(Unvan, Ad Soyad, İmza)