

173748

**ORIGANUM ONITES L. (KEKİK) YAĞ ALTI SUYUNUN
UÇUCU BİLEŞİKLERİ**

İLHAN BOYDAĞ

Doktora Tezi

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalı**

Şubat 2004

**Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İlhan BOYDAĞ'ın "*Origanum onites* L. (Kekik) Yağ Altı Suyunun Uçucu Bileşikleri" başlıklı Farmakognozi Anabilim Dalındaki, Doktora tezi 19.03.2004 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. K. Hüsnü Can BAŞER

Üye : Prof. Dr. Ekrem SEZİK

Üye : Prof. Dr. Neşe KIRIMER

Üye : Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN

Üye : Yard. Doç Dr. Kadriye BENKLİ

Anadolu Üniversitesi Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 26.02.2004.....tarih ve...08/4.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

ORIGANUM ONITES L. (KEKİK) YAĞ ALTI SUYUNUN UÇUCU BİLEŞİKLERİ

İLHAN BOYDAĞ

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. K. H. C. BAŞER

2004

Origanum onites L.'den buhar distilasyonu ile elde edilmiş yağ altı suyunda çözünmüş ve dağılmış bileşiklerin izolasyonu üzerinde araştırmalar gerçekleştirildi. Ayırma hunisi, Soxhlet apareyi ve Normag ekstraktörlerle sıvı-sıvı ekstraksiyon, KFE ve Amberlite XAD-4 reçine ile adsorpsiyon gibi farklı yöntemler kullanılarak "ikincil" yağ elde edildi. Kloroform ekstresinde bulunan oksijenli bileşikler Flaş Kromatografisi ile izole edildi.

Ülkemizde kekik suyu başta olmak üzere yağ altı sularının kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Henüz tamamen kontrolsüz ve izinsiz üretilerek piyasaya sürülen kekik yağ altı suyunun kalite kontrolü amacıyla en kolay uygulanabilir yöntem olarak, 5:1 oranında metilen klorür ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu önerilmektedir. Kekik suyundaki ana bileşikler karvakrol, linalool, timol ve nadir bir monoterpen olan *cis*-p-ment-4-en-1,2-diol olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kekik Suyu, Aromatik Su, Hidrosol, Ayırım Metotları, Ekstraksiyon Metotları

ABSTRACT

Doctorate Thesis

VOLATILE MATERIALS OF THE DISTILLATION WATER OF *ORIGANUM ONITES* L. (KEKİK)

İLHAN BOYDAĞ

**Anadolu University
Graduate School of Health Sciences
Pharmacognosy Program**

Supervisor: Prof. Dr. K. H. C. BAŞER

2004

Research into the isolation of soluble and dispersed materials in distillation water obtained by steam distillation of the herb of *Origanum onites* L. has been carried out. “Secondary” oil was obtained using different methods such as liquid-liquid extraction in a separatory funnel, Soxhlet apparatus and Normag extractors, adsorption with SPE and Amberlite XAD-4 resin. Oxygenated compounds present in the chloroform extract were isolated by Flash Chromatography.

Public use of Oregano Water and other aromatic waters is increasing. There is hardly any control over these products. Therefore their quality control is becoming important. The use of methylene chloride in 5:1 ratio for the liquid-liquid extraction of Oregano Water is proposed. Main constituents in Oregano Water were found as carvacrol, linalool, thymol and a rare monoterpenoid, *cis*-p-menth-4-en-1,2-diol.

Key Words: Kekik Water, Aromatic Water, Hydrosol, Separation Methods, Extraction Methods

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı gerçekleştirebilmek için gerekli imkanı sağlayan, bilgi ve tecrübesini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. K. Hüsnü Can BAŞER'e,

Tezin oluşmasında büyük katkıları olan ve eleştirileri ile içerik ve şekil açısından daha güzel hale gelmesini sağlayan Prof. Dr. Neşe KIRIMER'e,

Tez çalışmalarında teknik konularda bilgisinden yararlandığım Yard. Doç. Dr. Temel ÖZEK'e,

Analitik sonuçların elde edilmesinde çok büyük yardımları olan Yard. Doç. Dr. Mine KÜRKÇÜOĞLU'na,

Kromatografik çalışmalarda tecrübelerinden faydalandığım Yard. Doç. Dr. Zeynep TUNALIER'e, Uzm. Ecz. Şemsidin SKEYA'ya ve Yard. Doç. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye,

Manevi desteğini her zaman gösteren tüm çalışma arkadaşlarıma,

Destegini ve ilgisini her daim yanımda hissettiğim aileme,

Çalışmalarım boyunca hep yanımda olan sevgili eşim Nazmiye'ye teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAKLARIN TARANMASI.....	3
2.1. Uçucu Yağlar.....	3
2.1.1. Uçucu yağların yapısı.....	4
2.2. Uçucu Yağların Üretimi.....	5
2.2.1. Distilasyon.....	7
2.2.1.1. Su distilasyonu.....	8
2.2.1.2. Su-buhar distilasyonu.....	9
2.2.1.3. Su buharı distilasyonu.....	10
2.2.1.4. Kuru distilasyon.....	11
2.2.1.5. Hidrodifüzyon.....	12
2.2.1.6. Maserasyon ile distilasyon.....	13
2.2.2. Çözücü ekstraksiyonu.....	13
2.2.2.1. Soğuk yağ ile ekstraksiyon (Anfloraj).....	13
2.2.2.2. Sıcak yağ ile ekstraksiyon (Maserasyon).....	13
2.2.2.3. Organik çözücülerle ekstraksiyon.....	14
2.2.2.4. Sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon (Supercritical Fluid Extraction, SFE).....	15

2.2.2.5. Kesiksiz subkritik su ekstraksiyonu (Continuous Subcritical Water Extraction, CSWE)	16
2.2.3. Sıkma ile yapılan mekanik ekstraksiyon.....	18
2.2.4. Çizerek ekstraksiyon.....	20
2.2.5. Mikrodalga ekstraksiyonu (Microwave-Assisted Extraction, MAE)	22
2.2.5. Likens-Nickerson apareyi ile ekstraksiyon (Simultaneous Distillation-Extraction, SDE).....	23
2.2.6. Uçucu yağın üretim sürecindeki kayıpları.....	25
2.3. Aromatik Sular.....	27
2.3.1. Aromatik suların tarihçesi.....	27
2.3.2. Aromatik suların üretimi.....	28
2.3.2.1. Distilasyonla aromatik su elde edilmesi.....	29
2.3.2.2. Aromatik suların uçucu yağlardan hazırlanması.....	32
2.3.2.3. Basit çözme yöntemi.....	32
2.3.2.4 Yardımcı maddeler yardımıyla çözme yöntemi.....	33
2.3.2.5 Uçucu yağları çözünmeyi arttıran maddelerle çözmek.....	33
2.3.3. Aromatik suların kullanımı.....	34
2.3.4. Aromatik suların saklanma koşulları.....	35
2.3.5. Aromatik suda çözünen bileşiklerin ekstraksiyonu.....	36
2.3.5.1. Aromatik sularda yapılmış olan ekstraksiyon ve analiz çalışmaları.....	38
2.3.5.2. Distilasyon suyunun işlenmesi ve kohobasyon.....	40
2.3.5.3. Distilasyon suyundan absolü elde edilmesi.....	44
2.3.6. Terpenik maddelerin suda çözünürlüğü.....	46
2.3.7. Aromatik sular üzerinde yapılmış olan biyolojik aktivite ve antimikrobiyal aktivite araştırmaları.....	47
2.3.8. Kekik suyu.....	50
2.3.8.1. Kekik suyu üzerinde yapılmış çalışmalar.....	50

2.4. Ayırım Metotları.....	54
2.4.1. Endüstriyel membran teknikleri.....	54
2.4.1.1. Mikrofiltrasyon.....	55
2.4.1.2. Ultrafiltrasyon.....	57
2.4.1.3. Ters osmoz.....	58
2.4.1.4. Nanofiltrasyon.....	60
2.4.1.5. Pervaporasyon.....	61
2.4.1.6. Membran distilasyonu.....	63
2.4.1.7. Sıvı membranlar.....	65
2.4.1.8. Elektrodializ.....	67
2.4.2. Sıvı-sıvı ekstraksiyon.....	68
2.4.3. Poroplast ekstraksiyon tekniği.....	70
2.4.4. Katı faz ekstraksiyonu (KFE).....	73
2.4.5. Katı faz mikro ekstraksiyonu (KFME).....	75
2.4.6. Polimer yapıda reçineler (Amberlite XAD-4).....	79
2.4.7. Aktif karbon.....	82
2.4.8. Dondurarak yoğunlaştırma (Freeze Concentration).....	84
2.5. <i>Origanum</i> Türlerinin Sistematik ve Botanik Özellikleri.....	85
2.5.1. <i>Origanum</i> L. cinsinin botanik özellikleri.....	89
2.5.2. <i>Origanum onites</i> L.'in botanik özellikleri.....	90
2.6. Kekik İhracatı ile İlgili Değerler.....	90
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	93
3.1. Kullanılan Bitkisel Materyal, Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	93
3.1.1. Bitkisel materyal.....	93
3.1.2. Cihazlar.....	93
3.1.3. Kimyasal maddeler.....	94
3.2. Deneysel Çalışma.....	94
3.2.1. Distilasyon çalışmaları.....	94

3.2.1.1. Su distilasyonu.....	94
3.2.1.2. Su buharı distilasyonu.....	94
3.2.2. Su miktarının tayini.....	95
3.2.3. Ekstraksiyon teknikleri.....	96
3.2.3.1. Ayırma hunisi.....	96
3.2.3.2. Soxhlet ekstraksiyonu.....	96
3.2.3.3. Normag ekstraktörleri.....	96
3.2.3.4. Katı faz ekstraksiyonu.....	96
3.2.3.5. Amberlite XAD-4 reçine ile ekstraksiyon.....	98
3.2.4. Gaz kromatografisi (GK).....	98
3.2.5. Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GK/MS).....	98
3.2.6. Flaş kromatografisi (FK).....	99
3.2.7. İnce tabaka kromatografisi (İTK).....	100
4. DENEYSEL BULGULAR.....	101
4.1. Nem Miktarı.....	101
4.2. Kekik Uçucu Yağının Farklı Yöntemlerle Elde Edilmesi ve Distilattan Yağ İzolasyonu.....	101
4.2.1. Su distilasyonu.....	101
4.2.2. Su buharı distilasyonu.....	101
4.2.3. Distilattan yağ izolasyonu.....	101
4.2.4. Kekik suyunun organik çözücülerle sıvı-sıvı ekstraksiyonu.....	104
4.2.4.1. Ayırma hunisi ile ekstraksiyon.....	104
4.2.4.2. TSE Monografına yapılan Soxhlet ekstraksiyonu.....	105
4.2.4.3. Süzölmüş kekik suyunun çözücülerle sıvı-sıvı ekstraksiyonu.....	107
4.2.4.4. Ayırma hunisi ile ekstraksiyon.....	107
4.2.4.5. Süzölmüş kekik suyunun Soxhlet apareyi ile ekstraksiyonu.....	109
4.2.4.6. Normag ekstraktör kullanılarak gerçekleştirilen sıvı-sıvı ekstraksiyon çalışmaları.....	110

4.2.4.7. Sudan hafif apolar organik çözücü ile ekstraksiyon.....	111
4.2.4.8. Sudan ağır apolar organik çözücü ile ekstraksiyon.....	112
4.2.4.9. Farklı polaritelerde çözücüler ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon çalışmaları.....	114
4.2.5. Katı faz ekstraksiyon tekniği ve Amberlite XAD-4 reçine kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları.....	118
4.2.5.1. Katı faz ekstraksiyon tekniği ile kekik suyunun ekstraksiyonu.....	119
4.2.5.2. Amberlite XAD-4 reçine ile kekik suyunda çözünen bileşiklerin ekstraksiyonu.....	122
4.2.6. Flash kromatografisi ile kloroform ekstresinde bulunan oksijenli bileşiklerin ayırımı.....	125
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	128
6. KAYNAKLAR.....	136
ÖZGEÇMİŞ.....	161

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.Sudan hafif çözücüler için Normag ekstraktörü.....	97
Şekil 3.2.Sudan ağır çözücüler için Normag ekstraktörü.....	97
Şekil 5.1. p-ment-3-en-1,2-diol ve p-ment-4-en-1,2-diol isimli bileşiklerin molekül formülleri.....	132

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Poroplast ekstraksiyon tekniği ile çalışılmış bitkiler ve Suda çözünen/Dekante edilen (S.Ç./D.E) fraksiyonların oranları.....	72
Çizelge 2.2. KFME yönteminin diğer yöntemlere göre avantajları.....	76
Çizelge 2.3. Kekik ihracat bilgileri (Kg, tutarı ve birim fiyatı-USD sırasıyla).....	91
Çizelge 2.4. Kekik yağı ihracat değerleri (Kg, tutarı ve birim fiyatı-USD sırasıyla).....	92
Çizelge 3.1. İTK için kullanılan çözücü sistemleri.....	100
Çizelge 4.1. Kekik yağı GK analiz sonuçları.....	102
Çizelge 4.2. Clevenger apareyinde kalan suyun kloroform ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu.....	103
Çizelge 4.3. Uçucu yağ, <i>n</i> -hekzan ve kloroform ekstrelerinin analiz sonuçları.....	104
Çizelge 4.4. Soxhlet apareyi ve ayırma hunisinde ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin GK analiz sonuçları.....	106
Çizelge 4.5. Süzölmüş kekik suyunun hekzan ve kloroform ile ayırma hunisinde ekstraksiyonu.....	108
Çizelge 4.6. Süzölmüş kekik suyunun metilen klorür ile Soxhlet apareyi ve ayırma hunisinde ekstraksiyonu.....	109
Çizelge 4.7. Buhar distilasyonu ile elde edilen kekik yağının GK analiz sonuçları.....	110
Çizelge 4.8. Hekzan kullanılarak Normag ekstraktör ile kekik suyunun ekstraksiyonu.....	112
Çizelge 4.9. Kloroform kullanılarak Normag ekstraktör ile kekik suyunun ekstraksiyonu.....	113

Çizelge 4.10. Farklı sürelerde sudan hafif ve ağır apolar organik çözücü ile Normag ekstraktör ve ayırma hunisinde ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin miktarları (g).....	113
Çizelge 4.11. Farklı sürelerde sudan hafif ve ağır apolar organik çözücü ile Normag ekstraktör ve ayırma hunisinde ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin yüzdeleri (%).....	114
Çizelge 4.12. Buhar distilasyonu ile elde edilen kekik yağının GK analiz sonuçları.....	114
Çizelge 4.13. Sıvı-sıvı ekstraksiyon için kullanılan çözücülerin oranları.....	116
Çizelge 4.14. Farklı polaritede çözücülerle ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin miktarları (g) ve Kekik Suyu:Çözücü oranları.....	116
Çizelge 4.15. Farklı polaritede çözücülerle ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin yüzdeleri ve Kekik Suyu:Çözücü oranları.....	117
Çizelge 4.16. Farklı polaritede çözücülerle ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin GK analiz sonuçları.....	117
Çizelge 4.17. Buhar distilasyonu ile elde edilen kekik yağının GK analiz sonuçları.....	118
Çizelge 4.18. Katı Faz Ekstraksiyon tekniği ile kekik suyundan elde edilen ekstrelerin miktarları (g).....	120
Çizelge 4.19. Katı Faz Ekstraksiyon tekniği ile kekik suyundan elde edilen ekstrelerin verimleri.....	120
Çizelge 4.20. Katı Faz Ekstraksiyon tekniği ile kekik suyundan elde edilen ekstrelerin GK/KS analiz sonuçları.....	121
Çizelge 4.21. Amberlite XAD-4 reçine ile kekik suyundan elde edilen ekstrelerin miktarları (g).....	123
Çizelge 4.22. Amberlite XAD-4 reçine ile kekik suyundan elde edilen ekstrelerin verimleri.....	124

Çizelge 4.23. Amberlite XAD-4 reçine ile elde edilen ekstrelerin GK/KS analiz sonuçları.....	124
Çizelge 4.24. Flash kromatografisi'nde kullanılan çözücüler, elüsyon şartları ve fraksiyonların miktarları.....	126
Çizelge 4.25. Flash kromatografisi ile elde edilen oksijenli bileşik bakımından zengin 8, 9 ve 10 nolu fraksiyonların GK analiz sonuçları.....	127
Çizelge 5.1. Ekstraksiyon için kullanılan tekniklerin çözücü, verim (%) ve ana bileşikler açısından karşılaştırılması.....	134

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGMD	: Air Gap Membrane Distillation
CSWE	: Continuous Subcritical Water Extraction
DCMD	: Direct Contact Membrane Distillation
DHS	: Dynamic Headspace
D-KFME:	: Daldırılmalı Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu
ELM	: Emulsion Liquid Membranes
FK	: Flaş Kromatografisi
GK	: Gaz Kromatografisi
GK/KS	: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi
GTİP	: Gümrük Tarife İstatistik Pozisyonu
HS	: Headspace
HSA	: Headspace Analysis
HS-SPME	: Headspace Solid Phase Microextraction
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KFE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
KFME	: Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu
PTFE	: Politetrafloroetilen
PV	: Pervaporasyon
SC-CO ₂	: Supercritical- CO ₂
SDE	: Simultaneous Distillation-Extraction
SFE	: Supercritical Fluid Extraction
SGMD	: Sweeping Gas Membrane Distillation
SHS	: Static Headspace
SPME	: Solid Phase Microextraction
TB	: Tepe Boşluğu

TB- KFME : Tepe Boşluğu Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu

TSE : Türk Standartları Enstitüsü

UV : Ultraviyole

VMD : Vacuum Membrane Distillation

YBSK : Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kekik, baharat ve uçucu yağ olarak büyük ölçüde kullanım bulan ve ülkemiz için yüksek ticari potansiyele sahip olan bir bitkidir. İhracatı her yıl artış göstermektedir. Tıbbi ve aromatik bitkilerin halk arasında kullanımı göz önüne alındığında baharat ve uçucu yağ yanında aromatik suların ve özellikle kekik suyunun kullanımının da artmakta olduğu görülmektedir.

Kaynaklar incelendiğinde aromatik suların genel olarak distilasyonla ve uçucu yağların suyla çalkalanması şeklinde üretildikleri görülmektedir. Günümüzde uçucu yağın su veya buhar distilasyonu ile üretilmesi esnasında yan ürün olarak meydana gelen yağ altı suyu aromatik su olarak değerlendirilmektedir.

Yağ altı suları üretim sonrasında eğer ticarete sunulmuyorsa atılır. Bu durumda suyun içinde çözünmüş halde bulunan uçucu yağın kaybı söz konusu olacaktır. Uçucu yağ üretimi esnasında tonlarca yağ altı suyunun üretildiği düşünülürse, kaybın ne boyutta olduğu kolayca tahmin edilebilir. Yağ altı suları tıbbi amaçla doğrudan kullanılabilecekleri gibi çözünmüş yağın geri kazanılması amacıyla da değerlendirilebilirler. Uçucu yağ üreten ve ihraç eden üretici firmalar için bu durum son derece önemlidir. Yağ altı sularının, uçucu yağ profilinde mevcut olan bileşikler yanında, uçucu yağ içinde bulunmayan polar bileşikleri de içerdiği görülmektedir. Bilhassa suda çözünürlüğü yüksek olan oksijenli bileşikler açısından zengindirler. Başka bitkisel materyallerden bir çok aşamadan sonra elde edilebilecek bileşikleri içermeleri yağ altı sularını değerli bir kaynak konumuna getirmektedir.

Aromatik sular, tıbbi amaçla ve koku ve lezzet düzeltici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca gıdalara koku vermek amacıyla katılırlar. Bu sular aromatik su, çiçek suyu (floral water), distilasyon suyu, hidrosol adıyla aromaterapi ve parfümeride de kullanım alanı bulmaktadır.

Bir süre unutulmaya terk edilen ve giderek önemini kaybetmeye başlayan yağ altı suları, son zamanlarda yeniden önemli bir ticari kaynak konumuna gelmiştir ancak, bu konuda yapılmış çok fazla çalışma yoktur.

Yağ altı suları gerek köylü tipi geleneksel üretimlerle gerekse distilasyon tesislerinde elde edilerek karayolları yol kenarlarından marketlere hatta eczanelere kadar pek çok yerde satışa sunulmaktadır. Bu örneklerdeki renk değişiklikleri, bulanıklık, uçucu yağ kalıntıları ve plastik bidon gibi uygun olmayan ambalajlar, dahilen kullanım için büyük miktarlarda üretimi olan bu ürünler için sakıncalıdır. Ülkemizde çok sayıda yağ altı suyu kontrolsüz ve denetimsiz olarak piyasaya verilmektedir. Türkiye’de en yaygın olarak, sağlıklı yaşam için pek çok olumlu etkisi olduğu düşünülen kekik suyu kullanılmaktadır.

Yağ altı sularının bileşimlerinin belirlenmesi ve standardizasyonu ile ilgili araştırmalar henüz yetersizdir. Son yıllarda grubumuz bu konu üzerinde araştırmaları yoğunlaştırmıştır (Boydağ ve ark., 2000a; Boydağ ve ark., 2000b; Boydağ ve ark., 2001; Arslandere, 2002; Boydağ ve ark., 2002; Kırimer ve ark., 2002; Boydağ ve ark., 2003; Yeniel ve ark., 2003).

Bu tez kapsamında klasik yöntemlerin modifikasyonu ve bu alanda henüz denenmemiş bazı modern yöntemler ile kekik suyunun etkili maddelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Etken maddeler belirlendikten sonra standardizasyonları ile ilgili çalışmalar yapılabilecektir.

2. KAYNAKLARIN TARANMASI

2.1. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar (eterik yağlar, esansiyel yağlar), bitkilerden çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen, her biri kendine özgü kokuya sahip, ısıya maruz bırakıldığında kolayca buharlaşabilen ve yoğunlukları bakımından yağdan çok suya benzeyen maddelerdir.

Labiatae, Compositae, Umbelliferae, Liliaceae, Cruciferae, Myrtaceae, Hypericaceae, Rutaceae, Pinaceae, Cupressaceae ve Zingiberaceae gibi familyalar uçucu yağ içeren türler açısından zengindir.

Bitkilerin uçucu yağ bakımından zengin olan kısımlarının başında çiçekli dallar gelir. Ayrıca yapraklar, meyveler, meyve kabukları, tohumlar, gövde ve dal kabukları, rizomlar, kökler ve odunlar bitkinin en fazla uçucu yağ taşıyan kısımlarıdır. Bu maddeler bitkinin tüm organlarında, salgı tüyü, salgı cebi, salgı kanalı ya da salgı hücreleri gibi bazı özel yapılarda ya da parenkima veya epiderma hücrelerinde, serbest halde veya glikozit halinde bulunurlar.

Uçucu yağlar gıda, parfümeri, kozmetik, ilaç ve diğer kimya endüstrilerinde kullanılır. Uçucu yağca zengin olan bazı bitkilerden yiyeceklere aroma vermek üzere ve baharat olarak yararlanılmaktadır. Uçucu yağlar parfümeri sanayiinin önemli hammaddeleridir. Koku karışımlarının ve aroma kimyasallarının hazırlanmasında kullanılırlar. Eczacılıkta, ilaçların koku ve tatlarını düzeltmek amacıyla da bir aromatik bitki ekstresi veya uçucu yağ kullanılır. Bu maddelerin tedavi edici özellikleri de uzun zamandır bilinmektedir. Hemen hepsi antiseptik ve antibiyotik özellik gösterir. Kimya endüstrisinde, uçucu yağlarda bulunan terpenik maddeler sentetik kauçuk ve lastik gibi ürünler haline getirilirler (Guenther, 1948; Baytop, 1991; Otte, 1994).

Uçucu yağların bir kısmı böcekleri uzaklaştırmak amacı ile kullanılır. Uçucu yağların sadece böcekleri uzaklaştırmakla kalmadığı, temas veya buharla dezenfeksiyon şeklinde böceklere karşı insektisit etki yaptığı ve bazı önemli bitkisel patojenlere karşı fungusit etkili olduğu gösterilmiştir. Bazı uçucu yağların

terpen ve fenollerinin bazı böceklerle karşı toksik etkilerini gösteren araştırmalar da mevcuttur (Isman, 2000).

2.1.1. Uçucu yağların yapısı

Uçucu yağların yapıları oldukça karmaşıktır. Çok sayıda farklı fiziksel ve kimyasal özelliğe ve yapıya sahip maddelerden oluşurlar. Bu bileşikler dört grup altında toplanabilir:

1. Terpenik Maddeler
2. Aromatik Maddeler
3. Düz Zincirli Hidrokarbonlar
4. Azot ve Kükürt Taşıyan Maddeler

Terpenler birçok uçucu yağda ana bileşik olarak bulunurlar. Terpen hidrokarbonlar uçucu yağın bileşiminde büyük yer tutarlar. Ancak uçucu yağın kokusundan bu maddeler sorumlu değildirler. Her ne kadar kokuları varsa da oksijenli bileşiklerle kıyaslandığında kokunun tümüne olan katkıları oldukça küçüktür.

Terpenler, izopren birimleri ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$)'nden oluşurlar. İzopren birimleri, iki doymamış bağ içeren ve 5 karbon taşıyan birimlerdir. Terpenler iki veya daha fazla C_5 biriminin birleşmesi ile meydana gelmektedir. Bunlar 2 (C_{10}), 3 (C_{15}), 4 (C_{20}), 6 (C_{30}) ve 8 (C_{40}) birim içermelerine göre sınıflandırılırlar. Bunlar uçucu özellikteki monoterpenler ve seskiterpenler (C_{10} ve C_{15}), daha az uçucu olan diterpenler (C_{20}), uçucu olmayan triterpenler ve steroller (C_{30}) oluştururlar. Ayrıca istisnai bir durum olarak 50 karbonlu karotenoidler bazı bakterilerde bulunmuştur (Heath, 1981).

Uçucu yağların yapısında hidrokarbonlar, alkoller, aldehytler, ketonlar, fenol ve fenol eterleri, kinonlar, asitler, esterler, laktonlar, furan türevleri, oksitler ile azot ve kükürt içeren bileşikler bulunur (Guenther, 1948).

Uçucu yağların büyük bir bölümü hidrokarbonlar, oksijenli bileşikler ve küçük oranlarda viskoz veya katı, uçucu olmayan artık maddeler (parafinler, mumlar) gibi değişik özelliklere sahip maddelerin karışımından oluşmaktadırlar.

Terpenler yağa has kokunun ve tadın oluşumunda çok etkili değildir. Kokudan sorumlu olan maddeler daha çok oksijenli bileşiklerdir. Bazı aldehitler dışında, oksijenli bileşikler genel olarak seyreltik alkolde çözünürlüğü artırır. Oksitlenme ve reçineleşmeye karşı yağın daha dayanıklı olmasını sağlarlar. Monoterpen ve seskiterpen hidrokarbonlar ise doymamış bir yapıya sahip olduklarından hava, ışık ve kötü saklama koşulları altında kolayca oksitlenebilir ve reçineleşebilirler (Guenther, 1948; Atal, 1991).

2.2. Uçucu Yağların Üretimi

Uçucu yağların izolasyonu, konsantre hale getirilmesi ve saflaştırılması, bu bileşiklerin kullanım alanlarının çok geniş olması nedeniyle önemini korumaktadır. Çözücü ekstraksiyonu ve buhar distilasyonu yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Ancak bu tekniklerle ilgili bazı sakıncalar yeni ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesi için itici güç oluşturmıştır.

Uçucu yağ endüstrisinde yağın kalitesinin yükseltilmesi önem taşımaktadır. Burada deterpenasyon işlemi gündeme gelmektedir. Gıda ve parfüm endüstrisinde kullanılan uçucu yağlar genellikle monoterpen hidrokarbonların % 95'ini içerirler. Stabil olmayan terpenlerin uzaklaştırılması ve oksijenli fraksiyonun konsantre hale getirilmesi önem taşır. Çünkü bu şekilde yağın stabilitesi artar. Ayrıca seyreltik alkolde, gıda çözücüsünde ve suda çözünürlüğü artar ve depolama ve taşıma maliyetleri azalır. Uçucu yağların deterpenasyonu için kullanılabilecek ticari yöntemler fraksiyonlu vakum distilasyonu, seçici çözücü ekstraksiyonu ve kromatografik ayırımdır. Bu yöntemlerin hepsinde düşük verim, yan ürünlerin oluşması (yüksek sıcaklıklara maruz kalma süresinin uzaması nedeniyle) ve ekstrede toksik organik kalıntıların bulunması gibi önemli sakıncalar bulunmaktadır. Süperkritik CO₂ (SC-CO₂) ekstraksiyonu ve özellikle Süper ısıtılmış (Super heated) Su Ekstraksiyonu gibi teknikler, uçucu yağların elde edilmesinde yeni seçenekler sunmaktadır (Luque de Castro ve ark., 1999).

Uçucu yağların bitkilerden izolasyonu için kullanılabilecek yöntemleri geleneksel yöntemler ve yeni teknikler olmak üzere iki grupta toplayabiliriz.

Geleneksel yöntemleri ise kesikli sistemler, kesiksiz sistemler ve karma teknikler (Kesiksiz-Kesikli) olmak üzere üç gruba ayırmak mümkündür. Kesikli sistemler içinde organik çözücü ekstraksiyonu (ultrason kullanılarak veya ultrason kullanılmadan) ve su ekstraksiyonu (normal koşullarda ve yardımcı bir enerji kaynağı olmadan, narenciyelerden uçucu yağ eldesinde olduğu gibi) yer alır. Kesikli sistemlerin en önde gelen sakıncaları uzun ekstraksiyon sürelerine gerek olması (çünkü bitki ile ekstraksiyonunda kullanılacak çözücü arasında dengenin kurulması gerekir), otomasyonun uygulanamaması, kantitatif özelliğinin bulunmaması (çünkü partiyon katı ve sıvı fazlar arasında sağlanmaktadır), seçiciliğin eksik olması ve sıvı-sıvı ekstraksiyondan sonra ekstrede toksik çözücü kalıntılarının kalmasıdır. Kesiksiz sistemlerde büyük ölçüde kullanılan yöntem çözücü ekstraksiyonu ile birlikte su buharı distilasyonu ve vakum distilasyonudur. Bu geleneksel yöntemin de en büyük dezavantajları sıcakta bozulan bileşiklerin kaybı, otomasyona uygun olmaması ve ekstraksiyon için uzun zaman gerektirmesidir. Sıcağa dayanıklı olmayan bileşiklerin kaybını önlemek için distilasyonu düşük basınçta yapmak gerekir. Karma teknikler arasında Likens-Nickerson ve Soxhlet ekstraksiyonu yer almaktadır. Bunun yanında hidrodistilasyondan sonra çözücü ekstraksiyonunun yapılması da karma teknik olarak değerlendirilebilir. Soxhlet ekstraksiyonunun dezavantajları işlemin uzun sürmesi, otomasyona uygun olmaması, uçucu maddelerin kaybı ve sıcaklığa dayanıklı olmayan bileşiklerin dekompozisyonu (ekstre sürekli olarak yüksek ısıya maruz kalır) dur. Yeni teknikler arasında Mikrodalga Ekstraksiyonu, Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Extraction, SFE (SC-CO₂)) ve Kesiksiz Subkritik Su Ekstraksiyonu (Continuous Subcritical Water Extraction, CSWE) gibi yüksek değere sahip uçucu yağları elde etmek için kullanılan yöntemler bulunmaktadır (Luque de Castro ve ark., 1999).

Bunların dışında analitik amaçlı ekstraksiyon yöntemleri olarak statik tepeboşluğu (static headspace, SHS) ve dinamik tepeboşluğu (dynamic headspace, DHS) analizleri ile tepeboşluğu Katı Faz Mikroekstraksiyonu (Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME)) tekniklerini “tepeboşluğu yöntemleri” adı altında ayrı bir gruba alabiliriz. Katı Faz Ekstraksiyonuna ise (Solid Phase

Extraction (SPE)), sıvı-sıvı ekstraksiyon ve SFE ile birlikte “doğrudan ekstraksiyon işlemleri” arasında yer verilmiştir. (Augusto ve ark., 2003)

2.2.1. Distilasyon

Distilasyon işleminin 5000 yıl önce uygulandığını gösteren kaynaklar bulunmaktadır (Sandra ve Bicchi, 1987; Müller ve Lamparsky, 1991). Mezopotamya’da bir kazana ait kalıntılar bulunmuş ve bu kalıntıların 5000 yıllık olduğu belirtilmiştir (Müller ve Lamparsky, 1991). Sandal odunu (Sandalwood) bilinen en eski parfüm maddelerinden biridir. En az 4000 yıllık bir tarihe sahiptir ve aralıksız olarak kullanılmıştır. Sandal odunu yağının Seylan’da 1000 yıldan fazla zamandır bilindiğine inanılmaktadır (Arctander, 1960).

M.S. 850-1500 yılları arasında gelişme gösteren simyacılar sonra kendilerini tıp kimyacıları olarak tanımlayan ve deneylerini içenin sonsuza kadar yaşamasını sağlayacak bir iksiri yani 'hayat iksiri'ni (Elixir Vitae) bulmak üzerinde yoğunlaştıran bir grup şarlatan ortaya çıkmıştı. Bu çalışmalardan özellikle bir tanesi hayret uyandırmıştı. Katı maddenin sıvı ve gaz gibi iki ayrı kısma dönüşmesini gördükten sonra, maddeyi böylesine etkileyen şeyin bir 'hayalet' veya 'ruh' olduğunu ve bunu elde edebildiklerini düşündüler. Aslında bu işlem distilasyondur. İlkçağın distilasyon işlemine iyi bir örnek geyik boynuzundan Hartshorn'un Ruh'unun ayrılmasıdır. Boynuz bir kazana yerleştirilir, kazanın üst kısmına ise bir boru bağlanırdı. Kazanın üstünde kavis yapan boru ürünü toplayacak olan ikinci kazanın alt kısmına bağlanırdı. Birinci kazan ateşe ısıtılırdı. Bol miktarda beyaz sonra sarımsı renkte buharlar yükselir sonunda buharlar toplama kazanına ulaşırdı. Buharların görülmesi “hayalet”in ayrıldığını gösteriyordu. Sonuçta kazanın içinde koyu kahverengi renkte, katran gibi bir kütle kahverengi sulu bir madde ile birlikte birikmeye başlıyordu. Kazan içeriğinden aktararak ayrılan sulu sıvı Hartshorn'un Ruh'uydu. Neticede ürünün etkili maddesinin ve keskin kokunun ana kaynağının amonyak olduğu keşfedildi. İşlem esnasında hayvan boynuzundaki proteinlerin ısı nedeni dekompoze olmasından kaynaklanıyordu. 1923 yılında Whittall'ın Materia Medica'sında 'Hartshorn and

Oil', Linimentum Ammoniae olarak yer aldı. Yine tıp kimyacıları bitkisel veya hayvansal maddeleri su ile birlikte bir distilasyon kazanında kaynatıldılar. Su atmosfer basıncı altında 100 °C civarında kaynadığı için, distilasyon sırasında maddenin dekompozisyonu, sıcaklığın izin verdiği sınırlar içerisinde gerçekleşiyordu. Sıcaklığın 100 °C üzerine çıkması ile birlikte maddenin kazanın kenarlarına değmesi dekompozisyon işlemini hızlandırıyordu. Distilasyonun başka bir formu İbn-i Sina (Avrupa'da 'Avicenna' olarak bilinir) tarafından 11. yy'da bulundu. Distilasyonu yapılan madde aşırı ısınma nedeni ile yanmıyordu. Maddeyi kaynayan su ile muamele etmek yerine maddeyi buharla temas edecek ve ısıtacak şekilde sistemi yeniden düzenledi. Bu şekilde maddeyi 100 °C'nin bir kaç derece üstünde ısıtmak mümkün hale geldi. Bu sistem, modern buhar distilasyonu tesislerinde kullanıldı. 11. yy'da distilasyonun büyük bir gelişme göstermesine rağmen buharın büyük bir bölümü atmosfere kaçmaktaydı. Aparey tam olarak kapatılamadığı için ısıttıktan sonra basınç artışı ile birlikte patlama yapıyordu. 12. yy'ın ortalarında su soğutmalı kondanserin bulunması ile distilasyon etkili hale geldi ve üretilen buharın sıvı, bazı durumlarda ise katı olarak toplama kısmında toplanması sağlandı (Curtis ve Williams, 1994).

2.2.1.1. Su distilasyonu

Su distilasyonunda materyal ve su birlikte kaynatılır. Uçucu yağ ve su buharları bir soğutucuda yoğunlaştırılır. Soğutucudan separatöre gelen yağ ve su birbirinden ayrılır. Su distilasyonunda bitkisel materyal her zaman su ile doğrudan temas halindedir. Su miktarı az olursa bitkisel materyal aşırı ısınmadan dolayı kavrulabilir. Bu sebepten kazan içinde gerekli miktarda suyun bulunması gerekir. Aksi takdirde yağın kalitesinde bozulmalar meydana gelir. Bitkisel materyalin içinden buhar geçirildiğinde aglomerasyon veya aglütinasyon meydana geliyorsa, yani bitkisel materyal buhar sızdırmayan bir kütle (gül petallerinde olduğu gibi) meydana getiriyorsa yağın izolasyonu için su distilasyonu tercih edilir (Thapa, 1989; Lawrence, 1995).

Hoş olmayan kokular, bitki kaynaklı su ile temas ettiğinde protein yapısındaki maddenin kısmi dekompozisyonu neticesinde küçük, hızlı hareket eden, çok kötü kokulu ve kükürt içeren maddelerin oluşumu sonucunda ortaya çıkar. Bu tür bileşikler aromatik bitki uçucu yağ üretimi için distillendiğinde oluşur. Sonuçta yağlar 'still notes' olarak belirtilen kötü kokulara maruz kalır. Bu hoş olmayan 'lahana benzeri' kokular genellikle taze uçucu yağda bulunur. Ancak, yağı bir kaç saat havaya maruz bırakmak veya basınçlı hava ile temas ettirmek bu istenmeyen kontamine edici maddelerin uçmasını veya kokusuz maddelere okside olmasını sağlar (Curtis ve Williams, 1994).

2.2.1.2. Su-buhar distilasyonu

Buhar distilasyonunda, buhar harici bir kazanda veya bitkisel materyalden ayrı olarak distilasyon kazanının içinde üretilir. Su-buhar distilasyonunda, bitkisel materyal suyun hemen üzerinde yer alan bir ızgara üzerine yerleştirilir. Bu durum kazanın kapasitesini düşürür, ancak yağın kalitesini yükseltir. Eğer su miktarı distilasyonun tamamlanmasına yeterli gelmiyorsa bir kohobasyon tüpü yerleştirilir ve kondensat suyu kazanın içine bir boruyla geri verilir. Bu şekilde kondensat suyunda çözünmüş olan oksijenli bileşiklerin kaybı kontrol altına alınmış olur. Çünkü kondensat suyunun yeniden kullanılması çözünen bileşiklerle doymasını sağlar ve böylece daha fazlası çözünmez (Thapa, 1989; Lawrence, 1995).

Su-buhar distilasyonunda, bitkisel materyal kazanın altında bulunan ısı kaynağı ile doğrudan temas edemez. Bununla beraber kazanın cidarları ısıyı iyi iletir. Kazanın kenarına değen bitkisel materyalde sıcaklık nedeni ile bozulma meydana gelebilir. Bu işlemde buhar, ıslak buhar olduğu için en önemli dezavantajı bitkisel materyalin tamamen ıslanmasıdır. Bu durum distilasyon hızının yavaşlamasına neden olur. Ayrıca kazanın alt kısmında suyun toplanması geri döngüye neden olur. Böylece kazanın alt kısmında suyun sürekli kaynaması ve yoğunlaşması bitkisel materyalin içinden buharın geçmesine engel olur. Aynı zamanda uçucu yağ bileşiklerinin bir kısmını çözer. Rifleks (geri çevirme)

kontrolünü sağlayan bir cihaz yerleştirilirse bunun önüne geçmek mümkündür (Lawrence, 1995).

Su-buhar distilasyonunun su distilasyonuna yararları aşağıda verilmiştir (Lawrence, 1995):

- *Yağ verimi daha yüksektir
- *Yağın bileşikleri hidroliz ve polimerizasyona daha az maruz kalırlar
- *Riflaks kontrol edilirse polar bileşiklerin kaybı minimuma iner
- *Su-buhar distilasyonu ile üretilen yağın kalitesinin yeniden üretilebilirliği daha yüksektir
- *Su distilasyonuna göre daha hızlı bir işlemdir

2.2.1.3. Su buharı distilasyonu

Buhar distilasyonu, distilasyon kazanının dışında bulunan bir jeneratörde üretilen buharın kazanın içine yerleştirilmiş olan bitkinin içinden geçirilmesiyle uygulanır. Bitkisel materyal buhar girişinin üzerinde yer alan bir ızgara üzerine yerleştirilir. Buhar kazanının dışarıda olması buhar hızının kontrol edilebilmesini sağlar. Ayrıca bitkisel materyal ile temas eden ısı 100 °C'den daha yüksek değildir. Bu şekilde bitkinin sıcaklıkla zarar görmesi önlenmiş olur. Buhar distilasyonu büyük ölçekte uçucu yağ üretimi için en çok tercih edilen işlemdir (Thapa, 1989; Varshney, 1993; Curtis ve Williams, 1994; Lawrence, 1995).

Lavanta yağı gibi sıcaklıkla bozulabilen ve kolayca hidrolize olabilen bileşikleri içeren uçucu yağlarda su distilasyonuna göre daha hızlı olan buhar distilasyonu tercih edilir (Curtis ve Williams, 1994).

Buhar distilasyonu, gliserin gibi yüksek kaynama noktalı bileşiklerin, yağ asitleri gibi kaynama halinde dekompoze olan ve terebentin gibi doğrudan ısıtma sonucunda yapısı bozulan maddelerin ayrımında ve saflaştırılmasında kullanılabilir. Petrol, kağıt, kömür kimyasalları ve uçucu yağ endüstrisi gibi alanlarda buhar distilasyonundan yararlanılmaktadır (Ellerbe, 1974).

2.2.1.4. Kuru distilasyon

Kuru distilasyon (Parçalayıcı distilasyon, Pyrogenation) da bitkinin çeşitli kısımları (gövde, kabuk, dal, odun gibi) doğrudan kuru bir şekilde ısıya maruz bırakıldığında bitki kısmı içinde bulunan uçucu maddeler kısmen oldukları şekilde, kısmen parçalanarak (yağın dekompoze olması) distile olurlar. Hiç uçucu olmayan maddeler de parçalanarak uçucu maddeler haline gelip distile olurlar. Kuru distilasyon işlemi özel distilasyon apareylerinde yapılır. Bu apareyler çelikten imal edilir ve duruma göre bir ya da iki tarafından açılabilir. Değişik ısı kaynakları (odun, kömür, gaz gibi) ile ısıtılırlar. Ağaç, odun ve dallar kurumaya bırakılır. Parçalara bölündükten sonra kazanlara doldurularak distile edilir. Distilasyonla geçen kısımlar su ile soğutulan kondansatörlerde yoğunlaşırlar. Çeşitli kodekslerde bu şekilde elde edilmiş preparatlar vardır. Bunlara katran adı verilir. Bir çok farmakopede Pix veya Pyroleum (ateşle elde edilen yağ) şeklinde tanımlanırlar. Pyroleum Betulae (Kayın Ağacı Katranı), Pyroleum Juniperi (P. Oxycedri, Ardıç Katranı), Pyroleum Pini (Pix Pini, Çam Katranı), Pyroleum Lithanthracis, Pyroleum Fagi, Pix Nigra bunlara örnek olarak verilebilir (Guenther, 1948; Yalçındağ, 1965).

Türkiye’de Toros dağlarında küçük ocaklar kullanılarak katran elde edilir. Bunun için toprak içine 30-50 cm çapında ve 20-30 cm derinliğinde bir çukur açılır. Çukurun içi çamur ile iyice sıvanır. Bu çukurun yanına daha küçük ve fakat daha derin bir çukur açılır ve bunun da içi çamur ile sıvanır. Bu iki çukur dip kısmından bir boru ile birbirine bağlanır. Kırılmış çıralı kök ve gövde parçaları büyük çukura doldurulur ve üzeri çamur ile sıvanır. Bu sırada küçük bir yakma deliği bırakılır. Sıvanan kısmın üzerine bir naylon parçası örtülür ve üzeri tekrar çamur ile sıvanır. Sıvama işi tamamlanınca, fırındaki odun parçaları yavaş yavaş yanar ve meydana gelen katran dipteki boru yardımıyla küçük çukur içinde toplanır. Bu şekilde Toros dağlarında “Kara Katran”, “Sarı Katran” ve “Andız Katranı” olmak üzere üç cins bitkisel katran elde edilmektedir (Baytop ve Öztekin, 1984).

2.2.1.5. Hidrodifüzyon

Hidrodifüzyon uçucu yağ üretiminde kullanılan yeni tip bir buhar distilasyonu tekniğidir. Bu yöntemde, geleneksel buhar distilasyonunun aksine difüzyon işlemi geçerlidir. Buhar, kazanın üst kısmından verilir ve bitkisel materyalin içinden geçerek aşağıya doğru hareket eder. Bitki, kazanın içinde bulunan bir sepete yerleştirilir. Buhar distilasyonunda olduğu gibi kazanın dışında bulunan bir buhar jeneratöründen kazanın içine düşük basınçta buhar gönderilir. Soğutucu, tüp şeklindedir ve kazanın içindeki sepetin hemen altında yer alır. Yağ ve su kondanserin altına yerleştirilen separatörün içinde birikir.

Hidrodifüzyonun sahip olduğu yararlar aşağıda gösterilmiştir:

- *Bitkinin yüklenmesi ve boşaltılması gibi işlemler son derece kolaydır
- *Kullanmaya hazır hale gelen bitkisel materyal ile işleme hızlı bir şekilde başlanabilir.
- *Düşük basınçta ıslak buhar kullanılır.
- *Yağ verimi geleneksel buhar distilasyonundan daha yüksektir.
- *Distilasyon süresi kısadır. Daha az buhar harcadığı için daha az masraflıdır.
- *Distilasyon süresinin kısa olmasından ve riflaks olayının gerçekleşmemesinden dolayı yağ bileşikleri hidroliz olmazlar.
- *Elde edilen yağların fiziksel ve kimyasal özellikleri standartlara uygundur.

Hidrodifüzyonun bu avantajlarının yanı sıra bir mahzuru da mevcuttur. Buhar ve kondanse olan su aşağıya doğru hareket eder. Bu esnada uçucu olmayan veya uçuculuğu az olan lipitler, klorofil, yağ asitleri, kumarinler ve psöralenler gibi suda çözünen bazı maddeler yağa geçebilirler (Lawrence, 1995).

2.2.1.6. Maserasyon ile distilasyon

Bazı bitkiler içerdikleri uçucu yağın açığa çıkması için sıcak suyun içinde maserasyona bırakılırlar. Bunun sebebi, uçucu bileşiklerin glikozit yapısında olmalarıdır. Badem çekirdekleri, soğan, sarımsak, hardal tohumu gibi droglar bu özelliğe sahiptir (Lawrence, 1995).

2.2.2. Çözücü ekstraksiyonu

2.2.2.1. Soğuk yağ ile ekstraksiyon (Anfloraj)

Yağlar yüksek absorpsiyon gücüne sahiptirler ve koku maddesi taşıyan yağlarla temas ettirilirlse içeriği kolayca absorplarlar. Bu yöntemin adı Anfloraj (Enfleurage)'dır. Anfloraj tekniği, 1750 yılında bulunmuştur.

Yasemin çiçeği gibi bazı çiçekler hasat edildikten sonra 24 saat veya daha uzun bir süre fizyolojik aktivitelerini devam ettirirler. Bu özelliğe sahip olan çiçekler soğuk yağ ile ekstre edilirler. Yöntem için kokusuz ve uygun kıvamda bir yağ seçilmelidir. Genellikle saflaştırılmış domuz yağı ve içyağı karışımı kullanılır. Yağ, kenarları tahta çerçeve ile kaplanmış bir cam plak üzerine yayılır ve yağ kaplı bir plak bunun üzerine kapatılır. Taze olarak toplanmış olan çiçekler yağın üzerine serilir. 24 saat bekletilir, sonra işi biten çiçekler alınıp yerlerine yenileri konur. Bu işleme yağ tamamen doyuncaya kadar devam edilir. Elde edilen bu ürüne "pomat" adı verilir. Pomat alkol ile ekstre edilir, ekstre donma noktasının altında dondurucuda tutulur. Alkolde çözünmüş durumdaki yağ süzülür, alkol düşük basınçta distilasyonla uzaklaştırılır. Bu ürüne "Absolü" adı verilir (Guenther, 1948; Thapa, 1989; Curtis ve Williams, 1994).

2.2.2.2. Sıcak yağ ile ekstraksiyon (Maserasyon)

Gül, mimoza, akasya, portakal çiçeği gibi çiçeklerin fizyolojik aktivitesi koparma sonucu hemen durur. Bu özelliğe sahip çiçekler 60-70 °C sıcaklıktaki

yağa daldırılıp ekstre edilir. İçindeki uçucu yağı alınan çiçeklerin yerine tazeşi yerleştirilir. Bu işlem yağ doyana kadar devam eder. Yağ süzöldükten sonra elde edilen ürüne “pomat” adı verilir. Soğuk yağla ekstraksiyona benzer yolla pomattan alkol ekstresi ve “absolö” hazırlanır (Guenther, 1948; Thapa, 1989).

2.2.2.3. Organik çözücülerle ekstraksiyon

Taze bitkisel materyaller saf çözücüler ile ekstre edilebilirler. Çözücü olarak petrol eteri, hekzan, metilen klorür, benzen, aseton kullanılabilir. Bazı özel durumlarda iki çözücünün karışımı kullanılabilir. Ekstre düşük basınçta konsantre edilerek yağ veya konkret elde edilir (Thapa, 1989; Wijesekera, 1992).

Özellikle ısıya karşı hassas ve buhar distilasyonu ile elde edilemeyecek kadar küçük miktarda bulunan yağlar bu yöntemle elde edilir. Ancak uçucu yağlarla birlikte kullanılan çözücüde çözünebilir diğeri maddeler de ekstre olurlar. Bitkiler belirli bir süre sıkı kapatılmış kaplarda bu çözücüler ile temasta bırakılarak ve gerekirse taze çözücü ile bu işlemi tekrarlayarak yağın tümüyle çözümlenmesi sağlanır. Ekstre süzölür ve çözücü düşük basınç altında distilasyonla uzaklaştırılır. Elde edilen ürüne konkret adı verilir. Konkret sıvı, yarı katı veya katı olabilir. Bazı konkretlerin % 50 sinden fazlasını sabit yağ, mum ve diğeri miktarlarda pigment oluşturur. Konkret, sıcak etanol ile ekstre edilir ve alkol vakum altında uzaklaştırılırsa saf uçucu yağ veya absolö elde edilir. Kullanılacak olan çözücü inert, düşük kaynama noktalı, seçici bir etkiye sahip, ucuz, kolay bulunur ve su ile karışmayan bir çözücü olmalıdır (Thapa, 1989; Wijesekera, 1992; El-Gammal, 1991; Curtis ve Williams, 1994).

Ekstrede çözücü artığının kalması ve bu nedenle toksik risk oluşturması ve bir çok durumda verimli bir ekstraksiyon yapabilmek için uzun bir süre gerekmesi çözücü ile ekstraksiyonun sakıncalarının başında gelmektedir. Buna ek olarak organik çözücüler düşük seçiciliğe sahiptir. Bu nedenle istenen bileşiklere ek olarak yüksek moleköl ağırlıklı ve uçucu olmayan sabit yağlar, reçineler, mumlar ve renk maddeleri de ekstre edilirler (Luque de Castro ve ark., 1999).

2.2.2.4. Sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

Süperkritik akışkanlar, basınç, sıcaklık ve akışkanın bileşimine bağlı olarak gaz ve sıvılar arasında bir özelliğe sahiptirler. Viskoziteleri sıvılarınkinden düşüktür ve difüzyon katsayıları yüksektir. Böylece daha etkili ekstraksiyon yapılabilir. Ayrıca dansiteleri (ve dolayısı ile akışkanın çözücü gücü) basınç ve sıcaklıkla ayarlanabilir. Bu şekilde teorik olarak yüksek seçicilikte ekstraksiyonlar yapılabilir. SFE sistemi yüksek basınç pompası ve örneği içeren bir ekstraksiyon bölgesinden oluşur. Bir organik çözücü ilave edilerek çözme özellikleri artırılabilir. SFE, statik ve dinamik şekilde çalıştırılabilir. Ekstre edilecek bileşiklerin yapısı (apolar, polar-apolar arası, iyonik yapıda), basınç, sıcaklık ve zaman gibi ekstraksiyon parametreleri ve ekstre edilecek materyalin yapısı (büyük partiküller, aktif yöreler ve su içeriği) SFE ile ekstraksiyonu etkileyen parametrelerdir. Çevre numuneleri, bitkiler, gıdalar, yağlar ve polimerler gibi geniş bir alanda kullanılan bir yöntemdir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, poliklorobifeniller, fenoller, pestisitler, organometalik bileşikler, lipidler, kokulu ve uçucu bileşikler, doğal ürünler, katkı maddeleri gibi çok çeşitli maddelerin ekstraksiyonu için uygundur (Di Giacomo ve ark., 1989; Hawthorne ve ark., 1993; Reverchon, 1997; Goodarznia ve Eikani, 1998; Simándi ve ark., 1998; Camel, 2001; Smith, 2003). Son yıllarda gıda, farmasötik ve kimya endüstrilerinde olası uygulamalara ilişkin çalışmalar yapılmıştır (Bruno ve Ely, 1991).

Kurutulmuş bitkisel materyallerin tümü basınç altında sıvı CO₂ ile kolayca ekstre edilebilirler. Sıvı karbondioksitin kritik noktası 73 kg/m² basınç ve 31 °C sıcaklıktır. Yöntem esas olarak kritik noktanın yakınında sıvı hale getirilmiş gazın yüksek basınçlı ekstraksiyon tankının içinde sirkülasyonudur. Basıncın değiştirilmesi veya tamamıyla buharlaştırmak suretiyle çözücünün hemen hemen tamamı uzaklaştırılır. Ayrılan gaz yeniden kullanım için tekrar sıkıştırılır (Wijesekera, 1992). CO₂, sıvı ve süperakışkan ekstraksiyon için tercih edilmektedir. Çünkü kokusuz, tatsız ve renksizdir. Toksik bir çözücü değildir, ucuzdur ve kolayca elde edilebilir. Kalıntı bırakmadan kolayca ortamdan

uzaklaştırılabilir. Halbuki hekzan ve metilen klorür gibi çözücülerini kullanan basit çözücü ekstraksiyonunda elde edilen son üründe çözücünün tamamını uzaklaştırmak çok zor ve külfetlidir. Düşük viskozitesinden dolayı kurutulmuş bitkisel materyal içine kolayca penetre olabilir. Koroziv değildir, kolayca yanmaz, alkoller, aldehitler, esterler ve ketonlar için güçlü bir çözücüdür. Sıcaklık ve basıncı değiştirmek suretiyle seçiciliği değiştirilebilir. Ayrıca subkritik veya süperkritik CO₂ ekstresinin kokusu, ekstraksiyon işleminin yapıldığı hammaddenin taze kokusuna hemen hemen eşdeğerdir. Halbuki, buhar distilasyonu veya bir ekstreden çözücünün uzaklaştırılması esnasında, karışım ısıya maruz kalır. Bu durum geri dönüşümü olmayan hidroliz, izomerizasyon ve polimerizasyon reaksiyonlarına neden olur (Thapa, 1989; Lawrence, 1995; Wijesekera, 1992).

Karbondiyoksit, molekül ağırlığı 250'den küçük olan bileşikler için iyi bir çözücüdür. Böyle bileşiklere uçucu yağlardaki hidrokarbonlar ve oksijenli monoterpenler örnek olarak verilebilir. Molekül ağırlığı 250-400 arasında olan bileşiklerin sıvı karbondiyoksitte çözünürlüğü düşüktür. Molekül ağırlığı 400'ü aşan bileşikler ise çözünmezler. Sıvı karbondiyoksit, sabit yağlar, protein, mumlar, klorofil ve pigmentler bu çözücüde çözünmediklerinden ekstraksiyon için oldukça kullanışlıdır (Verghese, 1986; Lawrence, 1995). Saf CO₂, apolar ve düşük polariteli bileşikler için etkili bir şekilde ekstre eder. Polar maddelerin ekstraksiyonunu artırabilmek için bir çözücünün ilavesi gerekir (Camel, 2001).

2.2.2.5. Kesiksiz subkritik su ekstraksiyonu (Continuous Subcritical Water Extraction, CSWE)

Bu teknik, dinamik tarzda ve 100-374 °C sıcaklıklar arasında (suyun kritik noktası 221 bar ve 374 °C'dir) ekstre edici olarak suyu kullanılır. Sıvı halin korunması için yeterince yüksek bir basıncın uygulanması gerekir. Bu yöntem, katı numunelerin ekstraksiyonu için önemli bir seçenek konumuna gelmiştir. Suyun dielektrik sabiti kolayca kontrol edilebilir. Bu parametre, orta basınç altında sıcaklığı değiştirmek suretiyle geniş bir aralık içinde değişikliğe uğratılabilir.

Çevre sıcaklığı ve basıncında suyun dielektrik sabiti yaklaşık 80'dir. Yani aşırı polar bir çözücüdür. Bu parametreyi, sıcaklığı orta basınç altında yükseltmek suretiyle çok düşürmek mümkündür. Örneğin 250 °C sıcaklık ve 40 barın üzerindeki bir basınçta subkritik suyun dielektrik sabiti 27'dir. Bu haliyle etanole benzer ve düşük polariteli bileşikler ekstre etmek için uygun hale gelir. Bu nedenle çevre ölçümleri için alınan numunelerden geniş bir aralıkta polariteye sahip atık maddeleri ekstre etmek için büyük ölçüde kullanılmıştır. Uçucu yağ izolasyonunda bu tekniğin kullanımı yenidir ve umut vadetmektedir (Jiménez-Carmona ve ark., 1999; Rovio ve ark., 1999; Gámiz-Gracia ve Luque de Castro, 2000; Ayala ve Luque de Castro, 2001; Ozel ve ark., 2003).

Burada süper ısıtılmış su (superheated water) kavramı üzerinde durmak gerekir. Su, hidrojen bağları nedeni ile benzeri olmayan bir çözücüdür. Oda sıcaklığında kendi kütesine göre yüksek kaynama noktasına, yüksek dielektrik sabitine ve yüksek polariteye sahiptir. Bununla birlikte ısıtıldığında özellikleri belirgin ölçüde değişir. Hidrojen bağlı yapı, termal hareket arttıkça bozulmaya başlar. Basınç suyun yoğunlaşma halinde kalmasını sağlayacak şekilde yükseltirirse, bu değişiklikler atmosferik kaynama noktasının üzerinde ve 374 °C ve 218 bar kritik noktasına kadar ve bu noktanın dışında devam eder. Bu sıcaklığın çok üzerinde yoğunluk hemen hemen sabittir, o dereceye kadar ki basıncın suyun özellikleri üzerindeki etkisi minimumdur. Süper ısıtılmış su, 100 °C ve kritik nokta arasında yoğunlaşmış fazı belirtmek için kullanılır. Sıklıkla bu faz subkritik su olarak tanımlanır. Ancak süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile paralelliğine bakarak bu terimin kritik noktaya yakın bölge için kullanılması gerektiği düşünülmektedir. Suyun yoğunlaşmış halini korumak için gerekli olan basınçlar, 200 °C'de 15 bar ve 300 °C'de 85 bar'dır. Eğer basınç, herhangi bir basınçtaki kaynama noktasının altına düşerse "süper ısıtılmış buhar" oluşur. Bu hal, sıvı halden daha düşük dielektrik sabitine, gaza benzer difüzyona ve viskoziteye sahiptir. Sonuç olarak süper ısıtılmış suya göre bir ekstraksiyon çözücüsü olarak farklı davranır. Süper ısıtılmış su organik çözücülere benzer imkânlarla sahiptir ve orta ve düşük polaritedeki bileşikler çözebilir. Böylece süper ısıtılmış su kromatografik yöntemleri geliştirilmiş ve organik sentezlerde

çözücü olarak kullanım bulmuştur. Ayrıca toprak ve bitki örneklerinden pestisit kalıntılarının belirlenmesi ve bitkilerden koku ve tat bileşiklerinin izolasyonu hakkında çalışmalar yapılmıştır. Bitkilerde bulunan bileşiklerin polariteleri büyük değişiklikler gösterdiğinden farklı sonuçlar alınmıştır. Su buharı distilasyonu ile karşılaştırıldığında, daha yüksek verim alınabilmekte ve süper ısıtılmış su ekstraksiyonunda su buharlaştırılmadığı için daha az enerji harcanmaktadır. Özellikle oksijenli terpenlerin yüksek verimde elde edildiğini gösteren çalışmalar vardır. SFE ve buhar distilasyonunda ise alkan grubu maddeler de ekstrede bulunabilmektedir. Bu teknik, çevre ve gıda örneklerinin ekstraksiyonunda organik çözücülere olan ihtiyacı ortadan kaldırmıştır. Çevreye zarar vermez, ucuzdur ve toksik değildir. Gerekli ekipman göreceli olarak basittir. SFE’de uygulanan yüksek basınçlara gerek yoktur. Diğer kromatografik sistemlerle birlikte kullanılabilir. Karbondioksitin sahip olduğu soğutma ve yoğunlaştırma gibi problemlere neden olmaz. (Smith, 2002; Smith, 2003).

Kesiksiz Subkritik Su Ekstraksiyonu sistemi, su tankı, yüksek basınç pompası, paslanmaz çelikten silindirik ekstraksiyon bölmesine sahip bir ekstraktör (dip kısmı sirkülasyona izin verecek şekilde kapatılmış) kısımlarından oluşur. Ekstraksiyon bölmesi paslanmaz çelikten yapılmış bir ön ısıtıcı ile birlikte 300 °C’ye kadar ısınabilen bir fırının içine yerleştirilir. Soğutma sistemi fırından çıkan akışkanı soğutmak için kullanılır. Ayrıca değişken özellikli bir sınırlayıcı (variable restrictor) ile tercih edilen basıncı dinamik sistem içinde muhafaza etmek mümkündür (Luque de Castro ve ark., 1999; Gámiz-Gracia ve Luque de Castro, 2000).

2.2.3. Sıkma ile yapılan mekanik ekstraksiyon

Uçucu yağların bazıları kimyasal kompozisyonları ve doğaları gereği ısıdan etkilendiklerinden distilasyon işlemine tabi tutulmazlar. Örneğin, narenciye meyvalarından uçucu yağların elde edilmesi için mekanik ekstraksiyon uygulanır.

Eski usule göre meyvalar kesilip iç kısımları alındıktan sonra kabuklar kolayca ekstre olabilmeleri için kısa bir süre suya daldırılırdı. Hidrolik presler

veya iç çeperi çıkıntılı kaplar kullanılarak turunç meyvalarının kabuklarında bulunan eterik yağ bezleri parçalanır ve yağın açığa çıkması sağlanırdı. Yağ, bir sünger kullanılarak alınır ve süngerin bir kaba sıkılmasıyla elde edilirdi. Bir miktar su içerdiği için bulanık olan uçucu yağ bir süre bekletilir ve süzülerek saf hale getirilirdi (El-Gammal, 1991).

Günümüzde dünya narenciye üreticileri tarafından kullanılmakta olan işletim teknolojileri ana hatlarıyla bütün ülkelerde aynıdır. Narenciyelerden ürün olarak yüksek kalite ve verimde usare ve uçucu yağ elde edilmesi istenmektedir. Bu teknolojilerde hasat edilmiş olan meyveler havuz veya siloya getirilir. Meyvelerin siloya aktarılırken zedelenmemesine dikkat edilmelidir. Zedelenmiş meyvelerin endokarpındaki dilimleri ve hücreleri birbirinden ayıran membranların yırtılmasıyla açığa çıkan enzimler glikozitleri parçalayarak acı aglikonları oluşturur. Bu da usarenin acılaşmasına neden olur. Meyveler silodan 35-40° eğimli elevatör ile fırçalama-yıkama makinasına gönderilir. Bu makinalar yatay şekilde hazırlanmış ve saat yönünde dönen fırçalardan oluşur. Bu fırçaların üzerinden devamlı su püskürtülür. Fırçalama ve yıkama yapıldıktan sonra kalitatif kontrole tabi tutulur. Meyvelerden en yüksek usare ve uçucu yağ veriminin alınabilmesi için meyvelerin çaplarına göre ayrılması ve çaplarına uygun ekstraktörlerle çalışılması gerekmektedir. Bu ekstraktörlerden ilki universal ekstraktördür. Her çaptaki narenciye meyvesi ile çalışılabilir. In Line ekstraktörler ise sadece çaplarına göre ayrılmış olan narenciye meyvelerinin çalışılmasında kullanılır. In Line ekstraktörlerin sabit çaplarına uygun olmayan büyük ve küçük meyveler universal ekstraktörlere (Pelatriçe makinaları: Polycitrus, Speciale) iletilir. Universal ve In Line ekstraktörlerin her ikisinde de uçucu yağ elde edilebilir, ancak In Line Ekstraktör’de bundan başka usare de elde edilmektedir.

In Line ekstraktörlerde meyve yukarıdan inen kupa ile sabit alt kupa arasında sıkıştırılır. Sabit alt kupadan üst ve alt kısmından yaklaşık 2 cm çaplı epikarp diski kesilmiş meyvenin içine delikli bir silindir girer. Üst kupanın basıncı artınca endokarpın usaresi ve pulpası silindirin deliklerinden iç kısmına doğru geçer. Bu basınç sırasında alt ve üst kupadaki kesici parmaklar perikarptaki salgı ceplerini patlatır. Aynı anda çıkan uçucu yağ her iki kupanın iki ynında bulunan

püskürtücülerden püskürtülen su ile emülsiyon oluşturarak toplanır. Bu şekilde narenciye meyvelerinden aynı anda hem usare hem de uçucu yağ elde edilebilmektedir. Bu noktadan sonra ekstre edilmiş usare ve uçucu yağ iki ayrı yol izler. Uçucu yağ ve su, Finisher'den geçirilerek katı maddeler tutulur. Santrifüj uygulanmasıyla uçucu yağ ve su birbirinden ayrılır. Otomatik santrifüj, gönderilen emülsiyonu katı partiküller, bileşiminde yaklaşık % 50-80 uçucu yağ bulunan zenginleştirilmiş emülsiyon ile katı parçacıklardan ve uçucu yağdan temizlenmiş su olmak üzere üç kısma ayırır. Kullanılan ikinci santrifüj ise genellikle kapalı tiptir. Otomatik santrifüjden gelen uçucu yağca zenginleştirilmiş emülsiyonu su ve uçucu yağa ayırır.

Çap dışı olan ve In Line ekstraktörden gelen fazla meyveler universal ekstraktörlere iletilir. Bu sistemde öncelikle uçucu yağ ekstraksiyonu yapılır. Daha sonra uçucu yağı alınmış meyveler usare ekstraktörüne gönderilerek usaresi çıkarılır (Kunkar ve ark., 1993a; Kunkar ve ark., 1993b; Kunkar ve ark., 1994; Curtis ve Williams, 1994).

2.2.4. Çizerek ekstraksiyon

Canlı çam ağaçlarında reçinenin ağaç bünyesinden alınmasında “Yaralama Tekniği” ve uyarıcılarla “Tahrik Tekniği” kullanılır. İyonyalılar'dan beri uygulanan yaralama tekniğinde diri odun yaralanarak, doğal olarak bulunan reçine kanalları açığa çıkarılır ve kanallardan akan reçine kaplara toplanır. Yaralama tekniğinin çeşitli metodlarından biri olan “Oluklu Çizgi Metodu” ülkemizde 1950'li yıllardan günümüze kadar uygulanmıştır. Yine 1950'li ve 1960'lı yıllarda sülfürik asit ve hidroklorik asitin uyarıcı olarak kullanıldığı bazı tahrik tekniği denemeleri yapılmış, ancak bu denemelerin sonuçları kızılçam ormanlarında Devlet Orman işletmelerince yaptırılan reçine üretiminde uygulama alanı bulamamıştır. 1980'li yıllarda asit-pasta tahrik tekniği deneme mahiyetinde uygulanmaya başlanmış, daha sonra yaralama tekniği tamamen terkedilerek, bu teknik yaygınlaştırılmıştır (Acar ve ark., 1996).

Pinus türlerinden çizerek ekstraksiyon yöntemi ile oleorezin eldesinde "Kutu" (box) ve "kupa" (cup) olmak üzere iki metot kullanılır. Ancak kutu metodu artık sadece tarihi öneme sahiptir.

Kupa ve oluk yöntemi Amerika, Fransa ve diğer Avrupa ülkeleri ile Hindistan ve Pakistan'da farklı şekillerde uygulanır. Boylamasına kesi veya uzunlamasına oluk, uygun bir aletle kesilerek açılır. Önce sadece birkaç feet uzunluğu sahiptir, ancak giderek uzar ve 4 yıl sonra 4 m uzunluğa erişir. Oluğun boyu uzadıkça daha uzun saplı bir başka alet tarafından açma işlemi gerçekleştirilebilir. Metal ya da çömlek kaplar çiviler yardımıyla ağacın gövdesine tutturulur. Bir ya da iki tane galvanize demir şerit oleorezin akışını kaba götürecek şekilde yerleştirilir. Oluklar uzadıkça kaplar ağacın daha üst kısımlarına yerleştirilir. Eski oluklar tüketildiğinde veya toplama işlemi zorlaştığında yeni oluklar açılır. Kaplar aralıklarla boşaltılır ve oleorezin distilasyon işlemine gönderilir. Ağaçlar bu metotla 40 yıl kadar ürün verebilir ve işleme ağaç 20-30 yaşında iken başlanır. Oleorezinin akışı % 50 sülfürik asit, bitki hormonları ve *Fusarium* türlerinin kesik yüzeye uygulanması ile artırılabilir. Asit uygulanması özellikle Amerika'da başarılı olarak görülmektedir. Kanalları kaplayan ince duvarlı hücreleri bozma etkisi gösterir, böylece kanallar genişler ve çıkış kısmında tıkanma olmadan oleorezinin daha hızlı akması sağlanır. Paraquat'ın ağaca uygulanması ile oleorezin verimlerinde artış sağlanması üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Uygulama ksilem hücreleri tarafından yüksek miktarlarda oleorezin sentezlenmesini sağlar ve bitişik alanlara doyumluk sağlanana kadar sızıntı devam eder (Guenther, 1948; Evans, 2002). ABD'de reçine üretimini artıracak uyarıcıların denenmesine 1930'lu yıllarda başlanmıştır. Çeşitli organik ve inorganik asitler, bazlar, tuzlar ile çözücüler, zehirler, alkoller, eterler, yağlar v.b. maddeler birinci grup uyarıcıları oluşturmuştur. 1940'larda sülfürik asidin iyi sonuç verdiği görülerek ticari olarak kullanımına başlanmıştır. 1950'lerde ikinci grup uyarıcılar olarak herbisitler denenmeye başlanmış ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D)'in sülfürik asit kadar iyi sonuç verdiği ancak % 2'lik konsantrasyonda etkili olduğu fakat bu konsantrasyonun ağaçlarda zehirleyici etki yaptığı görülerek üçüncü grup uyarıcıların denenmesine

başlanmıştır. Üçüncü grup uyarıcılar bitki büyümesini düzenleyen kimyasal bileşiklerdir. Etilen'in bitki doğal hormonu olduğu ortaya konmuş ve ayrıştığında etilen veren kimyasal bileşikler denenmiştir. Lateks üretiminde kullanılan 2-Kloroetilfosforik asit (CEPA) reçine üretiminde de uyarıcı olarak denenmiştir. 1970'li yıllarda sülfürik asit püskürtmenin çeşitli risklerini ortadan kaldırmak amacı ile asit-pasta formülleri geliştirilmiştir. 1980'lerde kalsiyum+kinetin, auxin+kinetin denemelerine başlanmıştır (Acar ve ark., 1996).

Türkiye'de "Çam Terementisi"nin, *Pinus brutia* Ten. türünden ve özellikle Muğla bölgesinde gövdeye yapılan yaralamalar sonucunda elde edildiğini belirten bir kaynak mevcuttur (Baytop, 1999).

2.2.5. Mikrodalga ekstraksiyonu (Microwave-Assisted Extraction, MAE)

Mikro dalga enerjisi (300-300.000 MHz frekansa sahiptir), iyonların göç etmesi ve dipollerin rotasyonu vasıtasıyla moleküllerin hareketine neden olur. Dipollerin rotasyonu, elektrik alanına bağlı olarak çözücüde ve örneklerde bulunan daimi veya indüklenmiş dipol momentlere sahip molekülleri aynı hizaya getirir. Alan şiddeti azaldıkça termal düzensizlik düzgün hale getirilir ve termal enerji açığa çıkar. 2450 MHz (ticari sistemlerde kullanılan frekans)'de moleküllerin sıralanmasının ardından saniyede $4.9 \cdot 10^9$ kez düzensizliğe geri dönüş olur. Böylece hızlı ısınma gerçekleşir. Mikrodalgaya özgü etkiler nedeni ile mikrodalga ile ısıtma işlemi hemen olur ve örneğin tam içinde gerçekleşir. Bu şekilde çok hızlı ekstraksiyon yapılabilir. Çoğu durumda ekstraksiyon çözücüsü mikrodalgaları absorplar. Sıcaklıkla bozulan bileşikler söz konusu olduğunda, mikrodalgalar sadece ortam tarafından absorplanır, örnek ısınır ve maddeler soğuk çözücüye salıverilirler. Mikrodalğanın, bitkisel materyaller üzerindeki etkisi hakkında yapılan çalışmalarda, bez ve damar sistemindeki serbest su molekülleri ile seçici olarak etkileştiği görülmüştür. Hızlı bir ısınma ve sıcaklık artışı sonrasında hücre duvarlarının bozulduğu ve uçucu yağın çözücü içine salıverildiği belirtilmiştir. Ekstre edilecek bileşiklerin yapısı (polar ya da apolar özellikte

olmaları), sıcaklık ve zaman gibi ekstraksiyon parametreleri, ekstre edilecek materyalin yapısı (büyük partiküller, su içeriği) mikrodalga ile ekstraksiyonu etkileyen parametrelerdir (Camel, 2001).

Mikro dalga ekstraksiyonu, mikrodalga enerjisi yardımıyla çok çeşitli materyallerden çözünür bileşiklerin bir akışkan yardımı ile ekstraksiyonudur. Teknik, sıvı faz ekstraksiyonu (bir sıvı çözücü olarak kullanıldığında) ve gaz faz ekstraksiyonu (gazın ekstre edici olarak kullanılması) olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Sıvı faz ekstraksiyonunda ekstraksiyon işlemi (bitkilerden uçucu yağların izolasyonu için kullanılması), mikrodalgaya maruz kalan maddelerin kimyasal doğalarına bağlı olarak mikrodalga enerjisini farklı absorplama yeteneklerine bağlı olarak gerçekleşir. Bu fiziksel özelliği ölçmek için genellikle kullanılan parametre dielektrik sabitidir. Mikrodalga yardımı ile sıvı faz ekstraksiyonunda, materyal ekstraksiyonun gerçekleşeceği düşük dielektrik sabitine sahip ve mikrodalgaları göreceli olarak geçiren bir çözücüye daldırılır. Tekniğin ilk uygulamaları bitkisel ürünlerden uçucu yağların ekstraksiyonunda kullanılmıştır. Ayrıca Mikrodalga ekstraksiyonu, bitki dokusu içindeki herbisitleri belirlemek için sıvı kromatografisi ile birlikte kullanılabilir (Ganzler ve ark., 1986; Luque de Castro ve ark., 1999; Eskilsson ve Björklund, 2000; Smith, 2003).

2.2.5. Likens-Nickerson apareyi ile ekstraksiyon (Simultaneous Distillation-Extraction, SDE)

Uçucu organik maddelerin doğal kaynaklardan elde edilmesi için kullanılan buhar distilasyonu ve çözücü ekstraksiyonu, uçucu özellikteki maddenin ciddi kayıplara uğramasına neden olabilir. Çünkü yağı içeren çözeltiler uçurma işlemine tabi tutulurlar. Çok saf çözücüler içinde bulunan eser bileşikler bile ppm seviyesinde çalışıldığında analizde hataya sebep olur. Çözücü ekstraksiyonu ile uçucu olmayan bileşikler de ekstre edilebilmektedir. Buhar distilasyonunda büyük miktarda numune için faz ayrımı, yoğunlaşma işleminden sonra gerçekleşir. Ancak küçük miktarda (güçlü kokuya sahip fakat az miktarda

uçucu yağ içeren çiçekler gibi) veya seyreltik numunelerden maddeyi kazanabilmek için çözücü ekstraksiyonu gerekir. Likens-Nickerson apareyi buhar distilasyonu ve distilatın kesiksiz sıvı-sıvı ekstraksiyonu için kullanılan bir apareydir. Yöntemin tek dezavantajı çözücünün uzaklaştırılması işlemidir (Godefroot ve ark., 1981). Bu aparey ile atmosfer basıncında ve düşük basınçta çalışma olanağı vardır (Maignial ve ark., 1992; Pollien ve ark., 1998).

Aparey 10-100 ml sulu çözelti veya 1-20 g su ile karıştırılmış katı maddenin kullanımını sağlar ve distilatın 1 ml pentan veya metilen klorür ile ekstraksiyonunu gerçekleştirir.

Bir miktar numune (gıda, içecek, parçalanmış bitki dokusu gibi) kuru örnekler için bir miktar su ile birlikte örnek balonuna konur. Sistemin diğer balonuna ise sudan daha yoğun olan (metilen klorür, kloroform vb.) bir ekstraksiyon çözücüsü konur. Bu iki balon ısıtılır; su ve çözücü buharları yoğunlaşmalarını sağlayacak olan soğutucu tüpü içeren ekstraktör gövdesine ulaşırlar. Bu işlemde aroma bileşikleri su buharı ile materyalden ayrılır ve sıvılar soğutucu tüp üzerinde yoğunlaştıklarında çözücüye geçer. Su ve çözücü, yoğunlaştıktan sonra ekstraktörde toplanırlar ve sürekli reflaksı sağlamak üzere kendi balonlarına dönerler. Apareyi modifiye etmek suretiyle sudan daha hafif olan (pentan ve etil asetat gibi) çözücülerini kullanmak ta mümkün olmuştur.

Normal olarak işlem 1 saat kadar sürer. Çözücü ekstraksiyonu ise buhar distilasyonu işlemi kesildikten sonra 20 dakika daha devam eder. Bu şekilde buhar ile distile olabilen maddelerin tümü toplanmış olur (Poole ve Schuette, 1984; Augusto ve ark., 2003).

Likens-Nickerson apareyi ile fenollerin (Janda ve Krijt, 1984; Barták ve ark., 2000), gıdalarda bulunan tat maddelerinin (Demole ve ark., 1982; Siegmund ve ark., 1996), uçucu yağ bileşiklerinin (Schultz ve ark., 1977; Núñez ve Bemelmanz, 1984; Blanch ve ark., 1993; Jayatilaka ve ark., 1995; Díaz-Maroto ve ark., 2002) ve sulu örneklerin, yağ/su ve yağ örneklerinin (Au-Yeung ve MacLeod, 1981) ekstraksiyonuna yönelik çalışmalar yapılmıştır.

2.2.6. Uçucu yağın üretim sürecindeki kayıpları

Su ile temas sadece uçucu yağ veriminin azalmasına neden olmaz. Tat ve koku değeri düşük olan terpen ve seskiterpen hidrokarbonların çözünürlüğü azdır (en çok ppm düzeyinde); bununla beraber elde edilmesi istenen esterler, ketonlar, aldehitler, alkoller, fenoller vb. oksijen içeren bileşiklerin çözünürlüğü % 0.05-1 düzeyine ulaşmaktadır (Gokhale, 1959; Curtis ve Williams, 1994).

Uçucu yağ üretiminde yağın alınabilmesi için gerekli olan buhar miktarına karar vermek için bitkisel materyalin ağırlığına bakılır. Ticari olarak önem taşıyan uçucu yağları içeren bitkiler genellikle % 0.1-1 arasında yağ verdikleri için, su fazının miktarı kazanılan yağın miktarının 100 misli hatta daha fazlası olabilir. Farklı çözünürlüklere sahip olduklarından çeşitli uçucu yağ bileşikleri su fazı içinde oransız bir şekilde dağılırlar. Bundan dolayı değerli olan polar bileşikler ya azalır ya da tamamen kaybedilir. Bu sebepten yağın relatif olarak çözünür durumdaki minör bileşikleri bitkide mevcut olan bileşikler ile karşılaştırıldığında tamamen kaybedilebilir ve koku ile tat profilinde dengesizlik meydana gelebilir. Bu yönüyle suda çözünen fraksiyon uçucu yağ üretiminin kalitatif ve kantitatif sonuçları açısından önem taşır (Fleisher, 1991).

Su-buhar distilasyonu veya hidrodistilasyon işlemleri esnasında hatta soğukta sıkma yöntemi ile uçucu yağ elde edilirken, yağ ve su uzun bir süre temas halinde bulunur. Uçucu yağ ile suyun bu şekilde temas etmesi, uçucu yağın bir kısmının suda dağılmış (disperse) olmasına ve dağılan kısmın suyun akışı ile birlikte sürüklenmesine neden olmaktadır. Bu durum uçucu yağ verimini ciddi bir şekilde etkilemektedir. Hemen hemen tamamı ile suda çözünmeyen çok ucuz yağlar söz konusu olduğunda böyle bir kayıp ekonomik olarak önemsizdir. Büyük ölçüde suda çözünen ve çok pahalı olan yağlar göz önüne alındığında üretimin ekonomik yanı distilasyon suyunda çözünen yağın geri kazanılmasına bağlıdır (Gokhale, 1959; Curtis ve Williams, 1994).

Buhar distilasyonunda, ıslak buhar yüksek basınçlı kazandan gelen kuru buhardan daha kısa sürede daha iyi verim sağlar. Bu durum “hidrofilik bağlanma” ile açıklanabilir. Islak buhardaki sıvı “bulut” şeklindeki partiküller yağ

tabakalarını sarar. Yağ tabakalarını saran ve kazanda ilerlemesini sağlayan bulut partikülleri bu şekilde buharlaşma olmadan yüklemenin arasından yağın hareketine yardım eder. Bazen yukarıya doğru hareketin hızı, buharın başarabileceği yağın buharlaşma hızından bile daha fazladır. Böylece yağ, yüklemenin üstüne ıslak buharla kuru buharla olduğundan daha hızlı ulaşır. Bitki yüzeyinde geçici olarak kalan yağ tabakası ve bulut partikülleri kazanın üstüne ulaşır ve alışılmış olduğu şekilde buharlaşırlar. Ancak yüklemenin üstünden kaçan ve kondanser/toplama kabı arasında ilerleyen kısım gelecek olan yağ ve su fazına göre ve herhangi bir normal separatör yardımı ile ayrılmak için fazlasıyla az miktardadır. Bu yağ tabakaları distilat suyunda kaybedilir ve bu duruma “hidrofilik bağlanmaya bağlı kayıp” adı verilir. Bu kayıp çeşitli faktörlere bağlıdır:

<u>Faktörler</u>	<u>Kaybın Miktarı</u>
1. Bitki yüzeyinin yapısı	
a. Absorpsiyon fazla	Az
b. Absorpsiyon yok	Çok
2. Kazanın yüksekliği	
a. Az	Çok
b. Çok	Az
3. Yüklemenin yoğunluğu	
a. Az	Çok
b. Çok	Az

Burada bitki yüzeyinin yapısı altında belirtilen absorpsiyondan kasıt nemin bitki dokusu tarafından absorplanma durumunu göstermektedir. Örneğin çok tüylü yüzeyler yüksek absorpsiyon (bu özellikteki bitkiler distilasyon öncesi kurutmaya veya soldurmaya ihtiyaç göstermezler), kısmen kurutulmuş (güneşte veya gölgede 1 veya 2 gün) yassı yüzeyler orta derecede absorpsiyon, yassı ve pürüzsüz yüzeyli bitkiler zayıf absorpsiyon gösterir. Yüklemenin yoğunluğu ise kazandaki materyalin her tarafta eşit şekilde dağılmış durumda olduğunu ve kanallaşmanın olmadığını gösterir (Varshney, 1993).

2.3. Aromatik Sular

Aromatik sular, uçucu yağların ve uçucu bileşiklerin suda doymuş çözeltileridir. Kaynaklar incelendiğinde aromatik su teriminin farklı şekillerde karşımıza çıktığını görmekteyiz. Bu terimler aşağıda verilmiştir:

Aqua aromatica, Eau aromatique, Aromatic Water , Distillation Water, Condensate Water, Distillate Water, Hydrosol, Hydrolate, Hydrolat, Floral Waters, Distilasyon Suyu, Kondensat Suyu, Hidrosol, Hidrolat, Hidrola.

Ayrıca aromatik suyu belirtmek için bitki adının hemen ardından “Water” veya “Suyu” kelimesinin yazıldığı da görülmektedir. *Origanum* Water, Kekik Water (Kekik Suyu), Rose Water (Gül Suyu) bu kullanım şekline örnek olarak verilebilir. Piyasada bu isimler rastgele kullanılmaktadır.

Hidrosol (hydrosol veya hydrolate) teriminin bazı kaynaklarda “floral water” şeklinde belirtildiği görülmektedir. Ancak bu terim hidrosol karşılığı değildir. Öncelikle hidrosoller sadece çiçeklerden elde edilmezler. Uçucu yağlara benzer şekilde hidrosoller bitkinin çiçeklerinden olduğu kadar toprak üstü kısmı, baharat şekli, kökler, odunsu kısımlar veya yapraklar gibi değişik kısımlarından elde edilebilirler. “Floral waters” adı altında ticarete sunulan ürünlerin uçucu yağların su ile karıştırılmasından veya su bazlı sentetik koku bileşiklerinden üretildiği görülmektedir. Yapılan bir çalışmada 20 “floral waters” örneğinden sadece üçünün gerçek anlamda hidrosol olduğu ve bu üçünden de sadece bir tanesinin koruyucu içermediği görülmüştür (Catty, 1998).

2.3.1. Aromatik suların tarihçesi

Uçucu yağların distilasyonla elde edilmesi Eski Mısırlılar zamanında başlamıştır. Distilasyondan sonra, uçucu yağlarla doymuş durumda bulunan yağ altı sularının tıpta kullanılmasına Avrupa’da 15. yy’dan sonra rastlanmaktadır. Aromatik sular 18. yy’da farmakopelere girmiştir (İzgi, 1973).

2.3.2. Aromatik suların üretimi

Aromatik sular, genel olarak iki yöntemle elde edilirler (İzgü, 1973):

1. Distilasyonla

2. Uçucu yağların suda eritilmesiyle

Türk Kodeksi 1954, 3 aromatik suyun distilasyonla elde edilmesini ister. V. İsviçre Kodeksi de aynı aromatik suları distilasyonla elde etmektedir. XVI. Birleşik Amerika Farmakopesi, aromatik suların genel elde edilme yöntemlerinden biri olarak distilasyonu da almaktadır. Ancak Aqua Rosae Fortior'u distilasyonla hazırlar. İtalyan Kodeksi 6., 11 adet distile su formülü vermiştir. Bunun yanında esansları suda çözmek suretiyle aromatik su elde edilmesini uygun bulduğunu da yazar. Fransız Farmakopesi 1965'te aromatik suları distilasyonla elde eder. Belçika Farmakopesi, sadece Aqua Laurocerasi'nin distilasyonla elde edilmesini ister. Portekiz Farmakopesi, aldığı aromatik sulardan sadece 8 tanesinin su buharı distilasyonu ile hazırlanmasını ister. Fin Farmakopesi (1956), İsveç Farmakopesi, Danimarka Farmakopesi (1948), İngiliz Farmakopesi (1958), Çek Farmakopesi (1956) hiçbir aromatik suyu distilasyon yöntemi ile hazırlamazlar. Romen Farmakopesi VII, aromatik suların bitkilerin çeşitli kısımlarının su buharı distilasyonu neticesinde elde edileceğini yazar (Yalçındağ, 1965).

Aromatik suları hazırlama yöntemlerine göre gruplandırabilmek üzere değerlendirmeye alınan bir kaynaktan rastlanan örnekler aşağıda verilmiştir:

a) Bitki esansının yardımcı bir madde yanında suyla maserasyonu ile hazırlananlar:

*Melissa (Oğul otu) suyu (Aqua melissae, Eau de melisse)

*Nane suyu (Aqua menthae piperitae, Eau menthae piperitae, Eau de menthe)

*Tarçın suyu (Aqua cinnamomi, Eau de cannelle)

b) Distilasyon ile hazırlananlar:

*Aqua hammamelidis (Liquor hammamelidis, Eau distillée d'hammamelis)

*Gül suyu (Aqua rosae, Eau de rose)

*Ihlamur hidrolası (Hydrolatum tilia, Eau distillée de tilleul)

*Nane suyu (Hydrolatum menthae piperitae, Eau distillée de menthe poivrée)

*Taflan suyu (Aqua laurocerasi, Hydrolatum laurocerasi, Eau de laurier cerise)

*Hydrolatum cinnamomi (Eau distillée de canelle)

*Turunç çiçeği suyu (Aqua aurantii floris, Eau distillée de fleur d'oranger, Hydrolat de fleur d'oranger)

*Lavanta hidrolası (Eau distillée (hydrolat) de lavande)

Bu kaynak içinde Eau laxative de vienne ve Eau gazeuse olmak üzere iki preparat da aromatik su başlığı altında verilmiştir. İlk preparat sinameki, korint reçenesi, *Polypodium vulgare* L., kişniş, krem tart, kudret helvası ve sudan oluşmaktadır. İkinci preparatta ise sodyum bikarbonat, tartarik asit ve su bulunur (Güven, 2001).

2.3.2.1. Distilasyonla aromatik su elde edilmesi

Uygun bir distilasyon cihazı ile uçucu yağ elde edilirken meydana gelen distiladan uçucu yağ ayrılır. Toplama kabında biriken ve içinde az miktarda çözünmüş durumda uçucu yağ içeren su kullanılır. Farmakopeler distilasyon işleminde kaç kısım drogtan ne kadar aromatik su elde edileceğini ve distilasyon yöntemini belirtmektedirler. Distilasyonla aromatik su elde edilirken dikkat edilmesi gereken en önemli nokta aşırı ısınma ve drogun kazanın kenarlarına değmesinden kaynaklanan kötü kokuların oluşmasına engel olmaktır. Türk Kodeksinde (1940) distilasyonla elde edilmesi önerilen aromatik sular, Aqua Aurantii Floris, Aqua Rosae ve Aqua Laurocerasi'dir (İzgü, 1973).

Distilasyon, uçucu yağların elde edilmesinde en çok kullanılan yöntemdir.

Distilasyon işleminde ısı ve su buharı uçucu yağı buharlaştırır ve diğer uçucu olmayan bileşenlerden ayırır. Su buharı ile sürüklenen yağ buharları soğutucuda sıcaklığın düşmesi ile yoğunlaşır ve genellikle suda çözünmeyen bir sıvı olduğundan sudan kolayca ayrılabilir (El-Gammal, 1991). Uçucu yağın

içerdiği suda çözünebilen bileşiklerin bir kısmı yağ altı suyunda çözünür. Uçucu yağ, yoğunluğunun sudan büyük veya küçük oluşuna göre suyun altında ya da üstünde birikir.

Su distilasyonu, uçucu yağ elde etmek için kullanılabilecek en kolay ve ucuz yöntemdir ve yaygın olarak kullanılır. Ancak, uçucu yağda hidroliz, polimerleşme ve reçineleşme meydana gelebilmektedir. Özellikle suda çözünebilen yüksek kaynama noktalı bileşikler buhar ile yukarıya taşınamazlar. Bu şekilde distillenmiş olan uçucu yağ bitkide doğal olarak bulunan yağı temsil etmez (Thapa, 1989).

Su ve yağ fazının maksimum ayrımı yağ separatörlerinin verimliliğine bağlı olarak yağ separatörleri içinde meydana gelir. Ancak yağ separatörlerinden dışarı akan ve "distilasyon suyu" olarak isimlendirilen su içinde minik damlacık, emülsiyon veya çözelti halinde uçucu yağ bulunur. Uçucu yağın ve distilasyon suyunun kalitesi kazanın, kondanserin ve yağ separatörünün dizaynına bağlıdır. Aynı zamanda distillenecek bitkisel materyalin tipine de bağlı olabilir. Bu sebepten kazana yüklenecek olan bitkisel materyalin hazırlanması dikkatli bir şekilde yapılmalıdır.

Distilasyon suyunun sıcaklığı da çok önemlidir. 25-30 °C'lik çalışma sıcaklığı, distilasyon suyundaki total yağın ne kadarının çözelti halinde, emülsiyon formunda veya küçük damlacıklar halinde kalacağını belirler.

Distilasyon sularının aynı zamanda bitkisel materyalin distilasyon esnasında nem ve ısıya maruz kalmasından kaynaklanan dekompozisyon ürünlerini (çoğunlukla çözelti halinde) içerdiği de belirtilmiştir. Dekompozisyon ürünleri distilasyon işlemine tabi tutulan bir bitkisel materyalden diğerine değişebilir. Son ürün olarak elde edilen yağda bu maddelerin varlığı yağın kokusunu ve kalitesini etkileyebilir. Distilasyon suyundan yağın kazanılması verimli bir şekilde yapılırsa kokuyu veren maddelerinde tümü ile kazanılması aynı şekilde mümkün olur. Bu şekilde kazanılan uçucu yağ dekompozisyon ürünleri ile büyük ölçüde bulaşmış olacaktır. Böyle bir yağ, orijinal olarak bitkisel materyalde mevcut olan ve doğal uçucu yağın sahip olduğu koku, fiziksel ve kimyasal sabitler ile stabil kalma özellikleri bakımından farklı olacaktır.

Distilasyonu yapılan çeşitli bitkisel materyaller farklı tipte dekompozisyon ürünleri verirler. Dekompozisyon ürünlerinin uçucu yağların elde edilmesinde istenmeyen maddeler olarak karşımıza çıktıkları görülmektedir. 'Mümkün olduğu kadar doğala yakın' bir forma sahip uçucu yağın elde edilmesi her zaman tercih edilmiştir.

Distilasyon suyundan uçucu yağın başarılı bir şekilde kazanılmasının (aynı zamanda dekompozisyon ürünlerini elimine ederek) arkasında yatan teorik düşünce kazanmanın ya sadece geri besleme (feed-back) ile başarılacağı veya aynı işlemin bir ayırma apareyinde yapılabileceği şeklindedir (Gokhale, 1959; El-Gammal, 1991).

Bitkisel materyallerin laboratuvar ölçekli distilasyonunda her bir yüklemde 50-100 g materyal kullanılır. Bu nedenle her bir yüklemde kazanılacak yağ miktarı genellikle sadece bir kaç gram olur. Yağ sıklıkla apareyin duvarlarına yapışır ve aynı zamanda distilatta emülsiyon formunda kalır. Distilleme işlemi tamamlandıktan sonra uygun bir çözücü ile distilatı tekrar tekrar ekstre etmek ve aynı çözücü ile apareyi yıkamak ve bu yıkama çözeltilerini biraraya getirmek yağın tam olarak kazanılmasını sağlayabilir. Ancak kazanılan yağın büyük ölçüde dekompozisyon ürünleri ile kontamine olabileceğini unutmamak gerekir. Yalnızca uçucu yağı toplayabilecek ancak distilatta bulunan dekompozisyon ürünlerini toplamayacak bir işlemin bulunması gerekmektedir.

Uçucu yağların endüstriyel üretiminde su ve su-buhar distilasyonu işlemlerinde olduğu gibi distilasyon suyu uçucu yağı kazanmak maksadı ile sıklıkla kazanın dibine geri beslenir (feed-back). Distilasyon suyunun sıcaklığı bu anda 25-30 °C civarında veya daha az olabilir. Ancak kazanın dibinde bulunan kaynayan suyun sıcaklığı 100 °C civarındadır. Bu yüksek sıcaklıkta uçucu yağın büyük bir kısmı çözelti halinde bulunur. Su geri beslendiğinde 25-30 °C gibi düşük sıcaklıklarda distilasyon suyunda damlacık ve emülsiyon formlarında bulunan yağ kısmı kazanın dibindeki su içinde büyük miktarlarda çözelti oluşturmaya başlar. Kaynayan su kaynama sıcaklığında uçucu yağ ile doyma aşamasına geldiğinde geri besleme yağının evaporasyonu ve kazanılma aşaması başlar. Kazanın dip kısmı paslanmaz çelik veya kalayla kaplı bakırdan yapılmışsa

yağın kazanılması açısından daha büyük başarı elde edilebilir. Metal tuzları ortamda bulunuyorlarsa ıslanmış yüklemenden damlayan uçucu olmayan ekstre edici materyal ve sürekli kaynama geri beslenen yağın polimerize olmasına neden olur. Düşük seviyede geri kazanım gerçekleşir. Dekompozisyon ürünlerinin eliminasyonu göz önüne alındığında kazanın dibinde yüksek miktarda su bulunması dekompozisyon ürünlerinin büyük kısmı çözelti içinde kaldığı sürece yararlı olacaktır (Gokhale, 1959).

2.3.2.2. Aromatik suların uçucu yağlardan hazırlanması

Bu yöntemde uçucu yağ suda eritilerek aromatik su elde edilmektedir. Uçucu yağlar, genellikle suda çok az çözünen maddelerdir. Bu yüzden bazı uçucu yağların suda çözünme yeteneklerini arttırmak için alkol kullanılır. Ayrıca suda çözünmelerini kolaylaştırmak üzere 40-50 °C'deki distile su kullanılır. Uçucu yağların suda çözündürülmesi ile elde edilen aromatik suların kokuları kuvvetlidir, ancak distilasyon ile elde edilenlere göre aromaları daha zayıf ve tatları daha keskindir (İzgü, 1973).

Üç şekilde hazırlanabilirler (İzgü, 1973):

1. Basit Çözündürme Yöntemi
2. Yardımcı Maddeler Etkisi ile Çözündürme Yöntemi
3. Uçucu Yağları Çözünmeyi Arttıran Maddelerle Çözmek

2.3.2.3. Basit çözme yöntemi

1-2 g uçucu yağ 100 ml distile suda çalkalanarak eritilir ve 1-2 gün sonra ıslak filtre kağıdından süzülür (USP). Bu yöntemde uzun süre çalkalamak gerekir ve uçucu yağ kolayca erimez (İzgü, 1973).

2.3.2.4 Yardımcı maddeler yardımıyla çözme yöntemi

Türk Kodeksi 1940 bu yöntemle aromatik su hazırlamak için aşağıda verilmiş olan genel formülün kullanılmasını istemiştir:

Uçucu Yağ	1.5 k
Saf Talk	15 k
Taze kaynamış ve soğumuş su	1000 k

Talk uçucu yağ ile iyice ezilip karıştırılır, yeni kaynatılmış ve 40-50 °C'ye soğutulmuş su yavaş yavaş dikkatle çalkalanarak ilâve edilir. Durulduktan sonra tamamiyle berrak veya çok hafif bulanık bir sıvı elde etmek üzere süzülür. Bu yöntemde talk, uçucu yağın su ile temas yüzeyini artırır, böylece suyun uçucu yağ ile kısa zamanda doyması sağlanmış olur. Ayrıca çözünmemiş uçucu yağın süzülmesine de yardım ederek daha berrak bir süzüntü alınmasına yardımcı olur. Bu şekilde elde edilen aromatik sulardan T.K. 1940'ta kayıtlı olanlar Aqua Cinnamomi (Tarçın suyu), Aqua Melissa (Melisa suyu) ve Aqua Menthae Piperitae (Nane suyu)'dir (İzgü, 1973).

2.3.2.5 Uçucu yağları çözünmeyi arttıran maddelerle çözmek

Polioksietilen sorbitan monolaurat gibi maddeler yardımıyla talk ve alkol kullanmadan bazı uçucu yağlardan kolayca aromatik su elde edilebilir.

Nane uçucu yağı	12 ml
Polioksietilen sorbitan monolaurat	11 ml
Distile su k.m.	100 ml için

Bu yöntemle hazırlanan sular uzun süre dayanmazlar.

1953 İngiliz Farmakopesinde bundan başka konsantre aromatik sular yer alır. Bu sular 20 g uçucu yağ (örneğin tarçın veya nane uçucu yağı) 600 g alkolde eritip su ile litreye tamamlayarak hazırlanırlar. Aromatik su elde etmek için 30 misli su ile sulandırılırlar (İzgü, 1973).

2.3.3. Aromatik suların kullanımı

Aromatik sular, ender olarak tıbbi amaçla kullanılırlar (Taflan suyu). Tadı hoş olmayan etken maddelerden hazırlanan ilaçların kolay içilebilmesi için koku ve lezzetini düzeltmek amacıyla kullanılırlar. Süspansiyon ve emülsiyonlarda (çoğu zaman sıvı faz olarak) sadece koku vermek maksadıyla kullanılırlar. Ayrıca bazı sıvı veya katı maddelerin lezzet ve kokularını örtmek amacıyla da kullanılırlar (İzgü, 1973).

Bazı durumlarda uçucu yağ, distilayı benzen, petrol eteri vb. çözücülerle ekstre ederek kazanılır. Çözücü fazı ayrılır ve distillenir. Çözücünün bulunması muhtemel kalıntıları vakum altında uzaklaştırılır. Geriye kalan madde “essential” veya “otto” olarak isimlendirilir. Kokulandırılmış sular (perfumed waters) bazı törenlerde ve ayinlerde, şekerleme ve banyolarda sulara koku kazandırmak için kullanılırlar. Bazı kokulandırılmış sular veya “araks” olarak isimlendirilen sular Ayurveda tıbbında kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak “aqua dill” ve “aqua aniseed” verilebilir. Gül ve “kewra” çiçeklerinden hazırlanan sular en çok parfümeride kullanılır (Kanpur, 1958).

Çiçeklerden elde edilen sular ve aromatik sular su ile güzel kokulu maddelerden hazırlanırlar. Belli miktardaki materyal, belirli bir süre belli hacimde su ile distillenir. Önceden belirlenen hacimde distilat üreticilerin kendilerine ait formüllerine uygun olarak toplanır. Bu sular tek, çift veya üç kez distilenmiş halde hazırlanırlar ve pazaranırlar.

“Ruh-i gulabis” gül suyundan hazırlanır. Aromatik su derin olmayan bir toprak veya metal kap içine konur, muslin ile kapatılır ve gece boyunca açık havada soğuk hava akımına tabi tutulur. Yüzeyde beliren güzel kokulu ve yağimsı madde toplanır ve şişelenir.

Bu şekilde çiçeklerden elde edilmiş aromatik sular ve benzeri kokulu ürünler, kutsal yerlerde ve dinsel olmayan amaçlarla parfümü yaymak için kullanılırlar. Kuzey Hindistan’da bu sular temiz içme sularına buz halinde katılır. Bu maksatla çok az miktarda kullanılır (Mahindru, 1992).

Distilasyon metodunun sonunda distilasyon suyu gül suyu veya nane suyu gibi isimler altında yağ alı suyu olarak satışa sunulur. Çünkü bu sular yağ ile

doymuş durumdadırlar ve ekstre edilmiş uçucu yağların kokusuna ve tadına sahiptirler (El-Gammal, 1991).

Achillea millefolium, *Solidago canadensis*, *Angelica archangelica*, *Matricaria recutita* gibi bitkilerden elde edilen distilalar üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* ve *Hamamelis virginiana* hidrosolleri ile yapılan çalışmalar güçlü antioksidan özellikte olduklarını göstermiştir. Bir diğer araştırmada *Hamamelis* hidrosolünün hidrokortizon kreminde karşı antiinflamatuvar özelliği karşılaştırılmıştır. Etki açısından *Hamamelis* ikinci gelmekle beraber topikal glukokortikoidlerin yan etkileri nedeni ile kullanımının sınırlı olması karşısında bazı üstünlüklere de sahip olduğu görülmüştür. Bu üstünlükler cilt atrofisi ve hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninin baskılanması gibi lokal ve sistemik reaksiyonlardır (Korting ve ark., 1993; Catty, 1998).

2.3.4. Aromatik suların saklanma koşulları

Aromatik sular ancak birkaç preparata yetecek kadar hazırlanmalı ve çok miktarda stok yapılmamalıdır. Bu suların içinde bulunan uçucu yağlar ışıktan bozulurlar ve mikroorganizmaların üremesi sonucunda koku ve tatlarını kaybederler.

Aromatik sular, sıkı kapalı kaplarda saklanırsa dahi kabın içerisindeki havada anaerobik mikroorganizmaların üremesinden dolayı çabuk bozulurlar. Bu yüzden aromatik suların ağzı pamuk tıkalı renkli şişelerde saklanması tavsiye edilmektedir. Bu şekilde sürekli taze hava girip çıkabilir. Aromatik sular donduklarında kolayca bozulabilirler. Aromatik suların bozulmalarını önlemek için koruyucu maddeler ilave etmek gerekir. Ayrıca İsviçre Farmakopesi, distilasyonla elde edilen gül suyu ve portakal çiçeği suyunun ağızları pamukla tıkalı renkli şişelerde 1 saat 80⁰'lik su banyosunda tuttuktan sonra serin bir yerde ışıktan korunacak şekilde saklanmasını istemektedir (İzgü, 1973).

Yağ altı sularını korumak için ideal saklama koşulu 10 °C civarında sabit bir sıcaklıktır. Ancak küçük dalgalanmalar gösteren bir sabit sıcaklık 10 °C'den bile daha fazla önem taşımaktadır. Örneğin 18 °C gibi yüksek bir sıcaklık eğer

sabit konumda ise uygun kabul edilmiştir. Ancak sıcaklık değişirse kondensasyon kaçınılmaz olur ve şişenin içinde yoğunlaşma meydana gelir. Ardından hidrosollerde bozulma veya kontaminasyon gelişir. Bazı hidrosollerin küflerin gelişmesine diğerlerine göre daha eğilimli olduğu görülmüştür. Uçucu yağlar içerdikleri bileşiklerin tipine göre de değişen uzun bir ömre sahiptir. Hidrosoller ise monoterpenleri ve diğer hidrofobik bileşikleri içermedikleri için korunmaları zorlaşır. Bu nedenle bazı firmalar yarı ömrü uzatmak ve soğukta saklama ihtiyacından kurtulmak için koruyucu maddeler eklemektedir (Catty, 1998).

2.3.5. Aromatik suda çözünen bileşiklerin ekstraksiyonu

Aroma bileşiklerinin üretiminde en başta gelen geri alma ve ayırım tekniği distilasyondur. Ancak bazı sebeplerden dolayı bu işlem tek başına distilasyon ile gerçekleştirilemez.

1.Yaygın olarak uygulanan distilasyon teknikleri, relatif olarak sınırlı genişlikte kaynama noktalarına sahip olan sınırlı sayıda kimyasal madde için kullanılabilir. Doğal aroma materyalinin distilasyonu sonucunda organoleptik açıdan yeri doldurulamayacak fraksiyonların kaybı kaçınılmaz hale gelir.

2. Distilasyon işlemi zorunlu olarak küçük ölçekte yapılsa bile elde edilen değişken yapıda değerli aroma, ısı ile zarar görecektir.

3. Distilasyonu kimyasal özelliklerindeki farklılıklara bakmadan yakın kaynama noktasına sahip maddelerin ayırımında uygulamak imkansızdır.

4. Distilasyon, bir karışımdan çok küçük miktarda maddelerin alınması isteniyorsa kaynama noktaları belirgin bir biçimde birbirinden farklı olsa bile uygun bir yöntem değildir.

5. Distilasyon, seyreltik su fazından aroma maddelerinin alınmasında yetersizdir. Doğal tat ve koku maddelerine kaynak teşkil eden materyaller ile çalışıldığında bu durum göz önüne alınmalıdır.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon alternatif bir yöntem olarak göze çarpmaktadır. Bu işlem bir çözeltideki bileşiklerin, birbirine karışmayan iki sıvı arasında partiyon katsayılarına bağlı olarak ayrılmasıdır. Ekstraksiyon oranı, ara yüzey temas alanı ve sıvı fazlardaki bileşik konsantrasyonlarının denge halinden sapmaları ile

orantılıdır. İşlem sonunda gerçekleşen faz ayrımı sonucunda karışımdaki bileşikler arzu edilen şekilde ayrılmış olurlar.

Her ne kadar sıvı-sıvı ekstraksiyonu relatif olarak basit bir işlemse de endüstriye uygulanması ilk bakışta görüldüğünden daha zordur. Endüstride kullanılan sıvı-sıvı kontaktörlerde bir faz diğeri içinde damlalar halinde dağıtılır. Küre şeklini almış bu damlacıklar verilen hacim için minimum yüzey alanına sahiptirler. Ara yüzey alanını arttırmak için çok fazla çalkalama yapılırsa faz ayrımına engel olan stabil emülsiyonlar oluşabilir.

Karşı akım ile ekstraksiyon cihazlarında sıvı fazlarının mekanik dispersiyonu ile bağlantılı olan daha ciddi bir problem aksiyal karışım olarak bilinen olaydır. Bu durum materyalin iki fazda kalış zamanının çok değişmesine yol açarak ekstraksiyon oranını önemli ölçüde düşürür ve ekipman performansı üzerine negatif etkisi büyük olur.

Hacimler relatif olarak küçük iken doğal ürünlerin aşırı şekilde çeşitlendirildiği tat ve koku endüstrisinde klasik bir metot olan sıvı-sıvı ekstraksiyonun yaygın halde kullanılması yüksek maliyete sebep olmaktadır (Fleisher, 1990).

Distilasyon işlemi esnasında kondensat, soğutucudan yağ ayırıcı (separatör) içine akar. Burada distilasyon suyu ve uçucu yağ otomatik olarak birbirinden ayrılır. Özgül ağırlıklarının farklı olmasından dolayı iki sıvı, iki tabaka halinde ayrılır. Daha hafif olan yağ suyun üzerinde toplanır. Yağın özgül ağırlığı 1.0 den büyük ise yağ, separatörün dibinde toplanır. Birçok separatör eski Florentin kaplarının prensibine bağlı olarak yapıldığından “Florentin kabı” ismini almıştır. Florentin kaplarının dizaynları, distillenen yağın sudan ağır veya hafif olmasına bağlı olarak suyun uzaklaşmasını sağlayacak şekilde yapılmalıdır.

İki karışmayan sıvının ayrımı, bunların özgül ağırlıklarındaki büyük farklılıktan dolayı çok hızlı ve tam olarak meydana gelir. Bu nedenle suyun özgül ağırlığının biraz altında bir özgül ağırlığa sahip yağlar veya yağların fraksiyonları oda sıcaklığında distilasyon suyundan tam olarak ayrılamazlar. Ancak süt benzeri süspansiyon veya emülsiyonlar oluştururlar. Bu gibi durumlarda soğutucudan Florentin kabına gelen distilanın daha sıcak olmasını sağlamak gerekir. Çünkü

sıcaklığın yükselmesi ile birlikte yağın özgül ağırlığı suyunkine oranla oldukça düşük bir değere ulaşır. Sonuç olarak, yüksek sıcaklıkta yağ ve su arasında özgül ağırlık bakımından meydana gelen büyük farklılık, iki tabakanın çok kolay bir şekilde ayrılmasını sağlar. Diğer yandan oda sıcaklığında bir yağın özgül ağırlığı suyunkinden biraz yüksekse (sudan daha ağır bir yağ) distilat mümkün olduğu kadar soğuk tutulmalıdır. Bu durumda sıcaklıktaki herhangi bir artış, zaten küçük olan yağ ve su arasındaki özgül ağırlık farkını daha da düşürür. İki tabakanın ayrımı imkansız olmasa da zor hale gelir.

Bununla beraber bu durum istisnadır. Genel bir kural olarak birçok uçucu yağ göz önüne alındığında, kondenserin sıcaklığı yağın evaporasyonunu ve kaybını önlemek için mümkün olduğu kadar düşük tutulur (Guenther, 1948).

2.3.5.1. Aromatik sulara yapılmış olan ekstraksiyon ve analiz çalışmaları

Aromatik suların sıvı-sıvı ekstraksiyonuna ilişkin ilk araştırmalar içerisinde gül suyu ile ilgili olanlar göze çarpmaktadır. İki çalışmada 200 ml aromatik suyun 50 g tuz ile doyurulduktan sonra 30 ml pentan ile ekstre edildiği ve bu pentan ekstresinin gaz kromatografisi ile analiz edildiği belirtilmiştir (Rollet ve Monghal, 1967; Rollet ve ark., 1967).

Ayrıca üç ofisinal işleme göre hazırlanmış Aqua Floris Aurantii, Aqua Menthae piperitae, Aqua Foeniculi, Aqua Anisi ve Aqua Rosae aromatik suları üzerinde yapılan bir çalışma da bulunmaktadır. Bu çalışmada yağın su ve ve talk arasındaki dağılımı gravimetrik yolla bulunmuştur. Bu dağılım yağlarda bulunan bileşikler için gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemlerinde pentan kullanılmıştır. Bir yıllık saklama sürecinde aromatik sudaki yağın kimyasal bileşimindeki değişiklikler de bu çalışmada incelenmiştir (Von Schantz ve Juvonen, 1969).

Bir diğer çalışmada ise, nane ve gül aromatik sularının konsantrelerinin nasıl hazırlanabileceği anlatılmaktadır (Chistiakova, 1978).

Anadolu'nun bazı bölgelerinde geleneksel yolla kekik suyu elde etmek için *Thymbra spicata* kullanılır. Yapılan bir çalışmada bu kekik suyu kullanılmıştır.

Aromatik su dietileter ile ekstre edilmiştir. Çözücü uzaklaştırıldıktan sonra karvakrolce zengin (% 87) bir ekstre elde edilmiştir (Baytop ve Başer, 1995).

Gülyağından gülsuyuna geçen monoterpen alkollerin belirlenmesi için gülsuyunun ayırma hunisinde kloroform ile ekstre edildiği bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, gülsuyunda bulunan sitronellol, geraniol, nerol ve fenil etil alkol miktarı distilatı bekletme süresi, pH ve sıcaklık parametrelerine bağlı olarak belirlenmiştir. Gülyağının su fazında kalma süresinin bu maddelerin miktarları üzerine etkili olduğu bildirilmiştir (Bayrak ve Şencan, 1995).

Hyptis crenata Pohl (Labiatae)'dan elde edilen uçucu yağ ve distilasyon suyundan elde edilen uçucu bileşikleri içeren ekstrede yapılmış olan çalışmada, ana bileşik olarak uçucu yağda α -pinen (% 15.5), β -pinen (% 10.5), kafur (% 17.3) ve β -karyofilen (% 10.7), ekstrede ise 1,8-sineol (% 11.9), kafur (% 37.3) ve β -karyofilen (% 14.7) bulunmuştur (Scramin ve ark., 2000).

Balsamita suaveolens Pers. (Costmary) uçucu yağı ve aromatik suyunun incelendiği bir çalışmada 25 ml aromatik su 5 ml *n*-hekzan ile 3 kez (2+2+1 ml) ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstre GK ve GK/KS ile analiz edilmiştir. Uçucu yağın ve ekstrenin monoterpenler açısından zengin ve karvonun ana bileşik olduğu belirtilmiştir (Gallori ve ark., 2001).

Güle benzeyen kokuya sahip *Pelargonium* türlerinin uçucu yağlarının suda çözünen fraksiyonları ile yapılan çalışmada distilasyon suyu 10:1 oranla hekzan ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Buhar distilasyonu ile ayrılan yağa "ilk yağ", hekzan distilasyon ile uzaklaştırıldıktan sonra kalan yağa ise "ikincil yağ" (tali yağ, secondary oil) adı verilmiştir (Rajeswara Rao ve ark., 2002).

Origanum compactum Bentham'un aromaterapi açısından önemini inceleyen bir araştırmada, bu bitkiden elde edilen hidrolanın ve uçucu yağın bileşimi belirlenmiştir (Jeannot ve ark., 2003).

Eucalyptus citriodora Hook'dan elde edilen uçucu yağ (yaprakların su buharı distilasyonu ile doğrudan elde edilmiş) ve 'tüketilmiş' (distilasyon suyunun hekzan ile ekstraksiyonu) uçucu yağların kimyasal bileşimi üzerinde yapılan bir çalışmada uçucu yağın sitronellal (% 70.3), sitronellol (% 8.8), sitronellil asetat (% 1.3) ve β -karyofilen (% 2.6), yağ altı suyundan elde edilmiş yağda ise

isopulegol (% 53.0), borneol (% 10.0), mentol (% 5.3), neral (% 6.9), geraniol (% 1.4) ve öjenol (% 4.6) bakımından zengin olduğu bulunmuştur. Sitronellal'in yağ altı suyunun ekstraksiyonu ile elde edilmiş yağda bulunmadığı belirtilmiştir (Rajeswara Rao ve ark., 2003).

2.3.5.2. Distilasyon suyunun işlenmesi ve kohobasyon

Yağ ayırıcı (Florentin kabı)'ya akan distilasyon suyu, çözelti veya süspansiyon halinde bir miktar uçucu yağ içerir. Burada miktar, çeşitli yağ bileşiklerinin çözünürlüğüne ve özgül ağırlıklarına bağlıdır. Distilanın sıvılaşmış su buharı ve yağ buharlarının bir karışımından oluştuğu düşünülecek olursa distilatın su fazının, gerçekte ortamdaki sıcaklıkta tümüyle doymuş durumda yağın sulu çözeltisini temsil ettiği ortadadır. Suda bir miktar çözünürlüğü olan bu yağ bileşikler distilasyon suyunda kısmen çözünür, bu yağın çözünmüş olan kısmı bileşim açısından Florentin kabında ayrılmış yağdan farklıdır. Florentin kabında ayrılan yağa “Ana Yağ”, suda çözünen kısma ise “Su Yağı” ismi verilir. Suda çözünen bileşikler daha çok oksijenli bileşiklerden oluşur. Bu bileşikler, oksijensiz bileşikler (terpenler, seskiterpenler vb.) den daha yüksek özgül ağırlığa sahip olduklarından, su yağı genellikle ana yağdan daha yüksek özgül ağırlığa sahiptir.

Distilasyon suyu, yağı sadece gerçek çözelti şeklinde içermez. Aynı zamanda damlacıklar ve emülsiyon şeklinde de yağ mevcuttur. Distilasyon suyunda beliren çok veya az süt şeklindeki görünüm yağın varlığını gösterir.

Bu şekilde elde edilmiş olan distilasyon suyu atılamaz. Yağın kaybını önlemek için bazı işlemlere tabi tutulmalıdır. Distilasyon suyu, su distilasyonu veya su ve buhar distilasyonunda distilasyon süresince otomatik olarak geri döngüye sokulur. Bu amaçla Florentin kabı kazandan yeterince yüksek bir yere yerleştirilmelidir. Böylece kaptan kazan içine doğru akış, kazan içindeki basıncın üstesinden gelir. Buhar distilasyonunda (ayrı bir yerde yerleşmiş durumdaki buhar kazanından gelen buharla) distilasyon suyu, distilasyon kazanı içine gönderilmez. Çünkü çok fazla sıvı kondanse olur ve kazan içinde birikme yaparak bitkisel materyalin ıslanmasına neden olur. Bu nedenle distilasyon suyu yeniden

distilasyon için ayrı bir kazana pompalanır veya enjekte edilir. Yeniden distilasyon ile sudan yağın kazanılmasını sağlayan bu işleme yaygın olarak “Kohobasyon” adı verilir. Bu amaçla kullanılan kazanlar “Kohobasyon Kazanları” olarak bilinir. Orijinal anlamı ile kohobasyon terimi distilasyon suyunun yeni bir bitki yüklemesinin distilasyonunda (su veya su ve buhar distilasyonu) tekrar tekrar kullanılmasını ifade eder. Ancak günümüzde kohobasyon, distilasyon sularının yeniden distilasyonu anlamına gelmektedir.

Distilasyon suları bir buhar ceketine veya kapalı dairesel bir buhar borusuna sahip yuvarlak kazanlarda çok verimli bir şekilde yeniden distillenebilirler. Dolaylı bir yoldan ısıtma tercih edilir, çünkü imbik içine buharın enjeksiyonu imbik içinde çok fazla suyun birikmesine neden olabilir ve yağın buharlaşarak sudan ayrılmasına neden olabilir. Bir çok distilasyon suyu göz önüne alındığında çözünmüş veya süspande olmuş yağın çoğunu kazanmak üzere yalnızca % 10-15’inin distillenmesine gerek olduğu görülmüştür. Atık konumundaki su artık atılabilir. Bununla beraber bazen suyun miktarının yarısından fazlasını distillemek gerekebilir. Böyle bir durumda distilasyon sonrası yağın dikkate değer bir kısmı yeniden distilasyon suyunda çözünecektir. Kohobasyonu kısaltmak ve kondensattaki yağ miktarını arttırmak için kohobasyon kazanındaki su genellikle tuz ile doyurulur. Bu madde uçucu yağın suda çözünürlüğünü azaltır; yağ daha az miktarda su ile çok daha hızlı bir şekilde distillenir. Bu işlem, özellikle distilasyon suyunun sadece buhar distilasyonu ile kazanılamayacak suda biraz çözünen ve yüksek kaynama noktalı bileşikleri içermesi durumunda dikkate alınmalıdır (Guenther, 1948).

Terpenik uçucu yağ bileşikleri olan piperiton, pulegon ve karvon kullanılarak yapılan bir çalışmada bu bileşiklerin çözünürlükleri farklı sıcaklıklarda belirlenmiştir. Sırası ile sodyum klorür, glikoz ve sakarozun çözüldürülmesi bu uçucu yağ bileşiklerinin çözünürlüğünü azaltmıştır. Bu durumun ilâve edilen maddenin çözeltide hidrate olması ve bu bileşiklerin hidrasyonunda olan su moleküllerinin ikinci bir bileşiğin dissolüsyonuna uygun olmadığı şeklinde açıklanmıştır (salting out effect). Bu durumda uçucu yağ bileşiğinin çözünürlüğü de azalacaktır. Aynı kaynaktan piperiton ve pulegon’un

sıcaklık artışı ile çözünürlüklerinin azaldığı, karvon'un ise 10-30 °C arasında minimum çözünürlük sergilediği gösterilmiştir (Smyrl ve LeMaguer, 1980).

Aynı şekilde hidrokarbon, alkol, oksit ve keton yapısındaki monoterpenlerin suda doymuş çözeltileri hazırlandıktan sonra sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemini kullanarak yapılmış olan suda çözünürlük, buhar basıncı ve aktivite katsayısını belirlemeye yönelik bir çalışma da mevcuttur (Fichan ve ark., 1999).

Su ve yağın kohobasyon ile ayrımı basit bir prensibi esas alır. Yağ buharları ile su buharı karışımı, saf su buharından biraz daha düşük kaynama noktasına sahiptir. Ayrıca yükselen buhar karışımı sıvı fazdan çok yağ içerir. Kohobasyon hızını azaltmak distilatın yağ içeriğini arttırabilir. Çünkü yükselen buhar daha fazla yağ buharı ile doyurulacaktır (Guenther, 1948).

Distilasyon suyunda çözünmüş veya dağılmış halde olan yağı kazanmak için diğer bir metot ise öncelikle tuz ile doyurmak ve sonra uçucu çözücüler ile çözeltiyi ekstre etmektir. Bu genellikle iki kez yapılır. Sonra vakum altında çözücüler uzaklaştırılarak eser miktarda bile olsa yağda çözücünün kalmaması sağlanır (Guenther, 1948; Curtis ve Williams, 1994).

Aromatik bitkilere uygulanacak herhangi bir distilasyon yöntemi çok düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilse bile uçucu olmayan bitki bileşiklerinde dekompozisyon ürünleri oluşturabilir. Bu ürünler (metil alkol, formaldehit, asetaldehit, aseton, küçük yağ asitleri, azotlu bileşikler, fenoller vs.) kondensata girebilir ve tespit edilebilir kirlilikler oluşturabilir. Bu maddeler suda çözünürlüklerinden dolayı esas olarak distilasyon suyunda çözünürler, çünkü suyun miktarı yağinkine göre çok fazladır. Bu gibi dekompozisyon ürünlerinin mevcudiyetinden dolayı, kohobasyon veya ekstraksiyon yöntemlerini kullanarak elde edilen ham haldeki su yağı, çoğu durumda renklidir ve hoş gitmeyen kokuya sahiptir.

Ana yağ ile su yağının birleştirilmemesi gerekir. Ana yağın kokusunu ve tadını bozabilir. Bu nedenle ham su yağının iyi bir vakumlu distilasyon cihazında fraksiyonlanması tavsiye edilir.

Bir çok durumda daha önceden adı geçen dekompozisyon ürünlerinin büyük ölçüde suda çözünür durumda olması uçucu yağların saflaştırılmasında, yani bir yağ hidrodistilasyon ile yeniden distillendiği zaman işe yaramaktadır. Bundan sonra distilasyon suyu atılır (Guenther, 1948).

Bitkisel materyallerin, buhar distilasyonunda geri besleme uygulanamaz. Distilasyon suları yuvarlak dipli kazanlarda ayrı olarak işlenir (kohobe edilir). Böyle bir işlemde çalışma fasılalar halinde gerçekleştirilir. 50 veya 100 galon distilasyon suyu bir seferde alınır. Başlama sıcaklığı 25-30 °C veya daha azdır. Bu su kaynama kazanına gönderilir ve içeriğin % 10 veya daha fazlası distillenir. Oldukça yüksek miktarda uçucu yağ 100 °C civarındaki kazanın içinde mevcut olan büyük miktardaki suda çözelti halinde kalır. Yağın tümü ile kazanılabilmesi böyle tek kademeli bir distilasyon apareyinde mümkün değildir. Kazanılan miktar, teorik olarak beklenen miktar kadar yüksek olmaz (Gokhale, 1959).

Gül yağı gibi bazı yağların suda çözünürlüğü oldukça yüksektir. Böyle bir durumda distilasyon sürerken meydana gelen sulu faz içerisinde bulunan ve bu şekilde kaybedilen yağ miktarı yüksek olabilir. Kondanse olmuş suyu separatörden kazan içine geri göndermek bu problemi çözebilir. Bu kapalı geri döngü sisteminde toplam su miktarını sınırlandırarak suda çok çözünen uçucu yağın verimini arttırmak mümkündür. Distilasyon suyunun sirkülasyonunu uzatmak çeşitli kirliliklerin ve sistemde oluşan bitkisel dekompozisyon ürünlerinin yağa karışmasına neden olacaktır. Bu durum yağın kalitesini etkileyebilir ve kohobasyon ile distilasyon sisteminin kullanıldığı durumlarda göz önüne alınması gerekir. Çapraz akış şeklinde yükselen buhar ile distilasyon suyundan çözünmüş yağı sıyırıp alan özel kohobasyon sistemleri mevcuttur. Bu şekilde lavanta, nane ve rezene distilasyonunda % 3-8 oranında yağın kazanılması mümkün olmuştur (Thapa, 1989).

Kohobasyon işlemi, gerçekte birbirleri içinde çözünürlüğü sınırlı olan çok bileşenli sıvı sisteminin distilasyonudur. Böyle bir sistemde buhar fazı (ve kondensat) her zaman için daha yüksek oranda en az çözünür durumdaki bileşikleri içermektedir. Yağın doğasına bağlı olarak yağın geri alınmasına olanak sağlamak amacı ile sulu fazın % 15-50'si distillenmelidir. Suda daha çok çözünen

uçucu yağ bileşiklerinin buharlaştırılması, çok yüksek miktarda su fazının distilasyonunu gerektirmektedir. Bu durum yeni oluşmuş olan kondensatta yüksek derecede dissolüsyona neden olur.

Çeşitli kaynaklar kohobasyonun, yağ bileşiklerinin ancak kısmi ve oransız bir şekilde geri alınmasını sağlayabildiğini belirtmektedir. Buna ek olarak suyun varlığında uçucu yağın uzun süre ısıtılması çeşitli kimyasal değişmelere ve zararlara sebep olur. Sonuç itibarıyla “kohobasyonla alınan yağ” sıklıkla değişmiş ve kalitesiz organoleptik profil sergilemektedir.

Kohobasyonla alınan yağın daha çok oksijenli bileşikler kısmını içerdiği ve bunun ilk yağ ile karıştırılıp karıştırılmaması hususu tartışılmaktadır. Görünüşe göre kohobasyonla alınan yağın pek bilinmemesi ve su fazından yağın geri kazanılabilmesi için kullanılabilecek güvenilir ve ekonomik bir yöntemin eksikliği uçucu yağ üretiminin bu yönünü gölgede bırakmıştır.

Doğal aroma maddelerini üreten ve kullanan kişiler mümkün olduğu kadar doğala yakın bir ürün elde etmek ve bunu kullanmak istemektedir. Bu durumda kalite standardı bir çiçeğin, parçalanmış bir yaprağın kokusu veya henüz sıkılmış bir meyvedir. Bunu gerçekleştirebilmek için kimyasal içeriği tespit edilen aromanın tamamlayıcı özellikteki unsurlarının tümünü elde etmek gerekmektedir. Distilasyon süresince uçucu yağ bileşiklerinin su fazına geçerek kayba uğramaları bu amaca ulaşılmasını engellemektedir (Fleisher, 1991).

2.3.5.3. Distilasyon suyundan absolü elde edilmesi

Geranium yağı, lavandin, lavender, neroli, petitgrain, gül vb. bitkilerin buhar veya su distilasyonu neticesinde meydana gelen distilasyon suları kolaylıkla ayrılması mümkün olmayan önemli miktarlarda çözülmüş veya disperse olmuş kokulu maddeleri içerirler. Bu gibi distilasyon suları petrol eteri veya benzen ile ekstre edilirler. Çözücünün uzaklaştırılmasından sonra elde edilen kalıntı yani "distilasyon suyu konkriti" alkol ile ekstre edilir veya ilk ekstraksiyondan elde edildiği şekilde kullanılır. Lavender Suyu-Absolüsü veya Gül Suyu-Absolüsü bu şekilde hazırlanır. Bu absolüer terpen içermezler ve esas olarak bitkisel materyaldeki uçucu yağın suda çözünen bileşiklerini içerir. Su absolüleri uçucu

yağlarda veya parfüm bazlarında sıklıkla bulunmayan veya istenen çok ilginç koku karakteristiklerini sergilerler (Arctander, 1960).

Distilasyon suları içinde kaybedilen yağların geri kazanılması için en sık kullanılan yöntem kohobasyondur. Kohobasyon ile su distilasyonunda sadece sınırlı miktarda su kullanılabilir. Uçucu yağ ile doymuş durumda olan bu su fazı siklusa sokulur. Toplama kabında ayrılmış olarak kalan yağ distillenmiş uçucu yağ fazıdır. Distilasyon işleminin sonunda yağ ile doymuş durumda bir miktar suyun kalacağı ortadadır. Bu yağ kohobasyon işlemi ile ortaya çıkarılamayan yağdır. Bununla beraber yağın kazanılması için saf, uçucu ve karışmayan bir çözücü ile suyun karıştırılması ve sonra çözücünün vakum distilasyonu ile uzaklaştırılması ve kazanılması gerekir. Kazanılan yağ sonradan son ürünü oluşturmak üzere toplama kabındaki yağ fazı ile birleştirilir. Çözücü ekstraksiyonu ile distilasyon sularından uçucu yağların kazanılması her ne kadar basit gibi görünse de tek bir ekstraksiyon işleminin sudan sadece çözünmüş yağın bir kısmını alabileceğini unutmamak gerekir. Bu kısım, herhangi bir ekstraksiyon sisteminde aynı sıcaklık şartlarında iki çözücü göz önüne alındığında büyük ölçüde maddelerin bu çözücülerin her birinde çözünürlüğüne bağlıdır. Herhangi bir uçucu yağ, suya göre hekzan gibi bir hidrokarbon çözücüde çok fazla çözündüğü için çözünmüş durumdaki yağın çoğunu bir aşamada sudan alabilmek için böyle bir çözücünün kullanılması ekonomik olarak uygun gibi görünür. Ancak bir kısım madde her zaman suda kalır ve taze çözücü ile ekstraksiyonun kaç kez tekrarlandığının önemi yoktur. Distilasyon sularından uçucu yağların kazanılması için kullanılan kohobasyon işlemi çok yavaştır. Yağ içeren su ve karışmayan bir ekstraksiyon çözücüsü kapalı bir kaptaki birlikte bekletilirlerse yağ bileşiklerinin moleküllerinin su/çözücü ara yüzeyine çok yakın durumda olmaları nedeni ile ara yüzeyden çözücü içine çok kolay bir şekilde geçebilecekleri düşünülür. Ancak normal difüzyon işleminde ara yüzeyden belli bir mesafede bulunan maddenin çözücüye ulaşması uzun zaman alır. Yağın ekstraksiyonu büyük ölçüde sistemin ajitasyonu ile hızlandırılır. Sıvılar globüller haline getirilir, çözücü içinde dağılmış olan distilasyon suyunun toplam yüzey alanı büyük ölçüde arttırılmış olur. Yağ bileşiklerinin moleküllerinin su/çözücü ara yüzeyine

ulaşmadan önce difzlenmeleri gereken mesafe ortalamasının üstünde büyük ölçüde azaltılmış olur. Karışmama özelliğine sahip çözücüler kullanılarak gerçekleştirilen fasıllalı işleme alternatif olarak sürekli işlem verilebilir. Ekstre edilecek çözünmüş maddeyi içeren sıvı, sonraki kazanım için gerekli maddeyi toplayacak olan karışmayan ekstraksiyon çözücüsü içinden geçer. Bu işlem çapraz-akış sıvı-sıvı çözücü ekstraksiyonu olarak bilinmektedir ve uçucu yağların deterpene edilmesinde kullanılan işlemlerden biridir (Verghese, 1986; Curtis ve Williams, 1994).

2.3.6. Terpenik maddelerin suda znrlğ

Esas olarak hidrokarbonların hidroforik veya aşırı lipofilik davranış gösterdikleri bilinmektedir. Oksijenli bileşikler (hidrate -OH ve =O taşırlar) iyonik olmayan karşılıklı etkileşimlerin haricinde protik ve aprotik karşılıklı etkileşimler nedeni ile çözelti içine geçmektedirler. Acı nane (Tıbbi nane) distilasyonunda az miktarda mentol su ile birlikte çözeltinin içine geçer. Bu şekilde çözünürlük tümü ile artış gösterir. Çünkü lipofilik $C_{10}H_{20}$ - kısmı çözeltinin tamamı ile azalmış polaritesinden dolayı organik bileşiklerin dissolsyonuna katkıda bulunurken mentolün hidrofilik -OH'i mentolün kısmi olarak suda çözünmesini sağlar. Bu polar/apolar ve protik/aprotik karşılıklı etkileşimler distilasyondan elde edilen kondensat sularında bulunan suda çözünmüş uçucu yağın bileşiminin belirlenmesinde esas rolü oynar. Kondensat suyunda çözünmüş olan uçucu yağın gerçek bileşimi, distilasyon süresine ve verilen bu sreye karşılık gelen çözünür madde konsantrasyonuna bağlıdır (Spencer, 1992).

Monoterpenler, düşük moleküler ağırlığa ve apolar karaktere sahiptirler. Bu sebepten uçucu oldukları ve diğer organik bileşik grupları ile karşılaştırıldıklarında önemsiz sayılabilecek derecede suda znebildikleri düşünülmektedir (Weidenhamer ve ark., 1993).

Distilasyon boyunca kaynayan su, bitki dokularının içine nüfuz eder ve salgı bezlerinin içinde bulunan uçucu yağın bir kısmını çözer. Bu sulu çözelti hücre membranlarından geçerek difüze olur. Yüzeye ulaşan yağ hemen buharlaşır. Bu işlem yağın tümü hücrelerden uzaklaşıncaya dek sürer. Oksijenli bileşikler,

hidrokarbonlara nazaran kaynayan suda daha fazla çözündüklerinden bu maddelerin difüzyonları daha kolay gerçekleşir. Bu şekilde bitkisel materyalden uçucu yağların distilasyonu süresince farklı bileşiklerin hücre membranları içinden geçerek difüze olma oranı, bileşiklerin kaynama noktasından daha fazla önem taşımaktadır. Bu nedenle bileşikler, kaynama noktalarının sırasını takip etmekten çok distilasyon suyundaki çözünürlük derecelerine göre buharlaşırlar. Başka bir deyişle, yüksek kaynama noktalı oksijenli bileşikler (polar yapıda, bu nedenle çok çözünür) hidrokarbonlardan önce distillenir. Taşıyıcı olan su ile difüzyonun bu tipine, Von Rechenberg tarafından hidrodifüzyon adı verilmiştir (Von Rechenberg, 1910; Koedam, 1981; Denny, 1989).

2.3.7. Aromatik sular üzerinde yapılmış olan biyolojik aktivite ve antimikrobiyal aktivite araştırmaları

Baharatlardan elde edilen uçucu yağlar, ekstreler ve dekoksiyonlar üzerinde antibakteriyel aktiviteleri ile ilgili bazı çalışmalar yapılmış olmasına rağmen baharatların hidrosolleri ile ilgili olarak sınırlı sayıda araştırma mevcuttur.

Licaria puchury-major tohumlarından elde edilen hidrolanın ve uçucu yağın (ana bileşik olarak safrol içerdiği belirtilmiştir) üzerinde motor aktivite, barbiturat uyku zamanı, vücut ısısında düşme, anestezi ve elektrik şoka bağlı konvülsiyonlara karşı koruma gibi bazı farmakolojik incelemeler yapılmıştır. Hidrolanın farelerde motor aktiviteyi azalttığı ve barbiturat uyku zamanını uzattığı belirtilmiştir. Uçucu yağın motor aktiviteyi azalttığı, anesteziye yol açtığı ve aynı zamanda hayvanları elektroşoka karşı koruduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte hidrolanın anesteziye yol açmadığı ve elektroşokla oluşan konvülsiyonlara karşı fareleri korumadığı belirtilmiştir (Carlini ve ark., 1983).

Bazı aromatik suların kullanıldıkları dozlarda mikroorganizmaların gelişimini artırdıkları veya inhibe ettikleri görülmüştür. Aromatik suların mikrobiyolojik incelenmesine örnek olarak verilebilecek bir çalışmada anason, tarçın, karanfil, dereotu, limon, tıbbi nane, kloroform suyu (chloroform water, British Pharmaceutical Codex (1973)'te karışım halindeki maddeleri koruyucu

olarak kullanıldığı belirtilir) ve gül suyu (rose water)'nun, *Pseudomonas aeruginosa*'nın gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Tarçın suyunun *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı farkedilir ölçüde koruyucu aktivite gösterdiği görülmüştür (İbrahim ve Ogunmodede, 1991).

Anadolu'da kekik yağı geleneksel yolla üretilir. Distilasyon işlemi bittikten sonra uçucu yağ alınır, kalan distilat Anadolu'da halk arasında gastrointestinal hastalıkların önlenmesinde kullanılır. Bunun için genellikle *Origanum* türleri kullanılır (Aydın ve ark., 1993a).

Origanum onites L. (İzmir Kekiği)'nin uçucu ve uçucu olmayan fraksiyonlarının kullanıldığı bir çalışmada gerek uçucu yağın gerekse yağ altı suyunun anlamlı derecelerde barbiturat uyku zamanını uzattığı bulunmuştur. Uçucu olmayan fraksiyonun ise uyku zamanını kısalttığı saptanmıştır. Bu çalışmada yağ altı suyunun, uçucu yağı ile birlikte akut toksisitesi araştırılmış ve uçucu yağın 1.3 ml/kg dozunda akut letal etkide bulunduğu, yağ altı suyunun verilebilecek en yüksek dozda bile hiçbir akut toksisitesi olmadığı görülmüştür (Aydın ve ark., 1993b).

Origanum onites L.'den elde edilen kekik suyu (*Origanum* Water) üzerine yapılan ayrıntılı bir çalışmada, bu aromatik su kimyasal ve farmakolojik olarak incelenmiştir. Laboratuvar koşullarında elde edilen kekik suyu, önce *n*-hekzan ile sonra kloroform ile ekstre edilmiştir. Ekstreler GK/KS ile analiz edilmiş ve farklı bileşime sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır. Hekzan ekstresinin karvakrolce zengin olduğu, kloroform ekstresinin ise *p*-ment-4-en-1,2-diol ve bu bileşiğin 3-en izomerini taşıdığı görülmüştür. Bu çalışma kekik suyunun gastrointestinal hastalıkların profilaksisinde veya tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağını ortaya çıkarmak için yapılan ilk çalışmadır (Başer, 1995; Aydın ve ark., 1996a).

Kekik suyunun kardiyovasküler sistem üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada yağ altı suyunun *in vivo* olarak sıçanlarda kan basıncında bir artışa yol açtığı belirtilmiştir (Aydın ve ark., 1996b).

Kekik suyunun koleretik etkisi üzerine yapılmış olan bir araştırmada akut dönemde bir koleretik etkinin varolduğu, fakat bunun kısa etkili ve daha önce

diğer bitkisel materyallerle yapılan testlerden alınan sonuçlara göre çok daha hafif bir koleresis şeklinde olduğu gösterilmiştir (Aydın ve ark., 1996c).

Lippia sidoides Cham.'in uçucu yağının *Aedes aegypti* larvalarına karşı etkisini inceleyen bir çalışmada, uçucu yağın ve hidrolasının (uçucu yağın suda doymuş çözeltisi) buhar distilasyonu ile elde edildiği ifade edilmiştir. Kimyasal bileşimleri Gaz Kromatografisi analizi ile belirlenmiştir. Biyolojik etki deneyleri uçucu yağ, saf ve seyreltilmiş hidrola ve ana bileşikler olan timol ve karvakrolle yapılmıştır. Uçucu yağın ve hidrolasının larvisit etki gösterdiği görülmüştür. *Lippia sidoides* uçucu yağının ana bileşiklerinden biri olan timol'ün larvisit etkiden sorumlu bileşik olduğu belirlenmiştir (Carvalho ve ark., 2003).

Umbelliferae, Labiatae, Lauraceae ve Anacardiaceae familyalarına ait 16 farklı bitki üzerinde yapılan bir çalışmada hidrodistilasyon ile hazırlanmış hidrosollerin içinde *Origanum vulgare* L. hidrosolünün deneyde kullanılan 15 bakteri türünün tümüne karşı aktif olduğu gösterilmiştir (Sağdıç ve Özcan, 2003).

Pelargonium (Geraniaceae) yapraklarından distilasyonla elde edilen uçucu yağ ve hidrosol'ün gıdalarda *Staphylococcus aureus* ve *Enterobacter aerogenes*'e karşı antimikrobiyal etkilerini incelemek amacı ile yapılan bir çalışmada, önceden inoküle edilmiş gıda modelinde uçucu yağ etkili olurken hidrosol bakteri kolonilerini arttırmıştır. Bu nedenle bu bitkilerin hidrosollerinin gıdalarda antibakteriyel olarak kullanılamayacağına kanaat getirilmiştir (Lis-Balchin ve ark., 2003).

Backhousia citriodora tat verici olarak ve aromaterapide kullanılmaktadır. Bu bitkiden elde edilen yağ, yaprak lapası, ticari çay ve hidrosol (sulu distilat)'ün 13 bakteri ve 8 mantara karşı biyoaktivite çalışmaları yapılmıştır. Yapraktan hazırlanan çayın ve hidrosolün çok az etkili olduğu veya etkisinin bulunmadığı görülmüştür. Uçucu yağın ise antibakteriyel ve antifungal etkisi olduğu belirtilmiştir (Wilkinson ve ark., 2003).

Bir başka çalışmada *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ve *Yersinia enterocolitica* isimli dört patojen bakterinin *Thymus vulgaris* L., *Thymus serpyllum* L., *Origanum vulgare* L., *Origanum onites* L. ve *Origanum majorana* L.'den Clevenger hidrodistilasyonu ile hazırlanan

hidrosollere karşı duyarlılığı incelenmiştir. Sonuçta bu çalışmada iki *Thymus* ve üç *Origanum*'dan elde edilen hidrosoller denenilen dört patojene karşı büyümeyi inhibe edici etki göstermiştir. Bu hidrosollerin gıda koruyucusu olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır (Sağdıç, 2003).

2.3.8. Kekik suyu

Türkiye'de Akdeniz ikliminin hakim olduğu bölgelerde halk, kekik suyu hazırlamak için distilasyon yöntemini kullanır ve sağlığını korumak için bu suyu içer. Kekik suyunu hazırlamak için, kullanılacak uygun bir kazan ateş (genellikle odun alevi üzerinde yapılır) üzerine yerleştirilir. Bitkisel materyal kazan içine konur ve bitkinin üstünü örtecek kadar su ilave edilir. Kazanın iç kısmında merkezde bir yükselti üzerine bir kap yerleştirilir. Kazanın kapağı baş aşağı gelecek şekilde konur ve yüzeyi soğuk su ile kaplanır. Distilasyon süresince aromatik su kapağın yüzeyinde yoğunlaşır ve ortadaki kap içinde toplanır. Kap distilat ile tamamen dolunca distilasyon bitirilir. Distilat üzerinde toplanan uçucu yağ bir kaşık yardımı ile alınarak bir şişeye konur veya atılır. Bu şekilde hazırlanan aromatik su soğutulduktan sonra içilir. Bu su, gastrointestinal hastalıklara karşı iyi geldiği için kullanılmaktadır. Ayrıca sindirim sistemi ülserleri, kanser ve diabete iyi geldiğine inanılır. Antifungal özelliğinden dolayı incirler kurutulmadan önce bu suya daldırıldıktan sonra kurutulur. Suyun patojenik mantarların üremesini önlediğine inanılmaktadır (Tabata, 1988; Başer, 1995).

2.3.8.1. Kekik suyu üzerinde yapılmış çalışmalar

Kekik suyu üzerinde yapılmış olan ekstraksiyon ve farmakolojik çalışmalar hakkında bazı bilgiler yukarıda verilmiştir. Ayrıca farklı teknikler kullanılarak yapılmış bazı çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalar özet olarak aşağıda verilmiştir.

1999 yılında toplanmış kültür bitkisi (Boydağ ve ark., 2000a; Boydağ ve ark., 2000b) ve 2000 yılında toplanmış ticari kekik bitkisi (Boydağ ve ark., 2001)

üzerinde çalışmalar yapılmış ve sonuçları yurtiçi ve yurtdışı toplantılarda poster olarak sunulmuştur. İlk iki çalışmada su distilasyonu ile uçucu yağ ve yağ altı suyu elde edilmiştir. Distila üzerinde sıvı-sıvı ekstraksiyon ile birlikte Katı Faz Ekstraksiyonu ve Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu uygulanmıştır. Diğer çalışmada ise su buharı distilasyonu ile uçucu yağ ve yağ altı suyu elde edilmiştir. Distilat, değişik polaritelere sahip çözücüler ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuş, elde edilen ekstrelerin GK/KS analizleri yapılmıştır.

Katı Faz Ekstraksiyonu yöntemi ile gerçekleştirilen çalışmada Clevenger apareyinin dereceli kısmından alınan numunelerin birleştirilmesi ile elde edilmiş olan distilatta bulunan aromatik bileşikler KFE C₁₈ kartuş kullanılarak izole edilmiştir. Bu çalışmada metanol, *n*-hekzan ve kloroform olmak üzere üç farklı polaritede çözücü kullanılarak çözücülerin KFE tekniği ile izolasyondaki etkinliği incelenmiştir. Metanol ekstresinde ana bileşikler karvakrol (%71.2), *cis*-p-ment-4-en-1,2-diol (%15) ve timol (%2.4)'dür. *n*-Hekzan ekstresinde ana bileşikler karvakrol (%83.8), timol (%13.4), terpinen-4-ol (%1.2) ve linalol (%1.0) olarak bulunmuştur. Kloroform ekstresinde ise ana bileşikler karvakrol (%83.0), timol (%11.1), terpinen-4-ol (%2.1), linalol (%1.5) ve borneol (%1.1)'dür. Sonuçlar incelendiğinde, *cis*-p-ment-4-en-1,2-diol'un sadece metanol ile elüe edilebildiği görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda, kekik suyu önce *n*-hekzanla sonra kloroform ile ekstre edilmiş (sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi kullanılarak) ve elde edilen kloroform ekstresinde bu maddenin yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (Aydın, 1996; Boydağ ve ark., 2000b). Böylece KFE (C₁₈) ekstraksiyon tekniği ve metanol kullanılarak bu maddenin Kekik Suyu'ndan izole edilebileceği anlaşılmıştır.

Katı Faz Mikro ekstraksiyonu ile yapılan çalışmada su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın ana bileşikleri karvakrol (% 52.3), γ -terpinen (% 9.5), timol (% 6.9), linalool (% 4.8) ve p-simen (% 4.9) olarak bulunmuştur. Uçucu yağ alındıktan sonra kalan distilat ile *n*-hekzan ekstraksiyonu, Tepeboşluğu Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu (TB-KFME) ve Daldırmalı Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu (D-KFME) gerçekleştirilmiştir. TB-KFME ısı kullanarak ya da kullanmadan yapılmıştır. Deneylerin tümünde karvakrol ana bileşiktir. TB-KFME'de

ısıtılmayan ve ısıtılan örneklerdeki minimum ve maksimum karvakrol içeriği (% 82.5-89.8) iken D-KFME’de bu değer % 88.1 olarak bulunmuştur. Distilattan elde edilen *n*-hekzan ekstresi ısıtılarak yapılan TB-KFME’ye benzer şekilde % 89.8 karvakrol içermektedir. *n*-Hekzan ile ekstre edildikten sonra kalan su fazının kloroform ile ekstre edilmesi sonucunda elde edilen kloroform ekstresinde bileşimin değişik olduğu ve ana bileşik olarak *cis*-p-ment-4-en-1,2-diol (% 87.7)’ün bulunduğu görülmüştür. Bu ekstrenin karvakrol içeriği ise % 12.3’tür. Bu nadir mentendiol Kekik suyunda p-ment-3-en-1,2-diol ile birlikte daha önceki bir çalışmada gösterilmiştir (Aydın, 1996). Bu bileşik KFME ile minör bileşik olarak bile tespit edilememiştir. Önceki çalışmada ise bu mentendiol *n*-hekzan ekstresinde ve KFME deneylerinde detekte edilmiştir (Aydın, 1996). Bu durum önceki çalışmada farklı kaynaklı bir materyalin kullanılması ile açıklanabilir. KFME’nin Kekik hidrosolü’nün incelenmesi için *n*-hekzan ekstraksiyon yöntemine göre basit ve zamandan tasarruf sağlayan bir yöntem olduğu anlaşılmaktadır.

Ticari bir ürün olan ve 2000 yılında toplanan kekik bitkisi üzerinde farklı polaritelerde organik çözücüler kullanılarak geleneksel yöntemle sıvı-sıvı ekstraksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan bitkisel materyal karvakrol içeriği düşük bir materyaldir. Ancak bu durum çalışmanın esasını distilat oluşturduğundan önemli değildir. Bitkiden buhar distilasyonu ile % 2.3 ve su distilasyonu ile % 2.9 verimle uçucu yağ elde edilmiştir. Yağların ana bileşikleri karvakrol (% 28-34), timol (% 12-14), γ -terpinen (% 8-10), linalool (% 7-10), *cis*-sabinen hidrat (% 5-9) ve p-simen (% 4-5)’dir. Distilattan elde edilen en iyi ekstre verimi dietil eter ile gerçekleştirilmiştir (% 0.1). Etil asetat, dietil eter, metilen klorür ve *n*-hekzan ile elde edilen dört ekstrenin ana bileşikleri karvakrol ve timoldür. Bütün ekstreler oksijenli bileşiklerin varlığını gösterirken eter ekstreleri ayrıca alkan ve alken türevi hidrokarbonları da içermektedir. Yeniden distilasyon sonrasında distilatın önce *n*-hekzan sonra da kloroform ile ekstre edilmesi ile p-mentendiollerin seçici bir şekilde ekstraksiyonun yapılabileceği görülmektedir. Tüm kloroform ekstrelerinde ana bileşik *cis*-p-ment-4-en-1,2-diol (% 58-69)’dür. Bu maddeyi *cis*-p-ment-3-en-1,2-diol (% 8.0-9.5) ve *trans*-p-ment-

3-en-1,2-diol (% 2.1-2.3) takip etmektedir. Distilatın Clevenger apareyinde yeniden distilasyonu neticesinde % 0.2 verimle uçucu yağ elde edilmiştir. Yağın ana bileşikleri karvakrol (% 53), timol (% 22), terpinen-4-ol (% 12) ve linalool (% 7)'dür. Yeniden distilasyondan sonra apareyin balonunda kalan su fazı kloroform ile ekstre edilmiş ve ekstrede ana bileşik olarak *cis-p-ment-4-en-1,2-diol* (% 55)'ün bulunduğu görülmüştür. Aynı bileşik suyun yeniden distillenmesi ile elde edilen yağda minör bileşik olarak (% 0.2) bulunmaktadır. Kloroform ekstresi 2,3-dihidroksi-p-simen (% 14) isimli bileşiği de içermektedir (Boydağ ve ark., 2001).

Bir diğer çalışmada Türkiye piyasasında mevcut olan kekik sularından sekiz tanesi seçilerek sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstrelerin kimyasal bileşimleri GK/KS analizi ile ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada kullanılan kekik suları marketlerden temin edilmiştir. Bunun yanında bir numune, üretiminden hemen sonra taze olarak kullanılmıştır. Kekik suları süzöldükten sonra metilen klorür ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstrelerin yüzde verimleri belirlenmiş ve GK/KS analiz sonuçları verilmiştir. Buna göre, ekstre verimleri % 0.05-0.1 arasında değişkenlik göstermektedir. Ekstrelerin tümünde ana bileşik % 49.0-94.5 ile karvakrol'dür. Bunun yanında timol % 1.9-18.7 ve linalool % 0.5-12.8 oranında bulunmaktadır. Ayrıca *cis-p-ment-4-en-1,2-diol* en yüksek oranda (% 25.2) üretiminden hemen sonra kullanılan kekik suyunda bulunmuştur (Boydağ ve ark., 2002).

Tez çalışmalarına paralel olarak gerçekleştirilen bu çalışmaların sonuçları bir araya getirilerek yayınlanmıştır (Boydağ ve ark., 2003).

2.4. Ayırım Metotları

Suda çözünmüş bileşiklerin ortamdan izolasyonu için kullanılabilecek ayırım metotları aşağıda açıklanmıştır.

2.4.1. Endüstriyel membran teknikleri

Membranlar endüstride ayırım işlemleri için kullanılırlar. Bu ayırımlar, materyallerin tek bir faz veya bir çok faz içinde çözünmüş olmalarına bağlı olarak iki kısımda incelenebilir.

Bir membran, belli türde maddelerin hareketini sınırlayan, geçirgen veya yarı geçirgen bir faz, polimer, inorganik bileşik veya metal yapısında olabilir. Bu membran veya bariyer, çeşitli türde maddelerin içinden geçişinin relatif hızlarını kontrol eder. Bu şekilde membranların kullanıldığı ayırımlarla belirli bileşikler bakımından tüketilmiş bir ürün ve bu bileşikler bakımından yoğun hale gelmiş ikinci bir ürün elde edilir. Bir membranın performansı iki basit faktör ile, akış ve tutunma veya seçicilik ile tanımlanır. Akış veya geçirgenlik hızı, birim zamanda membranın birim alanından geçen sıvının volumetrik (kütle veya molar) akış hızıdır. Seçicilik farklı bileşiklerin membran arasından relatif geçirgenlik hızlarının ölçüsüdür. Tutunma, membran tarafından alıkonan beslemedeki madde fraksiyonudur. İdeal olarak yüksek seçiciliğe veya tutunmaya ve yüksek akış veya geçirgenliğe sahip bir membran gereklidir. Membranlar, çeşitli ayırımlar için kullanılabılırler. Gaz ve buhar karışımlarının ayırımı, karışabilen sıvıların (organik karışımlar ve sulu/organik karışımlar), katı/sıvı ve sıvı/sıvı dispersiyonların ve çözünmüş maddelerin sıvılardan ayırımı gibi işlemler membranlar yardımıyla gerçekleştirilebilir. Endüstride membran ayırımlarının başlıca kullanımları aşağıda verilmiştir (Scott, 1995; Humphrey ve Keller II, 1997):

*Mikron veya submikron boyutundaki maddelerin sıvı ve gazlardan ayrılması.

*Makromoleküllerin ve kolloitlerin iyonik türde maddeleri içeren sıvılardan ayrılması.

*Birbiri ile karışabilen sıvı karışımlarının ayrılması.

*Gaz karışımları ile gaz ve buhar karışımlarının seçici ayrımı

*Sadece iyonik türlerin seçici taşınımı.

*Suda ve diğer çözücülerde süspansiyon halindeki veya çözünmüş durumda olan maddelerin tam olarak kazanılması.

Membranlar, sıvı atıklardan organik kirlilikleri ayırmak ve yoğunlaştırmak için kullanılabilirler. Bu uygulamalarda organik kirlilikler, boyutları (molekül ağırlıkları) veya polariteleri esas alınarak uzaklaştırılabilirler. Boyut ayırımlarında, spesifik gözenek boyutu dağılımlarına sahip olan membranlar kullanılır. Gözenekler küçüldükçe küçük molekül ağırlıklı bileşiklerin uzaklaştırılması sağlanır. Bununla beraber membranların gözenek boyutları düştükçe membranın birim alanındaki akış düşer, dolayısıyla verim düşer ve işlem ekonomik olamaz. Membranın kimyasal özelliğine bağlı olarak sıvı atıktaki apolar bileşiklerin polar bileşiklerden ayrılmasında kullanılabilir. Örneğin yüzeyi hidrofilik olan bir membran polar bileşiklerin geçmesine izin verirken apolar bileşikleri alıkoymaktadır. Bu membranlar sulu atıklarda çözünmüş ve emülsiyon halinde bulunan yağları ayırmakta kullanılabilir (Humphrey ve Keller II, 1997; Cheremisinoff, 1998).

Gözenek içermeyen membran ekstraksiyonuna dayanan örnek hazırlama teknikleri yüksek seçicilik sağlamaktadır. Ayrıca kromatografik ve analitik cihazlara doğrudan veya otomatik bağlantılar da uygulanabilmektedir. Destekli sıvı membran ekstraksiyonu, mikro gözenekli membran sıvı-sıvı ekstraksiyonu, polimer yapıda membran ekstraksiyonu ve bir sorban ara birimi ile membran ekstraksiyonu gibi teknikler membrana dayanan örnek hazırlama teknikleridir (Jönsson ve Mathiasson, 2000).

2.4.1.1. Mikrofiltrasyon

Ayırım, membran yüzeyi ve çözelti arasındaki karşılıklı etkileşimler tarafından etkilenirse de, parçacığın alıkonması için esas yöntem “eleme”dir. Membran mikrofiltrasyonu için filtreler, gözenek boyutları aynı olan ve yaklaşık

% 80 gibi yüksek gözenek dansitesine sahip ince polimer filmlerden yapılırlar. Filtrelerin yüksek gözenek dansitelerine sahip olması genellikle hidrodinamik direncin göreceli olarak düşük olmasına neden olur. Bu şekilde membran akış hızları yükselir (Scott, 1995).

Mikrofiltrasyon 0.02-10 μm , yani 200-10.000 Å boyutundaki partikülleri tutabilir. Polen, nişasta, kan hücreleri ve bakteriler ile çok büyük proteinler tutulabilir (Porter, 1997).

Mikrofiltrasyon, aşağıda verilmiş olan üretim ve analitik uygulamalarında kullanılır (Scott, 1995):

*Kimyasal, biyolojik, farmasötik ve gıda endüstrilerinde sıvı ve gazlardan partiküllerin filtrasyonu

*Isıya hassas çözeltilerin ve içeceklerin arıtılması ve steril filtrasyonu

*Saf suyun üretilmesi

*Ürün saflaştırma

*Atık suyun işlenmesi

Ayrıca mikrobiyolojik analiz, klinik ve tıbbi araştırma laboratuvarlarındaki rutin analizler, partikül kontaminasyonunun belirlenmesi (mikroskop altında incelemek amacı ile) gibi bir çok analitik çalışmada fayda sağlar. Farmasötik alanda ilaçların ve çözeltilerin steril ve partiküllerden kurtarılmış hale getirilmesinde, fermentasyon prosesleri için gazların sterilizasyonunda yararlanılır. Gıda ve içecek endüstrisinde biyolojik stabilizasyonu sağlar. Ürün stabilizasyonu yapıldığında, pastörizasyon veya kimyasal sterilizasyona gerek kalmaz (Porter, 1997).

Mikrofiltrasyon ve ultrafiltrasyon, içme suyu, deniz suyu ve atık su uygulamalarında ters osmoz uygulanmadan önce ön işlem olarak kullanım bulmuştur. Deniz suyunun ters osmoz ile tuzunun giderilmesi sırasında membranda kirlenme meydana gelir. Besleme suyunun ön işleminden geçirilmesi bu durumu önler (Ebrahim ve ark., 1997).

2.4.1.2. Ultrafiltrasyon

Ultrafiltrasyon, hidrostatik basınç altında makromoleküler bir çözeltinin filtrasyonla ayrımıdır. Genellikle çapı 20 Å'dan daha büyük moleküler boyutu olan maddeler ultrafiltrasyon ile ayrılabilir. 1 µ'dan daha büyük partiküllerin ayrımı 'filtrasyon' olarak isimlendirilir. Ultrafiltrasyonda 1-10 atm hidrostatik basınç kullanılır (Cross ve Strathmann, 1973). 0.001-0.02 µm (yani 10-200 Å) boyut veya 300-300.000 molekül ağırlığına sahip küremsi proteinler ultrafiltrasyonla tutulabilir (Porter, 1997).

Ultrafiltrasyon işlem açısından bakıldığında mikrofiltrasyona benzer. Ancak daha zor filtrasyon işlemlerini gerçekleştirebilmek için asimetrik membranlar kullanılır. Membranın üst tabakasında gözenek boyutu 0.05 µm-1 nm 'dir. Bu nedenle ultrafiltrasyon, akışkanlardan çok küçük partikülleri ve çözölmüş molekülleri ayıran bir işlemdir. Ayrımın ana ilkesi molekül boyutudur. Molekül şekli ve yükleme ise sekonder faktörler olarak ayırimda rol oynar. 1.000-1.000.000 molekül ağırlığına sahip maddeler ultrafiltrasyon membran tarafından alıkonur. Tuzlar ve su ise membrandan geçer. Kolloitler ve partikül şeklindeki maddeler de membran tarafından alıkonurlar. Ultrafiltrasyon membranları, hem filtrenin içinden geçen akışkan materyali hem de filtre tarafından alıkonan maddeyi saflaştırmak ve toplamak için kullanılabilirler. Gözenek boyutu aralığından daha küçük maddeler filtrenin içinden geçerler. Bu şekilde pirojenlerinden arınmış, süzölmüş ve yüksek molekül ağırlıklı kontaminantlardan ayrılmış olurlar. Gözenek boyutu aralığından daha büyük maddeler filtre tarafından alıkonur ve böylece yoğunlaştırılabilir veya düşük molekül ağırlıklı kirliliklerden arındırılabilirler. Ticari ultrafiltrasyon membranları asimetrik yapıya sahiptirler. 0.1-1 mikron kalınlığında, ince ve beslemeye maruz kalan iyi bir gözenek örgüsüne sahip bir üst tabakadan oluşur. Bu tabaka 50-250 mikron kalınlığında çok gözenekli bir tabaka tarafından desteklenir. Bu kombinasyon yüksek permeabilite ve seçicilik sağlar. Ultrafiltrasyon membranlarının çoğu polimer ve inorganik yapıda olsalar da seramik membranlarda geniş kullanım alanı bulmaya başlamışlardır. Polisülfon, polietersülfon, poliakrilonitril, poliimit,

selüloz asetat, alifatik polimitler ve seramikler, örneğin zirkonyum ve alüminyum oksitler membran materyallerine örnek olarak verilebilir (Scott, 1995). Ultrafiltrasyon yoğunlaştırma, saflaştırma veya ayırım amaçlı kullanılabilir. Proteinler, nükleik asitler, enzimler, antikorlar ve antijenler, virüsler ve kimyasal yapıları ve biyolojik aktiviteleri çöktürme, buharlaştırma veya dondurarak kurutma gibi yöntemler nedeni ile bozulan diğer maddeler için uygun bir yöntemdir (Cross ve Strathmann, 1973; Rosberg, 1997). Ultrafiltrasyon, ters osmoz ve nanofiltrasyon membranlarının tıkanmasını önlemek için ön uygulama amacıyla da kullanılmaktadır (Rosberg, 1997). Gıda, farmasötik, mandıra ve diğer endüstriyel alanlarda yoğunlaştırma, fraksiyonlama, tuz ve renk giderme kolloit uzaklaştırma gibi işlemlerde kullanılan bir yöntemdir (Eykamp ve Steen, 1987).

2.4.1.3. Ters osmoz

Ters osmoz (Reverse Osmosis, Hyperfiltration) iyonik maddelerin ve makromoleküllerin sulu ortamlarda ayırımını sağlamak amacı ile basınç kullanan bir işlemdir. Çözünmüş tuzun uzaklaştırılması yöntemi olan mikrofiltrasyondan farklıdır ve madde ile çözücü arasındaki boyut farkını esas alan fiziksel bir işlem değildir. Böyle maddeler benzer moleküler boyuta ve polimerik ters osmoz membranda geniş aralıkta gözenek boşlukları ile karşılaştırılabilir bir boyuta sahiptir (Scott, 1995) .

Ters osmoz prosesini anlayabilmek için öncelikle osmoz işlemini düşünmek gerekir. Osmoz, eşit hacimde iki çözeltiyi ayırmak için uygun bir yarı geçirgen membran kullanıldığında meydana gelir, bunlardan biri su ve diğeri seyreltik tuz çözeltisidir. Su, osmotik dengeye ulaşıncaya dek membranın su kısmından seyreltik çözelti kısmına transfer edilir, hidrostatik basınca ulaşıldığı noktada madde çözeltisi kısmında osmotik basınç oluşur. Tuz çözeltisi tarafına basınç uygulandığında membran arasından su akışı önlenir ve basınç osmotik basıncı aşarsa akış tersine döner. Bu olay ters osmoz ya da hiperfiltrasyon olarak isimlendirilir. Suyun daha konsantre çözeltiden seyreltik çözeltiye doğru akışı sayesinde tuz konsantrasyonu artırılır (Scott, 1995).

Ters osmoz membranları, inorganik ve organik tüm maddeleri çözeltiden ayırabilir. Maddelerin ayırım mekanizmaları, boyut ve şekilleri, iyonik yükleri ve membranla karşılıklı etkileşimleri ile bağlantılıdır. Bu mekanizma, çözücü ekstraksiyonuna analog teşkil eden ve termodinamik olarak kontrol edilen partiyon olarak görülebilir. Membrandan geçen maddeler ve membran polimeri arasındaki moleküler sürtünmenin üstesinden gelmek için difüzyon süresince 30-100 bar gibi yüksek basınca ihtiyaç vardır (Scott, 1995) .

Ters osmoz uygulamaları için partikül boyutu aralığı yaklaşık olarak 0.0001- 0.001 mikron (1- 10 Å)'dur ve 300 Dalton'dan daha büyük molar kütlelere sahip maddeler ile ayırım gerçekleştirilebilir (Scott, 1995; Porter, 1997). Sulu çözeltilerin işlenmesinde büyük bir uygulama alanı olan ters osmoz esas olarak aşağıda verilmiş olan alanlarda kullanılır:

*Tuzlu su ve deniz suyunun desalinasyonu (Cross ve Strathmann, 1973; Eykamp ve Steen, 1987; Scott, 1995)

*Çeşitli endüstrilerde saf su üretimi (Eykamp ve Steen, 1987; Scott, 1995)

*Gıda ürünleri çözeltileri, farmasötik çözeltiler ve kimyasal sıvıların konsantrasyonunun ayarlanması (Eykamp ve Steen, 1987; Scott, 1995)

*Atık suların işlenmesi (Eykamp ve Steen, 1987; Scott, 1995)

*Kağıt hamurundaki lignosülfonatların kısmen fraksiyonlanması (Eykamp ve Steen, 1987)

Ayrıca elektronik alanında yarı iletken üretiminde gerekli olan çok saf ve yüksek öz direnç ($18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) sahip suların üretiminde ters osmozdan yararlanılmaktadır. Suyun ters osmoz ile muamelesinden önce mikrofiltrasyon uygulanarak $0.5 \mu\text{m}$ 'lik partiküller tutulur (Porter, 1997).

"Doğrudan osmotik konsantrasyon" yönteminde ters osmozdan farklı olarak düşük basınç ve düşük sıcaklık uygulanmaktadır. Meyve sularının meyvenin tat ve renk özelliklerini koruyarak konsantre edilmesinde kullanılmaktadır. Yarı geçirgen bir membran boyunca osmotik basınç gradienti sağlamak ve meyve suyundan suyu uzaklaştırmak için osmotik bir madde kullanılır. Osmotik madde genel olarak suda yüksek çözünürlükte, higroskopik, toksik olmayan, gıdanın tadı, kokusu ve rengi bakımından inert ve membran

içinden geçmeyecek özellikte olmalıdır. Genellikle yüksek konsantrasyonda çözünmüş maddeler, düşük molekül ağırlıklı maddeler yüksek osmotik basınç sağlar. Sodyum klorür, sakkaroz veya gliserol, şeker kamışı melası vb. en çok kullanılan maddelerdir. Osmotik madde çözeltileri konsantre meyve suyundan daha yüksek osmotik basınca sahiptir (Petrotos ve Lazarides., 2001).

2.4.1.4. Nanofiltrasyon

Nanofiltrasyon ters osmoza benzer. Ayırım yeteneği, ters osmoz ve ultrafiltrasyon membranlarının arasında yer alır ve basınç kullanan bir işlemdir. Şekerlerin küçük molekülleri gibi maddelerden iyonların ayırımında kullanılabilir. Bu durum, ince film şeklinde selüloz olmayan membranların geliştirilmesi ile başarılabilmektedir. Membranlar, polisülfon veya polietersülfonun gözenekli substratı üzerine ara yüzey polimerleştirmesi ile oluşturulabilirler. Genellikle bu uygulama, işlemin etkinliğinde gelişmelere yol açmış ve gıda ve biyoteknoloji endüstrilerinde kullanılabilecek yeni ürünlerin üretilebilmesini sağlamıştır. Nanofiltrasyon sistemleri, ters osmozdan daha düşük basınçları kullanır (örneğin 5 bar). Her ne kadar ters osmozdan farklı kalitede olsa da daha yüksek su akış hızı elde edilir. Nanofiltrasyon sodyumun yüksek oranlarda uzaklaştırılmasının gerekmediği ancak Mg ve Ca gibi diğer tuzların (yani divalent iyonların) uzaklaştırılacağı durumlarda kullanılır. Nanofiltrasyon'da yapılan uzaklaştırma işlemleri (5 bar ve 2000 ppm madde), NaCl için % 60, kalsiyum bikarbonat için % 80, magnezyum sülfat, glukoz ve sakkaroz için % 98 oranlarına varmaktadır. Bir çok üretici düşük tuz uzaklaştırma yeteneğine sahip bir seri polimit membran geliştirmiştir. Bu membranlar tuzlu peynir suyunun (diafiltrasyon) ve farmasötik preparatların işlenmesinde uygulanır. Renk uzaklaştırma, yüzey sularından TOC ve trihalometan prekürsörlerinin uzaklaştırılması, kuyu sularından radyum ile TDS'in uzaklaştırılması ve bu suların sertliğinin giderilmesi diğer özel uygulamalardır (Scott, 1995).

2.4.1.5. Pervaporasyon

Pervaporasyon (PV), birbirleri ile karışabilen sıvı karışımlarında bulunan bileşiklerin daha konsantre ürünler halinde ayrılması için kullanılan bir membran işlemidir. Yüksek basıncın gerekli olduğu bir çok ayırımada ters osmozun uygulamada getirdiği sınırlamalar nedeniyle pervaporasyona olan ilgi giderek artmıştır. Ayırım, membranın maddenin geçtiği kısma daha düşük basınç (vakum) uygulanırken, diğer kısmının ayrılacak sıvıya maruz bırakılması suretiyle gerçekleştirilir. Membranı geçen kısmın (permeat) kısmi basıncı bu şekilde doyma basıncından daha düşük tutulur ve ayırım için gereken gücü sağlar. Alternatif olarak inert bir taşıyıcı gaz kullanılarak düşük kısmi basınç oluşturulabilir. Pervaporasyon aynı anda kütle ve ısı transferinin gerçekleştiği karmaşık bir işlemdir. Gizli ısı, sıvının pervaporasyonu için gereklidir. Ayırımın prensibi distilasyona benzemez. Distilasyonda ayırım büyük ölçüde buhar/sıvı dengesine bağlıdır. Bu işlemde ise büyük ölçüde bileşiklerin membranda çözünürlüklerine ve difüzyon kuvvetlerine bağlıdır. Gözeneksiz membrandan geçiş üç adımda gerçekleşir: Besleme bileşiklerinin “şişirilmiş” membranın geçtikleri tarafına doğru partisyona uğramaları (seçici sorpsiyon), geçen maddelerin membran içinden seçici difüzyonu ve membran yüzeyindeki geçen maddenin buhar fazına desorpsiyonu. Bu işlemin sonucunda membranı geçen kısım, membran olmadan sıvı-buhar ara yüzeyinde denge durumunda sağlanabileceğinden daha verimli bir şekilde elde edilebilir. Distilasyon işleminden bu yönde farklı olması pervaporasyonun tercih nedeni olmuştur. Pervaporasyon, buhar/sıvı dengesini etkili bir şekilde değiştirir, daha büyük fraksiyonda ürün buharının tek bir adımda üretildiği yöntemdir. Azeotropların oluşumu işlemi sınırlamaz. Örneğin en büyük uygulama alanı etanol ve su azeotroplarının ayrılmasıdır (dehidratasyon) (Scott, 1995; Scott, 1996).

Membran materyalleri üç gruba ayrılabilir: Camsı polimerler, kauçuk yapılı polimer veya elastomerik polimer ve iyonik polimer membranlar. Polimerin seçimi önemli ölçüde uygulamaya bağlıdır. Camsı polimerler çözücü dehidratasyonu için kullanılan su-seçici membranları yapmak için kullanılır.

Kauçuk yapılı polimer membranlar sudan organik bileşikleri seçici olarak uzaklaştırmak için tercih edilir. İyonik polimerler zıt iyonlar ile nötralleşen iyonik gruplar içerir. Bu membranlar çapraz bağlı polielektrolitler olarak düşünülebilir. Katyonik ve anyonik olmak üzere iki alt grupta toplanabilirler. Suyu cazibeleri olduğu için normal olarak su seçicidirler. İyonik polisakkaritler dehidrasyon membranları yapmak için potansiyel materyaller olarak görülmektedir. Membranlar ince yapıya sahiptirler (50 µm civarında) ve polivinil alkol, poliakrilonitril ve poliakrilamit bazlıdır (Zhang ve Drioli, 1995; Feng ve Huang, 1997).

Pervaporasyonun endüstriyel uygulamaları, kimyasal ve biyokimyasal endüstrilerde araştırma aşamasındadır. Düşük konsantrasyondaki organik maddelerin örneğin alkollerin fermentasyon ortamlarından geri kazanılması ve küçük miktarlarda çözücülerin sudan uzaklaştırılması bu uygulamalara örnek olarak verilebilir (Scott, 1995; Scott, 1996; Feng ve Huang, 1997).

Pervaporasyon işleminin genel uygulamaları şu şekilde verilebilir (Feng ve Huang, 1997):

- *Suyu uzaklaştırma: Alkoller, ketonlar, asitler, aminler

- *Sulu çözeltilerden organik bileşiklerin ekstraksiyonu: Toksik bileşiklerin (hidrokarbonlar, halojenli hidrokarbonlar, aminler, fenoller) uzaklaştırılması, gıda endüstrisinde doğal aromaların kazanılması, parfümeride eser bileşiklerin geri kazanılması

- *Azeotropolar, yakın kaynama noktalı karışımlar: Su/EtOH

- *Organik karışımlar: Alifatik/aromatik bileşikler, izomerler, halojenli hidrokarbonlar vd.

Alkollerden suyun uzaklaştırılması (Atra ve ark., 1999), aroma bileşiklerinin kazanılması ve konsantre edilmesi (Zhang ve Matsuura, 1991; Bengtsson ve ark., 1992; Karlsson ve Trägårdh, 1993; Karlsson ve Trägårdh, 1997; Molina ve ark., 1997; Karlsson ve ark., 1998; Schäfer ve ark., 1999; Girard ve Fukumoto, 2000), organik karışımlardan suyun ayrılması (Shaban, 1997), hidrokarbon karışımlarından alkollerin ayrılması (Shaban ve ark., 1997), biyoreaksiyon ürünlerinin ayrımı, konsantre edilmesi ve saflaştırılması

(Strathmann ve McDonogh, 1993; Lamer ve ark., 1996; Fabre ve ark., 1996; Favre ve Nguyen, 1996; Mathys, 1997; Beauchêne ve ark., 2000) ve uçucu yağ bileşiklerinin yoğunlaştırılması (Mauz ve ark., 1996; Charbit ve ark., 1997) gibi farklı alanlarda yapılan çalışmalar bulunmaktadır.

Pervaporasyon izolasyon amacının dışında yeni bir ayırım tekniği olarak analitik amaçla da kullanılabilmektedir (Luque de Castro ve Papaefstathiou, 1998). Analitik pervaporasyonda buharlaşma ve gaz difüzyonu tek bir modül içinde gerçekleşir. Isıtılan donör fazdaki uçucu bileşikler gözenekli membran arasından buharlaşarak geçerler ve buhar membranın diğer tarafındaki soğuk bir akseptör üzerinde yoğunlaşır. Ayırımın gerçekleşmesini sağlayan sıcaklık farkıdır. Bu şekilde membranın iki tarafında buhar basıncı farkı oluşur.

Pervaporasyon'un tek başına kullanımının yanında pervaporasyon-distilasyon ve pervaporasyon-kimyasal hibrit yöntemleri de geliştirilmiştir (Lipnizki ve ark., 1999).

2.4.1.6. Membran distilasyonu

Membran distilasyonu, besleme kısmında bulunan uçucu bileşiklerin hidrofobik gözenekli membran arasından buharlaştırılması işlemidir. Pervaporasyon işleminden farklı olarak gözenekli membran materyallerinin kullanıldığı bir tekniktir. Bu durumda materyal sıvı besleme tarafından ıslatılmaz ve bu şekilde membran boyunca sıvı penetrasyonu ve iletimi önlenir. Isıtılmış, sulu besleme çözeltisi hidrofobik mikro gözenekli membran ile temas ettirilir. Böylece her bir gözenegin girişinde buhar-sıvı ara yüzeyi meydana gelir. Membran materyali suyu sevmediği için, sıvı haldeki su hidrostatik bir basınç (suyun sıvı giriş basıncı) olmadan gözeneklere giremez. Böyle bir basınç farkının varlığında membranın her iki tarafında sıvı-buhar ara yüzeyi oluşturulur. Bu koşullarda büyük bir sıcaklık farkı membran boyunca korunur. Su buhar basınç farkı her iki ara yüzey arasında oluşur. Buharlaşma sıcak ara yüzeyde gerçekleşir. Buhar gözenekler arasından aktarıldıktan sonra yoğunlaşma soğuk ara yüzeyde olur. Membran, buhar-sıvı dengesi rahatsız edilmediğinden sıvının ayırımı

üzerinde çok az etkilidir. Membran distilasyonu işleminde, membran sıcaklık ve bileşim açısından farklı iki sulu çözeltiyi ayırır. Besleme çözeltisinin uçucu bileşikleri (sıklıkla su) besleme/membran ara yüzeyinde buharlaşır. Bu şekilde buharlaşma/yoğunlaşma mekanizmasının işlemesi nedeniyle özel bir distilasyon şekli olarak görülür. Basınç ve sıcaklığın belirlenmesinden sonra distilat konsantrasyonları ara yüzeylerdeki buhar/sıvı dengelerine bağlıdır. Membranın sulu fazın geçtiği kısmı (permeat), soğutucu bir sıvı (Direct Contact Membrane Distillation, DCMD), hava boşluğu ile membrandan ayrılan bir soğutma yüzeyi (Air Gap Membrane Distillation, AGMD), gaz (Sweeping Gas Membrane Distillation, SGMD) veya vakumdan (VMD) oluşabilir (Udriot ve ark., 1994; Scott, 1995; Lawson ve Lloyd, 1997; Gryta ve Tomaszewska, 1998; Foster ve ark., 2001).

1980 yılından sonra aynı membranların kullanıldığı, ancak farklı bir izotermal işlem olan “osmotik distilasyon” (osmotic distillation, osmotic evaporation) ortaya çıkmıştır. Bu yöntemde membran, bir kısmı uçucu olmayan bileşikleri içeren iki sulu çözeltiyi ayırır. Membranın her iki tarafındaki madde konsantrasyonları farklıdır. Uçucu olmayan bileşiğin varlığı su buharı basıncını düşürür. Bu şekilde membran gözeneklerinin her iki tarafında su buhar basıncı farkı oluşur. Termal membran distilasyonunda olduğu gibi su buharı akışı meydana gelir (Kunz ve ark. 1996; Godino ve ark., 1996; Barbe ve ark., 1998; Mansouri ve Fane, 1999). Su ayrımını sağlayan fiziksel parametre membran distilasyonunda sıcaklık, osmotik distilasyonda ise konsantrasyondur (Mansouri ve Fane, 1999; Petrotos ve Lazarides, 2001).

Membran distilasyonunun uygulamaları aşağıda verilmiştir:

*Deniz suyu, tuzlu su ve atık suların saflaştırılması ve demineralizasyonu (Scott, 1995; Gryta ve Karakulski, 1999; Martínez-Díez ve Vázquez-González, 1999)

*Fermentasyon ortamından etanolün ekstraksiyonu (Scott, 1995; Gryta ve Karakulski, 1999)

*Sulu tuz çözeltisinin ve asitlerin konsantrasyonunun ayarlanması (Scott, 1995)

*Çok saf suyun (ultrapure) elde edilmesi (Gryta ve Tomaszewska, 1998)

*Meyve sularının konsantre hale getirilmesi (Calabrò ve ark., 1994; Laganà ve ark., 2000)

2.4.1.7. Sıvı membranlar

Sıvı membran işleminin esas bir besleme diğeri sıyrıcı (strip) olmak üzere iki homojen ve karışabilir sıvının üçüncü bir faz yani membran vasıtası ile ayrılmasıdır. Çözücü ve taşıyıcıyı içeren membran fazı, besleme ve akseptör çözeltileri ile karıştırılmaz ve pratikte bu çözeltilerde çözünmez. Maddenin beslemeden akseptör çözeltisine aktarımı, üç faz arasındaki iki arayüzeyde oluşturulan uygun koşullara bağlıdır. Besleme/membran ara yüzeyindeki termodinamikler maddenin membrana ekstraksiyonuna yardım eder, aynı anda membran/akseptör ara yüzeyindeki termodinamikler ters aktarıma yani sıyırma işlemine yardımcı olur.

Her ne kadar su bazlı membranlar organik çözeltilerin ayrılmasında kullanılıyorsa da bir çok uygulamada membran organik bir sıvıdır.

Destekli sıvı membranlar sıvı membran fazı destekleyen veya tutan gözenekli bir katı desteğin (polimer veya seramik) kullanılmasını temel alır. İnce, katı desteğin gözeneği tam olarak membran ile doldurulur ve bu doyurma göreceli olarak stabil, heterojen katı/sıvı membranı oluşturur. Bazı uygulamalarda sıvı membran fazı, iki gözenekli katı destek (sıvı membran içeren) arasında sandviç yapılıdır. İnce yassı levhalar veya içi boş elyaflardan oluşan destekler, oleofilik polimerlerden üretilir ve sıvı membran tarafından ıslatılabilir.

Sıvı membran işleminin ikincisi, ikili emülsiyon oluşumunu esas alır ve emülsiyon sıvı membranlar (Emulsion Liquid Membranes, ELM) olarak tanımlanır. Bu sistem, membran sıvısının % 5 ya da daha fazlasını oluşturan bir emülsiyon oluşturuucu madde tarafından stabilize edilen üç faz sistemidir. Bu işlem dört ana aşamadan oluşur: Emülsiyonun hazırlanması, katı maddenin ortamdan çekilmesi, membran ve beslemenin ayrılması, emülsiyonun kırılması.

ELM işleminde ana problemler emülsiyon stabilitesinden kaynaklanır. Düşük stabilite, membranların kısmen kırılmalarına neden olur ve tüm etkinliği düşürür. Yüksek stabilite ise işlemin son kademesi olan emülsiyonun kırılmasında sorunlara yol açar (Scott, 1995). Ekstraksiyon işlemi bittikten sonra emülsiyon santrifüj, ısı, özel maddelerin ilavesi veya elektriksel uygulama (Gang ve ark., 1997; Skelland ve Meng, 1999) ile “kırılır” (Baird, 1983).

Emülsiyon sıvı membran ayırım işlemi ile yapılan çalışmaların esas konusu, endüstriyel atık sularda seyreltik çözelti içinde bulunan bir çok organik ve inorganik bileşikler uzaklaştırmak, kazanmak ve saflaştırmaktır. Organik asitler, fenoller, kresoller ve aminler, bakır, kadmiyum ve civa gibi metal iyonları bu tip bileşiklere örnek olarak verilebilir Bu şekilde atık suların muamelesi ile toksik bileşiklerin düşük seviyelere çekilmesi için çaba harcanmaktadır (Skelland ve Meng, 1999).

Bir çok farmasötik bileşik, pestisitler ve tat bileşikler rasemik karışımlardır. Biyolojik aktivite, bu iki enantiomerden sadece birinde güçlü durumdadır. Enantiomerik karışımları ayırmak için çapraz akış fraksiyonlama ve sıvı membran teknolojisini birleştiren yeni bir teknik kullanılır. Bir rasemik karışım şiral bir ortamda bulunursa, bir enantiomer diğerine göre daha kolay konum bulur. Relatif olarak yüksek konsantrasyonda optik olarak saf şiral bir katkı maddesi içeren bir sıvıda bir enantiomer diğeri ile karşılaştırıldığında daha kolay şiral katkı maddesi ile kompleks oluşturur. Birbirinin aynısı olan iki sıvı, şiral bir katkı maddesinin ya *R*- ya da *S*- enantiomerinin ilave edilmesiyle zıt şiralleşmeye uğratılır. Bu sıvılar birbirleriyle karışabilir durumdadır. Ancak gözenekli bir membran içinde bulunan, karışmayan bir sıvı ile ayrılmış halde bulunurlar. Bu iki şiral sıvı çapraz olarak akar. Şiral sıvılar sulu değildir, sulu bir sıvı membran ile ayrılırlar. Sıvı membran ayrılacak olan enantiomerlere geçirgen, şiral seçici moleküllere geçirgen değildir. Bu şekilde oluşan simetrik sistemde rasemik karışım sistemin ortasına ilave edilir. Saflaştırılan enantiomerler sistemi iki ayrı kısımdan terkeder (Keurentjes ve ark., 1996).

2.4.1.8. Elektrodializ

Elektrodializ, bir yükteki iyonları karşıt yükteki iyonlardan seçici olarak ayırmayı sağlayan bir membran işlemidir. Elektrodializ birimleri iyon selektif membranları kullanır ve bu nedenle iyon değiştirici membranlar olarak isimlendirilirler. Bu membranlar, karşıt yükteki mobil iyonların bağlandığı polimer yapıya bağlı sabit yüklü gruplara sahiptir. Heterojen ve homojen olmak üzere iki tip iyon değiştirici membran kullanılır. Heterojen membranlar iyon değiştirici reçinelerden hazırlanırlar ve genellikle yüksek elektriksel direnç gösterirler. Ayrıca su ile çok şiştiklerinden mekanik güçleri zayıftır. Homojen membranlar iyonik gruba polimer filme bağlayarak hazırlanırlar. Bu polimer film, polistiren (veya polivinil piridin) veya politetrafloroetilen ve poli(sülfonil)florür-vinil eter ile divinilbenzenden oluşan çapraz bağlı kopolimerdir. İyon değiştirici gruplar katyon değiştirici membranlar için sülfonik asit ve karboksilik asit, anyon değiştiriciler için ise kuaterner amonyum tuzlarıdır. Bu membranlar bir elektrolit çözeltisinin içine yerleştirildiklerinde ve mobil iyonların hareketi sayesinde aralarından elektrik akımı geçirildiğinde aynı yüke sahip olan mobil iyonlar membranın bir yüzünden diğer tarafına potansiyel gradientin etkisi altında serbestçe geçerler. Katyonik polimer membranlar katyonlara geçirgendir ve hemen hemen tümüyle anyonlara geçirgen değildir. Ters durum ise anyonik membranlar için geçerlidir.

Bir elektrodializ biriminde her iki tip membran kullanılabilir. Her bir birim birbirinin yerine geçebilecek anyon ve katyon değiştirici membranlar olarak düzenlenmiş çok sayıda (150-400 olabilir) yassı membran tabakalarından oluşur. Bu membran yığını katot ve anot olmak üzere iki elektrot arasına sıkıştırılır. Elektrik akımı doğrudan bu tabakalar içinden geçirilir. Katyonlar, katoda doğru ve anyonlar da anoda doğru hareket etmeye çalışırlar. İyon selektif membranlar yüklü iyonların hareketini sınırlar. Bu şekilde bir bölmedeki katyonlar ve anyonlar komşu bölmedeki karşıt yönlerde yük akımı ile uzaklaştırılırlar. Böylece bu bölümden çözelti seyreltik hale gelir. Komşu bölmedeki iyonların konsantrasyonu artar. Yığında birbiri ardından gelen hücrelerdeki elektrolit

konsantrasyonu düşer. İşlem sırasında elektrolit, membran desteği olarak kullanılan ve kütle transferini yoğunlaştıran kısımlar sayesinde membranlar arasında oluşan dar boşluklarda akar. İki elektrolit akışı sürekli olarak sağlanır. Bunlardan biri tuz konsantrasyonunun artması ile oluşan konsantre akış, diğeri ise tuz konsantrasyonunun düşmesi ile oluşan seyreltik akıştır (Scott, 1995).

Elektrodiyaliz, aşağıda verilmiş olan işlemleri gerçekleştirmek için kullanılır (Scott, 1995):

- *Sulu çözeltilerden tuzların, asitlerin ve bazların ayrılması
- *İyonik bileşiklerin nötral moleküllerden ayrılması
- *Monovalent iyonların çok yüklü iyonlardan ayrılması
- *İyonik kısımların yeni maddelerin oluşması için uygulanması

2.4.2. Sıvı-sıvı ekstraksiyon

Çözücü ekstraksiyonu, bir maddenin bir çözücünden diğesine aktarılmasını esas alan bir ayırma yöntemidir. Birbiri ile temas eden bu iki çözücü karışmaz. Bu teknik hızlı, kolay ve kullanışlı olduğundan çok tercih edilmektedir. Ayırım tam olarak gerçekleşir. Çünkü iki sıvı faz arasındaki relatif olarak küçük ara yüzey alanı, çöktürerek yapılan ayırımların bir çoğunu zorlaştıran ve istenmeyen önceden çökme olayına benzer herhangi bir etkiye meydan vermez. İşlem için sadece bir ayırma hunisinin kullanılması bir çok durumda yeterlidir. Genellikle ekstraksiyon adımı gerçekleştirmek için sadece birkaç dakikaya ihtiyaç vardır. İşlemler eser veya yoğun şekilde çözünmüş maddeler için kullanılabilir. Çok hassas organik veya biyokimyasal maddeler ekstraksiyon işlemleri ile ayrılabilirler. Diğer ayırım işlemlerinde mevcut olan dekompozisyon gibi maddenin yapısına zarar veren durumlar söz konusu değildir (Freiser, 1973).

Sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği gıda endüstrisinde uzun zamandır kullanılmaktadır. 18. yy'da sulu alkolün ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanımı Arap dünyasında bilinen bir uygulamaydı. Daha önce ise su ile ekstraksiyon, aromatik ekstreleri elde etmek için kullanılıyordu. Gıda endüstrisinde genellikle

bitkisel ve hayvansal kaynaklı maddeler ile çalışılır. Her zaman katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyon arasındaki ayırım tam olarak ortaya konamaz.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon değerli bir bileşiğin elde edilmesi için kullanılabileceği gibi, bir hammaddeden istenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması için de gıda endüstrisinde uygulama bulmaktadır.

Küçük ölçekte işlemlere gereksinim duyulmasına rağmen kokuların ve aromaların ekstraksiyonu her zaman büyük ilgi ile karşılanmıştır ve çok sayıda uygulama bilinmektedir. Alkollü çözücüler yaygın olarak kullanılırlar, ayrıca etilen klorür de kullanılmaktadır. Bu çözücü su ile heterojen azeotrop oluşturmamasından dolayı bir avantaj sağlar ve bu şekilde çözücünün kazanılması kolaylaşır. Limon ve portakal uçucu yağları gibi narenciye yağları, gıda endüstrisi için tat bakımından önemli kaynaklardır. Bu yağlar yüksek oranlarda terpen ve seskiterpen gibi hidrokarbonları içerirler (Limon yağında % 90 dan, portakal yağında % 95 ten fazla). Değerli bir oksijenli bileşik olan Sitral % 4-5 oranında bulunur. Yağ bir gıda katkı maddesi olarak özellikle meşrubatlarda kullanılmadan önce, çözünürlük ve stabilite kriterlerini etkileyen hidrokarbonların uygun seviyelere düşürülmesi gerekir. Bu amaçla kullanılabilecek metodlardan biri de sıvı ekstraksiyonudur. Tek bir çözücü veya polar-apolar çözücü çifti kullanılabilir. Genellikle alifatik bir alkol olan tek bir çözücünün kullanılması büyük miktarda çözücüye ihtiyaç varsa uygundur. Yağ oranları, özellikle Sitral ekstresi seyreltilmiş olarak kullanılacaksa, sakınca teşkil etmez.

Kimyasal proses endüstrilerinde bir ekstraksiyon işlemi için çözücü seçimi, çözücü kapasitesi, seçicilik ve geri kazanım maliyeti gibi hususlara bağlıdır. Her ne kadar gıda endüstrisinin bu kriterlerin tümünü dikkate alması gerekse de bir çözücünün kullanılması ile meydana gelen toksikolojik tehlikelere de değer biçmesi gerekmektedir. Ayrıca yüksek kaynama noktasına sahip çözücülerin geri kazanılması esnasında oluşan yüksek sıcaklık nedeni ile ürüne verilebilecek zararlar da düşünülmelidir. Çalışılan mekandaki zararlı çözücü buharlarına maruz kalmaktan doğacak problemler tüm proses endüstrilerinde önemli bir sorundur.

Kanserojen olmaları nedeni ile bazı çözücülerin toksikolojik testlerine olan ilgi artış göstermiştir. Bu çözücülerin gıda maddelerinin işlenmesinde kullanımı kontrol altına alınmıştır. Çok sayıda kısa zincirli hidrokarbon (C5-C8) sıvı ekstraksiyonunda kullanılmaktadır.

Kullanımı uygun görülen bir çözücü, ekstraksiyonda kullanıldıktan sonra izin verilen çözücü artığı seviyeleri otoriteler tarafından belirlenmektedir. Bu miktarların etkisi çözücülerin uzaklaştırılması esnasında çok dikkatli bir şekilde gözlenmelidir. Çözücünün kazanılması esnasında herhangi bir soruna neden olmayan çözücüler daha çok tercih edilmektedir. Her ne kadar düşük molekül ağırlığına sahip alkoller bu kategoride yer alıyorsa da bunları kullanırken istenmeyen esterleşme reaksiyonlarının oluşumunu önlemek için dikkatli olmak gerekir. Sulu alkol bu amaca hizmet eder.

Proteinler gibi makromoleküller ayrılırken, çözücülüklerinin düşük olmasından ve molekül yapısını etkileme ihtimallerinin bulunmasından dolayı belirtilmiş olan basit çözücülerin kullanımı uygun olmayabilir (Hamm, 1983).

2.4.3. Poroplast ekstraksiyon tekniği

Uçucu yağın suda çözünen kısmı ve bu kısmın neden olduğu sorun öteden beri dikkat çekmiştir. Uzun yıllar kaybedilen bileşiklerin sudaki dispersiyonlarından geri kazanılması için çok sayıda teknolojik çözüm ileri sürülmüştür.

Bununla beraber yalnızca eskiden beri kullanılan tekrar distilasyon (redistillation, cohobation) metodu ticari açıdan uygundur ve bazen endüstri tarafından uygulanmaktadır.

Leningrad Üniversitesi'nde geliştirilen bir teknikle distilat suyundan yağın alınabilmesi mümkün hale gelmiştir. Yöntem masrafı azaltmak için üzerinde bir çok modifikasyon yapılmış partisyon kromatografisini baz alır ve uçucu yağların sudaki dispersiyonlarından geri kazanılmasını sağlayan yüksek verimli ticari bir metottur (Kozhin ve ark, 1969; Kozhin ve ark., 1972a; Kozhin ve ark., 1972b).

Sıvı-sıvı dağıtımını esas alan bu yöntem, genel olarak faz temasını içeren tarzı bakımından klasik metottan farklıdır. Maddelerin transferi, sulu faz (hareketli) gözenekli yapıya sahip inert bir desteğin hidrofobik yüzeyi üzerine kaplanmış düşük polaritede organik faz (sabit faz) arasından geçtiği zaman meydana gelmektedir. Özel amaca ve seçilen sıvı fazlara bağlı olarak arzu edilen bileşikler su fazından organik faza aktarılabilir veya verimli bir şekilde geri alım ve/veya doğal maddelerin ayrımı sağlanabilir. İşlemin her iki versiyonu aroma bileşiklerinin sudaki dispersiyonlarından kazanılmasında ve hidrokarbon içermeyen uçucu yağların hazırlanmasında kullanılmaktadır.

Verimli bir ekstraksiyon işlemini gerçekleştirebilmek için, sıvı fazların temas yüzeyini maksimum hale getirmek ve mükemmel bir karşı akım akışını sağlamak gerekir. Bunun için organik fazın gözenekli destek üzerinde ince ($1\mu\text{m}$) ve tek biçimli bir tabaka halinde dağılması gerekir.

Tanımlanan yöntemde kullanılan organik çözücünün seçilmesi için geçerli olan kriter, genel olarak uygulanan çözücü ekstraksiyonu için kullanılan kriterlerden farklı değildir. Çözücü suda çözünmeyen, tercihen düşük kaynama noktalı, herhangi bir artık madde bırakmadan tamamı ile buharlaştırılabilen bir çözücü olmalıdır. Özellikle freonlar veya CO_2 gibi sıvılaştırılmış gazlardan yararlanmak cazip gelmektedir.

Materyalin ve kolon dolgusunun hazırlanmasında kullanılacak yöntemi seçmek, kullanılacak metodu geliştirmek için önemli noktalardır. Bloklar halinde hazırlanmış olan gözenekli politetrefloroetilen (PTFE) ideal bir materyal olarak kabul edilmiştir. Bu madde kimyasal olarak inert bir yapıya sahiptir, bu nedenle yağın kimyasal bileşiminde değişikliğe neden olmaz. PTFE bilinen herhangi bir çözücüde şişmez, böylece seçilmiş olan herhangi bir çözücü sistemi ile çalışmayı mümkün hale getirir.

Poroplast ekstraksiyon tekniğinin fermentasyon ortamı, su içeren reaksiyon ürünleri gibi çeşitli sudaki dispersiyonlardan aroma maddelerinin alınabilmesi için etkili bir yöntem olduğu bulunmuştur. Ekstraksiyon işleminin verimliliği sayesinde aroma bileşikleri seyreltik karışımlardan (100-500 ppm) bile kantitatif ve ekonomik olarak elde edilebilirler. İşlem sırasında çözücüler az miktarda

kullanılır, muamele edilen su fazının miktarına bağlı olarak nadiren % 0.1-1'i aşar.

Poroplast ekstraksiyon tekniği, yağ distilasyonu süresince açığa çıkan su içeren kondensattan uçucu yağ bileşiklerinin alınmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Fleisher, 1983; Fleisher, 1990; Fleisher, 1991).

Bu konuda yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. *Pelargonium graveolens* üzerinde yapılan bir araştırmada elde edilen distilasyon suyu, hekzan:su fazı oranı 1:40 olacak şekilde poroplast ekstraksiyon işleminde kullanılmıştır (Fleisher ve Fleisher, 1985). Diğer bir çalışmada *Ocimum basilicum*'un iki varyetesinden elde edilen distilasyon suyunda kloroform:su fazı oranı 1:40 olacak şekilde poroplast ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Fleisher, 1981). Her iki çalışmada da poroplast ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstratlar için "ikincil" yağ (secondary oil) tanımı yapılmıştır. Çeşitli bitkisel materyallerde Suda çözünen/Dekante edilen fraksiyon oranlarını gösteren değerler Çizelge 2.1.'de verilmiştir:

Çizelge 2.1. Poroplast ekstraksiyon tekniği ile çalışılmış bitkiler ve Suda çözünen/Dekante edilen (S.Ç./D.E) fraksiyonların oranları

Bitki	S. Ç./D. E	Kaynak
<i>Ocimum gratissimum</i> L. (öjenol tipi)	1:1	Zukov ve ark., 1979
<i>Ocimum basilicum</i> L. (linalool /metil kavikol tipi)	1:3	Fleisher, 1981
<i>Ocimum basilicum</i> L. (linalool öjenol tipi)	1:1	Fleisher, 1981
<i>Pelargonium graveolens</i> Thunb.	1:3	Fleisher ve Fleisher, 1985
<i>Carum carvi</i> L.	1:3	Fleisher ve Fleisher, 1988
<i>Dictamnus gymnostylis</i> Stev.	1:2	Kozhin ve ark., 1972c
<i>Hyssopus cretaceus</i> Dub.	1:2	Kozhin ve ark., 1972c

Poroplast ekstraksiyon tekniği, hidrokarbon içermeyen *Citrus* uçucu yağlarının elde edilmesinde (deterpenation) kullanılabilmektedir (Moyler ve Stephens, 1992; Fleisher, 1994).

2.4.4. Katı faz ekstraksiyonu (KFE)

KFE, bileşiklerin iki faz arasında partisyona uğramalarından dolayı sıvı-sıvı ekstraksiyonuna benzer. Aynı zamanda bileşiklerin bir aparey içinde uygun bir adsorban materyale tutunmaları ve kontrol edilen bir süre içinde temas etmeleri nedeniyle de sıvı-katı ekstraksiyonuna benzemektedir. KFE’de ekstre edilecek bileşikler bir katı ve bir sıvı arasında partisyona uğrarlar. Bu bileşiklerin, numuneden çok katı faza yüksek afinite göstermeleri gerekir. Alıkonma veya elüsyonun farklı mekanizmalara sahip olmaları, bileşik, adsorbanın yüzeyindeki aktif yöreler ve sıvı faz veya numune arasındaki moleküller arasındaki etkileşimlerden kaynaklanır. Modern KFE’de adsorban, polipropilen kartuş içinde iki gözenekli disk arasına doldurulur. Sıvı fazlar bu kartuş içinden vakumla ya da pozitif basınçla (yerçekimi, bir enjektörden gaz basıncı ile ya da santrifüjle) geçirilir (Thurman ve Mills, 1998; Fritz ve Macka, 2000; Poole ve ark., 2000; Smith, 2003). Tüp şeklinden başka katı faz ekstraksiyonu için membran teknolojisi de kullanılabilmektedir. Membranlar veya diskler, 0.5 mm kalınlığa sahiptir. KFE kartuşlarından daha yüksek akış hızına olanak verir. Membranlar örnek hacminin yüksek ve bileşiklerin konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda tercih edilir (Thurman ve Mills, 1998).

KFE ile ekstraksiyon aşamaları şu şekilde verilebilir (Thurman ve Mills, 1998; Huck ve Bonn, 2000; Fritz ve Macka, 2000).

1. Sorbanın uygun bir çözücü geçirilerek aktive edilmesi.
2. Aktivasyon için kullanılan çözücünün uzaklaştırılması.
3. Örneğin uygulanması; bu şekilde bileşikler adsorban tarafından tutulur.
4. İstenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması
5. Bileşiklerin elüsyonu

KFE geleneksel çözücü ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında çok sayıda avantaja sahiptir. KFE basittir, ucuzdur ve göreceli olarak az miktarda çözücü kullanır. Bununla beraber katı ve örnekteki yağlı bileşikler KFE tüpünü tıkayabilir veya aşırı yükleme sonucunda sorbandaki gözeneklerin tıkanmasına yol açabilir.

KFE tekniği esas itibarı ile kaynama sıcaklıkları dezorpsiyon için kullanılan çözücünün sıcaklığından daha yüksek olan yarı uçucu bileşikler ile sınırlıdır.

KFE yönteminin amaçları şu şekilde sıralanabilir (Huck ve Bonn, 2000):

*İstenmeyen bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması.

*Örneğin ön konsantrasyonu.

*Kolon kromatografisinde olduğu gibi örneğin farklı bileşikler veya bileşik gruplarına fraksiyonlanması.

*Sıvı ortamda dayanıklı olmayan veya relatif olarak uçucu bileşiklerin saklanması.

*Bileşiklerin reaktif grupları ile adsorban yüzeyindeki bileşikler arasında türevlendirme reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi.

KFE tekniğinde ters faz, iyon değişimi, normal faz ve florlu faz gibi farklı özelliklere sahip fazların kullanılması mümkündür (Thurman ve Mills, 1998; Nilsson, 2000; Fritz ve Macka, 2000; Liška, 2000). Kimyasal olarak değişime uğratılmış (asetil, hidroksimetil, benzoil vb. türevli) polimer yapılı sorbanlar, örneklerin ön konsantrasyon işlemi için KFE yönteminde kullanım bulmaktadır (Bouvier ve ark., 1997; León-González ve Pérez-Arribas, 2000; Liška, 2000). KFE’de grafitleşmiş karbon yapılı adsorbanlar da kullanılabilir (Hennion, 2000; Liška, 2000). C₁₈ ters faz, sulu çözelti (idrar, serum, plazma ve diğer biyolojik sıvılardan) hidrofobik maddeleri izole etmek, peptitleri ve oligonükleotidleri çalışma öncesi saflaştırmak, şarap ve içeceklerdeki pigmentleri izole etmek ve GK/KS veya YBSK ile analiz için sudan pestisitleri ayırmak amacı ile kullanılır. Grafitleşmiş karbon ve ters-faz polimer yapılı adsorbanlar çevre uygulamalarında (ters-faz ile izole edilemeyen çözünür eser miktardaki maddeleri izole etmek için) kullanılır. Suda çok çözünen bileşikler daha hidrofobik ve daha büyük yüzey alanı sunan sorbanların kullanımını gerektirir. Karbon ve polimer yapılı sorbanlar C₁₈’in zayıf şekilde tuttuğu ilaçların ve farmasötik maddelerin polar metabolitleri için kullanılabilir. Silica ve Florisil gibi normal-faz adsorbanlar su içermeyen çözelti (idrar, serum, plazma ve diğer biyolojik sıvılardan) hidrofobik maddeleri izole etmek için kullanılır. Lipit sınıflandırma, bitki pigmenti ayırımı, yağda çözünür vitaminlerin lipit ekstraktlarından ayırımı gibi uygulamalarda kullanılabilirler. Alumina su

içermeyen çözeltilerden polar maddeleri uzaklaştırmak için kullanılır. Gıdalardaki vitaminler, antibiyotikler ve diğer gıda katkı maddeleri bunlar arasındadır. Katyon ve anyon değişimi, zayıf baz yapıda proteinleri, şarap ve meyve sularından asit yapıda pigmentleri, sudan organik asitleri ayırmakta kullanılır. Aminopropil, siyanopropil ve diol yapılı sorbanlar ters-faz ve normal-faz ayırımlarının her ikisi için de kullanılabilir (Thurman ve Mills, 1998; Liška, 2000; Smith, 2003).

Uçucu yağlar, karmaşık yapıya sahip oldukları ve farklı kimyasal gruplardan gelen bileşiklerden oluştukları için sıklıkla bir ön ayırımın yapılması gerekmektedir. KFE'nin bu güçlüğün üstesinden gelebildiği gösterilmiştir. *Artemisia dracunculus* ve *Rosa damascena*'dan elde edilen uçucu yağlar, KFE yöntemi ile hidrokarbonları içeren, esterleri, eterleri, oksitleri, karbonil bileşiklerini ve üçüncü derece alkollerini içeren ve alkoller, asitler ve diolleri içeren olmak üzere üç fraksiyona ayrılarak ön ayırma tabi tutulmuşlardır (Antonelli ve Fabbri, 1999).

Bundan başka, bitkilerden hazırlanan infüzyonların ters faz KFE (C_{18} KFE kartuşu kullanılarak) ile incelenemediği görülmektedir (Radulescu ve ark., 2004).

Katı veya viskoz sıvı örneklerin de (bir çoğu biyolojik kökenli) incelenmesi için klasik KFE tekniğinden farklı bir yöntem olan "Matrix Solid-Phase Dispersion" tekniği kullanılmaktadır. Burada örnek, doğrudan C_{18} bağlı-faz destek ile cam havan üzerinde birleştirilir. Karışım KFE için kullanılan kolona aktarılır ve KFE'ye benzer şekilde elüsyon gerçekleştirilir. Elüat GK, GK/KS veya YBSK'de analiz edilebilir (Barker, 1998; Barker, 2000).

2.4.5. Katı faz mikro ekstraksiyonu (KFME)

KFME (Solid Phase Microextraction, SPME), işlemi iki aşamada gerçekleşir: Analizi yapılacak maddelerin kaplama ve örnek arasında partisyona uğraması, ardından konsantre edilmiş ekstratların analitik bir cihaza dezorpsiyonu. İlk aşamada kaplanmış elyaf, örneğe veya örneğin tepe boşluğuna maruz bırakılır, böylece hedef maddeler örnek matriksinden kaplamaya doğru partisyona uğrar. Konsantre edilmiş analizi yapılacak maddeleri taşıyan elyaf, dezorpsiyon için bir

cihaza aktarılır, bu cihazda ekstrelerin ayrımı gerçekleştirilebilir ve miktar tayini yapılabilir.

KFME'nin sunduğu avantajlar şunlardır (Pawliszyn, 1997; Gürbüz, 1998; Smith, 2003):

*Hız: Örnek hazırlama süresini azaltır. Sadece 2-15 dakika içerisinde dengeye ulaşılır.

*Çözücü miktarının azaltılması: Çözücülerin kullanılması ve bunların kaybedilmesi en aza indirgenir.

*Ekonomiklik ve yeniden kullanılabilirlik: Silika lif, şartlara bağlı olarak 100 ekstraksiyondan fazlasını gerçekleştirebilir.

*Çok yönlülük: GK veya YBSK'ne adapte edilebilir. Splitli, splitsiz veya kolon enjeksiyonunda kullanılabilir.

*Zenginleştirmeye gerek yoktur.

Katı Faz Mikroekstraksiyon yönteminin diğer örnek hazırlama yöntemlerine göre avantajları Çizelge 2.2.'de verilmiştir (Gürbüz, 1998).

Çizelge 2.2. KFME yönteminin diğer yöntemlere göre avantajları

	Tespit Sınırı	Doğruluk (% Standart Sapma)	Maliyet	Süre (Dakika)	Çözücü	Basitlik
Purge & Trap	ppb	1-30	Yüksek	30	Yok	Hayır
Stripping	ppt	3-20	Yüksek	120	Yok	Hayır
Headspace	ppm	-	Düşük	30	Yok	Evet
Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon	ppt	5-50	Yüksek	60	1000 ml	Evet
Katı- Faz Ekstraksiyon	ppt	7-15	Orta	30	100 ml'ye kadar	Evet
KFME	ppt	<1-12	Düşük	5	Yok	Evet

KFME cihazı, 1 cm uzunluğunda dış yüzeyi bir sabit faz ile kaplanmış ve paslanmaz çelikten yapılmış bir pistonla bağlanmış durumda olan kaynaşmış (fused) silika elyaf ile modifiye edilmiş mikrolitre enjektöre benzeyen bir tutucu kısımdan oluşur. Kaynaşmış silika elyaf, elyaf tutucu üzerindeki pompayı kullanarak içi boş bir iğne içine çekilebilir. Cihazı kullanırken elyaf iğne içine çekilir, iğne örneğin bulunduğu küçük şişeyi kapatan septumu geçer ve pistonla basılır, elyaf örneğe veya örneğin headspace'ine doğru iner. Analizi yapılacak organik bileşikler elyafı kaplayan faza adsorbe olurlar. Adsorpsiyon dengesi 2-30 dakika içinde gerçekleşir. Örnek adsorpsiyonundan sonra kaynaşmış silika elyaf iğne içine çekilir, iğne örneğin bulunduğu küçük şişeden dışarı çekilir ve adsorbe olmuş analizlenecek maddelerin termal olarak desorbe edildikleri ve kapiler GK kolonuna verildikleri Gaz Kromatografisi enjektörüne sokulur. Analizi yapılacak bileşiklerin özelliklerine bağlı olarak elyaf üzerindeki faz tipini veya kalınlığını değiştirmek suretiyle seçicilik değiştirilebilir (Pawliszyn, 1997). Kaplanmış elyaf (fiber) ile doğrudan KFME (daldırma şeklinde), tepe boşluğu KFME (Zhang ve Pawliszyn, 1993) ve membran korumalı KFME (daldırma şeklinde) işlemleri gerçekleştirilebilir. Son işlemde membran, çok kirli örnekler analiz edileceği zaman tepe boşluğu KFME'nin kullanılmasında olduğu gibi, elyafı koruma görevini üstlenir. Membranla koruma, headspace uygulaması için fazlası ile düşük uçuculuğa sahip olan bileşiklerin analizinde avantaj sağlar. Ayrıca uygun bir materyalden yapılan membran, ekstraksiyon işlemine belirli bir derecede seçicilik özelliği verir (Eisert ve Pawliszyn, 1997; Lord ve Pawliszyn, 2000a). Elyaf üzerindeki kaplama maddesi, karıştırma işlemi, sıcaklık, tuz eklenmesi pH ayarı ve örnek hacmi gibi faktörler ekstraksiyon verimini etkiler (Pawliszyn, 1997; Eisert ve Pawliszyn, 1997; Prosen ve Zupančič-Kralj, 1999; Lord ve Pawliszyn, 2000a; Béné ve ark., 2001).

Desorpsiyon işlemi GK'de termal, YBSK'de ise çözücü desorpsiyonu şeklinde meydana gelir (Eisert ve Pawliszyn, 1997; Smith, 2003). Havanın, toprak örneklerindeki uçucu organik bileşiklerin, sıcak su ile ekstre edilmiş toprak örneklerindeki yarı uçucu bileşiklerin, pestisitlerin analizini (Lord ve Pawliszyn,

1998; Beltran ve ark., 2000; Fritz ve Macka, 2000) ve arazide gerçekleştirilecek analizlerin yapılabilmesini sağlayan bir tekniktir (Eisert ve Pawliszyn, 1997).

Bu teknik, gıda ve tat analizi (Yang ve Peppard, 1994; Steffen ve Pawliszyn, 1996; Clark ve Bunch, 1997; Gürbüz, 1998; Baptista ve ark., 1998; Ibáñez ve ark., 1998; Miller ve Stuart, 1999; Kataoka ve ark., 2000; Holt, 2001; Cai ve ark., 2001), çevre kirliliğine ilişkin çalışmalar (Bartak ve Cap, 1997; Koziel ve ark., 1999; Alpendurada, 2000; Namieśnik ve ark., 2000), biyolojik örnekler üzerine yapılan araştırmalar (Junting ve ark., 1998; Theodoridis ve ark., 2000; Snow, 2000; Mills ve Walker, 2000; Liu ve ark., 2000; Lord ve Pawliszyn, 2000b; Ulrich, 2000; Staerk ve Kulpmann, 2000), tıbbi ve aromatik bitkiler ve çiçeklerin analizi (Kubeczka ve Protzen, 1996; Krüger ve Zeiger, 1996; Kubeczka, 1996; Bicchi ve ark., 2000; Zabaras ve Wyllie, 2001; Kovačević ve Káč, 2001), ilaçların analizi ile ilgili çalışmalar (Lord ve Pawliszyn, 2000b), feromon analizi (Jones ve Oldham, 1999; Rochat ve ark., 2000) ve koku analizi (Mookherjee ve ark., 1998) gibi çok çeşitli alanlarda kullanılabilmektedir.

Tıbbi ve aromatik bitkilerin ve çiçeklerin “Tepe boşluğu-Gaz kromatografisi” analizi, KFME tekniğinden ayrı olarak ‘Gaz Faz Ekstraksiyon’ yöntemleri içinde SFE ile birlikte yer almaktadır. KFME ise KFE ile birlikte ‘Sorban Ekstraksiyonu’ yöntemlerini oluşturur. Tepe Boşluğu Analizi (Headspace Analysis, HSA), örnek olarak kullanılan maddenin üzerinde bulunan gaz fazındaki organik uçucu bileşiklerin belirlenmesi için uygulanan Gaz Kromatografisi’ne özgü bir örnek hazırlama yöntemidir. Üç değişik şekilde gerçekleştirilebilir (Bicchi ve Joulain, 1990; Pawliszyn, 1997):

1) Statik Tepe Boşluğu Analizi (Static Headspace Analysis, SHSA): Madde kapalı bir ortamda belirlenen bir sıcaklıkta buharı ile dengeye ulaştıktan sonra bileşik örneklenir. Bu yöntem denge sıcaklığı, zaman ve basıncın çok iyi kontrol edilmesini gerektirir.

2) Bu yöntemde üzerinde çalışılan materyalin ‘arasından’ geçirilen gaz akışındaki uçucu bileşiklerin, soğuk tuzak, katı adsorban, sıvı sabit fazla veya bileşiklere özgü bir reaktifle kaplı bir katı destek üzerine tuzakla yakalanması

sonucunda elde edilir. Tuzakla yakalanan uçucu bileşikler ısı veya bir çözücü ile elüe edilerek Gaz Kromatografisi'ne verilir.

3) Dinamik Tepe Boşluğu Analizi (Dynamic Headspace Analysis, DHSA): Bileşik, önceki yöntemle benzer şekilde materyalin 'üzerinden' geçirilen gaz akışından örneklenir.

Son iki yöntem 'Zenginleştirilmiş Tepe Boşluğu Analizi' (Enriched-HSA) olarak isimlendirilir.

2.4.6. Polimer yapıda reçineler (Amberlite XAD-4)

Sentetik adsorbanlar, hidrofobik adsorban özelliğine sahip organik polimer yapısında maddelerdir. Bu adsorbanlar biyoteknoloji ve doğal ürünlerin izolasyonu alanında laboratuvar ölçekten endüstriyel üretime kadar çeşitli ölçeklerde geniş ölçüde kullanılmaktadırlar. Günümüzde doğal ürünler, saflaştırma ajanları olarak sentetik adsorbanların kullanılmasıyla saflaştırılır.

Sentetik adsorbanlar küresel yapıdadırlar ve hidrofobik yüzeye sahip çok gözenekli materyallerdir. Bu maddeler hidrofobik organik bileşikler yüzeylerinde adsorplayabilirler. Bu seçicilik özelliği sayesinde fermentasyon ortamlarından organik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılabilirler. Hedef bileşiklerin kütle transferi göz önüne alındığında, sentetik adsorbanların görevi çözücü ekstraksiyonunun görevine benzemektedir. Bununla beraber sentetik adsorbanların kullanımı klasik çözücü ekstraksiyonuna göre birçok avantaja sahiptir.

Adsorban işlemleri için çok az miktarda organik çözücü gerekir. Bu çözücüler toksik ve patlayıcı olmaları sebebiyle ortamdan elimine edilmelidirler. Bundan başka adsorbanlar gözenek yapılarına bağlı olarak moleküler eleme işlevine de sahiptirler, bu şekilde işlem süresince molekül boyutuna göre fraksiyonlama da gerçekleşir. Adsorbanlar bir kolon içinde veya süspansiyon halinde kullanılabilirler. İşlenecek çok miktarda sıvı faz varsa ve hedef madde konsantrasyonu çok düşükse bir adsorbanın kolon içinde kullanılması etkili olabilir.

Sentetik adsorbanlar aktive edilmiş karbon ve zeolit gibi adsorbanlar (yani inorganik katılar) dan farklı olarak hafif adsorptivite gösterirler ve bu şekilde adsorplanan bileşikler kolayca elüe edilebilir.

Reçineler normal olarak su ile şişirilmiş halde kullanılırlar. Adsorban kısmi olarak kuruyacak olursa doğrudan su teması ile önceki şişme durumuna ulaşamaz. Öncelikle su ile karışabilen bir organik çözücü ile şişirilir, sonra çözücü saf su ile değiştirilir.

Hedef bileşik nötral ise küçük alkoller veya propanon gibi iyonize olmayan ve su ile karışabilen bir organik çözücü elüan olarak kullanılabilir. Bununla beraber iyonize olabilen bileşikler (yani suda çok çözünen bileşikler) için sulu tampon veya tampon/çözücü karışımı tercih edilir.

Kolonun yüklenmesi sabit bir akış hızında çözeltinin beslenmesinden oluşur. Besleme çözeltisinin hacmi, hedef bileşiğin miktarı kolonun adsorban kapasitesinden daha düşük olacak şekilde seçilir. Perkolat hedef bileşiğin kolondan sızmasını önlemek için sürekli gözlenmelidir.

Yüklemeden sonra kolon hala besleme çözeltisi ile doludur ve partiküller arasındaki boşluklarda kirletici maddeleri içerir. Bu nedenle kolon, elüsyondan önce su ile (veya pH'ı ayarlanmış su ile) yıkanmalıdır. Kalıntı besleme çözeltisi ile yer değiştirecek yıkama suyu sadece yeterli miktarda ilave edilmelidir (yatak hacminin yarısı veya hacmi kadar).

Elüsyon boyunca uygun bir elüan, hedef bileşiği kazanmak için kolon içinden geçirilir. Bu işlemi hızlandırmak için gradient elüsyon yararlı olabilir. Hedef bileşiğe benzer yapıda kirletici maddeler varsa elüsyon koşullarının mümkün olduğu kadar dikkatli seçilmesi gerekir.

Kolonun yeniden kullanılması için su ile yıkanması ve doğru pH'a yeniden ayarlanması gerekir. Birkaç kez kullanıldıktan sonra reçinenin eski adsorpsiyon kabiliyetini kazanabilmesi için başka işlemlerin uygulanması gerekebilir (Takayanagi ve ark., 1996).

Stiren ile divinilbenzen'in çapraz polimerleşmesi ile elde edilen bu gözenekli yapıya sahip polimerler, sudan, atık sulardan, tuzlu sudan ve sulu biyolojik örneklerden eser miktardaki organik bileşikleri uzaklaştırmak için

kullanılabilir. Adsorplanan örnek metanol, eter, aseton ve etil asetat gibi çeşitli organik çözücülerle elüsyonla kazanılabilir. 1 l'den daha az hacme sahip ve 1-100 l gibi yüksek hacimli örneklerle çalışma olanağı vardır (Poole ve Schuette, 1984). Sulu çözeltilerden fenollerin kazanılması (Vera-Avila ve ark., 1999; Ku ve Lee, 2000), suda kirliliğe yol açan kimyasal bileşiklerin adsorpsiyonla uzaklaştırılması, (Rossum ve Webb, 1978; Ryan ve Fritz, 1978); Tateda ve Fritz, 1978; Renberg, 1978; Aiken ve ark., 1979; Desmukh ve Pangarkar, 1984; Rexwinkel ve ark., 1999; Lepane, 1999) ve gıda ve fermentasyon ürünlerinden aroma bileşiklerinin kazanılması (Ericson ve ark., 1992; Krings ve ark., 1993; Souchon ve ark., 1996) üzerine yapılmış olan araştırmalar mevcuttur.

Suda çözünen uçucu yağ bileşiklerinin adsorpsiyon yöntemi ile kazanılmasına yönelik bir çalışmada fenil etil alkol, öjenol ve linalool'un distile suda çözeltileri hazırlanmış ve XAD-2, XAD-4 ve XAD-7 adsorbanları kullanılmıştır. XAD-4'ün çalışılan üç madde için relatif olarak diğer adsorbanlara göre daha verimli olduğu belirtilmiştir (Bohra ve ark., 1994).

Ocimum basilicum (Basil) ve *Mentha arvensis* bitkilerinin distilasyonu ile elde edilen kondensat sularından çözünmüş uçucu yağların kazanılması için yapılan bir çalışmada adsorban olarak XAD-4 kullanılmıştır. Uçucu yağın % 90'ından fazlası bu yöntemle kazanılmıştır (Machale ve ark., 1997).

Hardal uçucu yağının buhar distilasyonu kondensatında önemli miktarda bulunan allil izotiyosiyanat'ın (allyl isothiocyanate, AITC) kazanılması için adsorpsiyon-rejenerasyon tekniği kullanılmıştır. İşlem, Amberlite XAD-2, Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-7, NPA-1 ve NPA-2 polimer yapıda reçineleri ile gerçekleştirilmiştir. Amberlite XAD-4'ün en iyi sonucu verdiği belirtilmiştir (Jogdeo ve ark., 2000).

Pelargonium graveolens (Geranium)'den buhar distilasyonu ile elde edilen distilasyon kondensatında bulunan ve parfümeride kullanılan değerli bileşiklerin kazanılması için yapılan bir araştırmada geraniol, nerol, sitronellol, linalool, isomenton ve menton isimli bileşiklerden model çözelti hazırlanmış ve XAD-2, XAD-4 ve XAD-7 adsorbanları kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarından tek bir bileşiğin adsorpsiyonunun adsorbanın yüzey alanına bağlı olduğu, çok bileşiğin

olduğu durumlarda ise kompetitif adsorpsiyonun deney sonuçlarını etkilediği ortaya çıkmıştır (Amin ve ark., 2001).

2.4.7. Aktif karbon

Aktif karbon ile adsorpsiyon, karışabilen sıvıların ve sıvılarda çözünmüş maddelerin uzaklaştırılmasında kullanılan önemli bir prosestir. Genellikle bu tip materyalleri ayırırken, özellikle karışabilen sıvılar veya çözünmüş maddeler relatif olarak düşük konsantrasyonlarda ise en ekonomik yöntemdir. Adsorpsiyon, katı maddenin yüzeyindeki enerjinin, molekülleri veya iyonik yapıda maddeleri sıvıdan katıya çekmesi durumunda meydana gelir. Adsorplanan madde yüzeyde bir veya birkaç molekül derinliğinde bir tabaka oluşturur. Yüzeyin özellikleri ve yüzeydeki koşullar adsorpsiyonu kontrol eder. Aktif karbon yüksek bir dahili yüzey alanına sahiptir. İç kısımdaki gözenekler karmaşık bir ağ yapısı oluşturur. İdeal aktif karbon, maksimum miktarda adsorplanmış materyali tutabilmek için gözeneklerde yüksek hacimli geniş bir yüzey alanına sahip olmalıdır. Çok gözenekli bir yapıya sahip olduğu için aktif karbon, düşük masraflı birim ağırlığı veya hacmi başına çok yüksek bir yüzey alanı ve gözenek hacmi sağlar.

Genellikle molekül ağırlığı (boyut) arttıkça maddelerin adsorpsiyonu artar. Bu durum partiküllerin karbon gözeneklerine girebilecekleri büyüklüğü aşmalarına kadar devam eder. Adsorpsiyon çözünürlüğün azalması ile artış gösterir. Üç karbon atomundan daha fazlasını içeren moleküller, genellikle aşırı derecede çözünmedikçe adsorplanabilirler. Apolar bileşikler sudan, polar bileşiklere göre daha güçlü bir şekilde adsorplanırlar. Genellikle, çözeltinin pH'ı düştükçe adsorpsiyon artar. Adsorpsiyon, çözeltideki bileşikler izoelektrik noktalarına yakınlarsa ve yüklü partiküllerden daha nötral durumdalar ise daha verimlidir. Adsorpsiyon teorisine göre adsorpsiyon, sıcaklık artışı ile birlikte azalmalıdır. Bununla birlikte, viskozitenin azalması ve yüksek sıcaklıkta moleküllerin hareketlenmesi bileşiklerin karbon gözeneklerine kolayca girmesini sağlar. İnorganik bileşiklerin genel bir kural olarak adsorplanabilirlikleri düşüktür. Ancak molibdatlar, altın klorür, civa klorür, gümüş tuzları ve iyot gibi istisnalar

da vardır. Aktif karbonun tipi, adsorplanacak bileşiğin ne olacağını ve adsorpsiyon verimini etkiler. Çok sayıda küçük gözenekleri olan aktif karbon, çok sayıda büyük gözenekleri olana göre daha küçük molekülleri adsorplamaya meyillidir. Yüzey kimyasındaki farklılıklar da adsorpsiyonu etkiler. Bazı organik bileşikler tercihli olarak adsorplandıkları için başka organik bileşiklerin olması da adsorpsiyonu etkiler.

Aktif karbon ile adsorpsiyonun olanaklarından yararlanan ayırım şekilleri şu şekilde özetlenebilir:

*İçme sularından ve kimya ve gıda endüstrisinde işlenen sulardan renk, tat veya koku gibi kirliliklerin ayırımı.

*Şehir sularında veya endüstriyel atık sularda bulunan oksitlenebilen bileşikler, renk maddeleri, toksik maddelerin ve/veya metallerin ayırımı.

*Renk, tat veya kokuya sahip olmayan, fakat kristalleşme verimini azaltan ve kristallenmeyen düşük konsantrasyondaki ürünlerin ayırımı.

*Buharlaştırma, çalkalama gibi işlemler nedeni ile köpürmeye veya diğer istenmeyen yüzey aktif duruma neden olan maddelerin ayırımı.

*Duman veya bulanıklığa neden olan kirliliklerin ayırımı.

*Su ile karışabilen organik çözücülerden suyun ayırımı (veya tersi).

*Karışma özelliği olmayan az miktarda bir çözücü ile bir sıvıdaki safsızlıkları ekstre ettikten sonra, çözücü ve kirliliklerin karbon üzerine adsorpsiyonu ile ayırım. Doğrudan adsorpsiyonun başarılı olmadığı durumlarda yararlıdır.

* Az miktardaki iyonik yapıda metallerin, adsorplanabilen bir organik reaktif ile kompleks oluşturması ve kompleksin adsorplanması.

Kirliliklerin uzaklaştırılması ile ilgisi olmayan iki ayırım şekli daha vardır:

*Seyreltik çözeltideki değerli maddenin adsorpsiyon ve elüsyon ile konsantre hale getirilmesi.

*Katılar içinde dağılmış olan sıvıların ve katıların ayrılması (toprak örneklerindeki herbisit ve insektisitlerin ayırımı gibi).

Aktif karbon gaz-adsorban karbonlar ve sıvı-faz karbonlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Sıvı-faz aktif karbonlar toz halde ya da granül şeklinde olur (Stenzel, 1993; Hutchins, R. A., 1997).

Farklı alanlarda aktif karbonla yapılan birçok çalışma mevcuttur. Seyreltik sulu sistemlerin analizi (Jennings ve Nursten, 1967), koku ve aroma kimyasallarının kazanılması ve analizi (Carson ve Wong, 1961; Tang ve Jennings, 1967; Clark ve Cronin, 1975; Edris ve ark., 2003), fenollerin granüle halde aktif karbonla adsorpsiyonu (Wang ve ark., 1997), doğal ve atık suların saflaştırılması (Tarasevich, 2001; Abe ve ark., 2001) bunlara örnek olarak gösterilebilir.

2.4.8. Dondurarak yoğunlaştırma (Freeze Concentration)

Dondurarak konsantre etme işlemi, sulu ve seyreltik alkollü örneklerle (örneğin meyve sularına) uygulanabilir. Yöntem, çözeltiyi dondurmak ve suyu bir parmak soğutucu ile veya santrifüj yöntemi ile buz kristalleri halinde fiziksel olarak ayırmaya dayanmaktadır. Dondurma işlemi süresince karışımı sürekli bir şekilde karıştırmak gerekir. İşlemin sonunda buz ve izole edilecek bileşikler bakımından zengin bir sıvı elde edilir. Bu yöntemle başlangıçtaki sıvı numune 10-20 defa daha konsantre hale gelmiş olur (Muller, 1967; Weurman, 1969; Heath, 1981).

Bu yöntem aslında çok eski bir yöntemdir. Prehistorik Kelt'lerin fermente edilmiş elma suyunu kış mevsiminde dondurarak alkollü içki hazırladıkları ifade edilmektedir. Bu şekilde su, buz şeklinde ayrılıyor ve sıvıdaki etanolün konsantrasyonu iki veya üç kez daha yüksek hale geliyordu (Weurman, 1969).

Meyve sularının konsantre hale getirilmesinde sıklıkla kullanılan bu yöntem iki temel adımdan oluşur: Buz kristallendirme ve konsantre fazından buzun ayrılması. İlk adımda meyve suyu donma noktasının altında süper-soğutma işlemine tabi tutulur. Böylece su, buz kristalleri halinde ayrılır. İkinci adımda buz kristalleri konsantre durumdaki meyve sularından ayrılır (Ramteke ve ark., 1993).

Tekniğin ilk yıllarında karıştırma işlemi araştırmacıların üstesinden gelmek istedikleri bir güçlüktü. Bu çalışmalarda seyreltik sulu çözeltilerin

üzerinde çeşitli soğutma ve karıştırma işlemleri denenmiştir (Kobayashi ve Lee, 1964; Smith ve Tasker, 1965; Shapiro, 1967; Kepner ve ark., 1969).

2.5. *Origanum* Türlerinin Sistematik ve Botanik Özellikleri

Origanum cinsi bir İran-Turan elementi olup Anadolu'nun doğusundaki bölgeden dünyaya yayılmıştır. Daha önceki bilgilere göre bu cinse ait bilinen tür sayısı 39'dur. Bu türler 10 seksiyonda toplanmıştır. Türkiye florasında (Davis, 1982) bu 10 seksiyondan 8'ine ait 21 tür ve toplam 25 takson bulunur. Bunlardan 14'ü endemiktir (Tümen ve ark., 1995; Başer, 2002).

Yakın zamanda bulunmuş olan *Origanum husnucan-baseri* H. Duman, Z. Aytaç, A. Duran ile ülkemizdeki tür sayısı 22'ye, takson sayısı ise 26'ya ulaşmıştır (Duman ve ark., 1995). Yeni bulunan bir *Origanum* türü olan *Origanum husnucan-baseri*, Breviflamentum seksiyonuna dahil ve Akdeniz elementi olan endemik bir türdür. C4: Antalya yöresinde Alanya yaylasından toplanmıştır (Duman ve ark., 1995). Böylece Türkiye'deki endemik takson sayısı 15'e yükselmiştir.

Ayrıca *O. bargyli* Mouterde x *O. laevigatum* Boiss. (*O. x adanense* Başer & H. Duman in Turk. J. Bot. 22:55, f. 3, 1988), hibrit tür olarak Türkiye Florası'nın 11. cildinde yerini almıştır (Güner ve ark., 2000).

Origanum cinsine ait türler, esas olarak Akdeniz bölgesinde yer alırlar. Türlerin çoğu, tüm türlerin % 75'ine yakını, özellikle Doğu Akdeniz alt bölgesinde bulunmaktadır. İrtifa açısından bakıldığında birçok türün *Origanum* ismini hakettiği görülmektedir. Bu isim Yunanca'dan gelmektedir. "Oros" dağ veya tepe, "ganos" ise süs anlamına gelir. Bu iki kelime birleştirildiğinde "Dağın Süsü" anlamı ortaya çıkar. Türlerin pek çoğu yüksek kesimlerde ve dağlık alanlarda, (0)-400-1800-(4000) m yükseklikte bulunur. En çok 1200-1500 m yükseklikte yetişmektedirler. *Origanum* türlerinin hemen tümü taşlık, yokuş ve kayalık alanlarda, uçurumlarda yetişir (Ietswaart, 1980; Tümen ve ark., 1995).

Dünya üzerinde ekonomik önem taşıyan kekik türleri, Yunan kekiği (İstanbul kekiği) (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* L. (Boiss.) Hayek), Türk kekiği

(*Origanum onites* L.), İspanyol kekiği (*Coridothymus capitatus* (L.)) ve Meksika kekiği (*Lippia graveolens* HBK)'dır (Lawrence ve Reynolds, 1984).

Türkiye'de "Kekik" kelimesi, karvakrol kokusuna sahip olan bitkiler için kullanılır. Uçucu yağlarında yüksek miktarda karvakrol içermektedir. Labiatae familyasına dahil olan *Origanum* , *Thymus* , *Thymbra* , *Satureja* ve *Coridothymus capitatus* kekik adı ile bilinen bitkilerdir (Başer, 1995; Baytop, 1995).

Thymus'lar "dağ kekiği" olarak bilinmekte, yöresel olarak halk tarafından toplanıp kullanılmakta ancak ticarete girmemektedir. Timol, medikal koku olarak bilinmekte ve timol kokulu olan türler baharat olarak rağbet görmemektedir.

Dünya üzerinde yetişmekte olan *Origanum* türleri aşağıda verilmiştir (Ietswaart, 1980; Davis, 1982; Tümen ve ark., 1995; Başer, 2002):

1. Seksiyon: *Amaracus* (Gleditsch) Benth

Origanum boissieri Ietswaart^x {E}

Origanum calcaratum Juss.^{x+}

Origanum cordifolium (Montbret et Aucher ex Benth)

Origanum dictamnus L.

Origanum saccatum Davis^x {E}

Origanum solymicum Davis^x {E}

Origanum symes A. Carlström^{x+}

2. Seksiyon: *Anatolicon* Benth

Origanum akhdarensense Ietswaart et Bolulos

Origanum cyrenaicum Beguinot et Vaccari

Origanum hypericifolium Schwarz et Davis^x {E}

Origanum libanoticum Boiss.

Origanum scabrum Boiss. et Heldr.

Origanum sipyleum L.^x {E}

Origanum vetteri Briq. et Barbey

3. Seksiyon: *Brevifilamentum* Ietswaart

Origanum acutidens (Hand.-Mazz.) Ietswaart^x {E}

Origanum bargyli Mouterde^x

Origanum brevidens (Bornmüller) Dinsmore^x {E}

Origanum haussknechtii Boiss.^x {E}

Origanum leptocladum Boiss.^x {E}

Origanum rotundifolium Boiss.^x

Origanum munzureense Kit Tan & Sorger^x {E}

Origanum husnucan-baseri H. Duman, Z. Aytaç, A. Duran^x {E}

4. Seksiyon: Longitubus Ietswaart

Origanum amanum Post^x {E}

5. Seksiyon: Chilocalyx (Briquet) Ietswaart

Origanum bilgeri Davis^x {E}

Origanum michrantum Vogel^x {E}

Origanum microphyllum (Benth.) Vogel

Origanum minutiflorum Schwarz et Davis^x {E}

6. Seksiyon: Majorana (Miller) Bentham

Origanum majorana L.^x

Origanum onites L.^x

Origanum syriacum L.

a) var. *syriacum*

b) var. *bevanii* (Holmes) Ietswaart^x

c) var. *sinaicum* (Boiss.) Ietswaart

7. Seksiyon: Campanulaticalyx Ietswaart

Origanum dayi Post

Origanum isthmicum Danin

Origanum ramonense Danin

8. Seksiyon: Elongatispicata Ietswaart

Origanum elongatum (Bonnet) Emberger et Maire

Origanum floribundum Munby

Origanum grosii Pau et Font Quer ex Ietswaart

9. Seksiyon: *Origanum*

Origanum vulgare L.^x

a) ssp. *vulgare*^x

b) ssp. *glandulosum* (Desfontaines) Ietswaart

c) ssp. *gracile* (Koch) Ietswaart^x

d) ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart^x

e) ssp. *virens* (Hoffmannsegg et Link) Ietswaart

f) ssp. *viride* (Boiss.) Hayek^x

10. Seksiyon: *Prolaticorolla* Ietswaart

Origanum compactum Benth.

Origanum ehrenbergii Boiss

Origanum laevigatum Boiss.^x

Hibritler

Origanum amanum x *dictamnus*

Origanum bargyli Mouterde x *Origanum laevigatum* Boiss.

Origanum calcaratum x *dictamnus*

Origanum michranthum x *vulgare* ssp. *hirtum*

Origanum sipyleum x *vulgare* ssp. *hirtum*

Origanum vulgare ssp. *vulgare* x *Thymus* türleri

Origanum x *adonis* Mouterde

Origanum x *applii* (Domin) Boros

Origanum x *barbarae* Bornm.

Origanum x *dolichosiphon* Davis (*O. amanum* Post x *O. laevigatum* Boiss.) {E}

Origanum x *hybridinum* Miller

Origanum x *intercedens* Rechinger

Origanum x *intermedium* Davis (*O. sipyleum* L. x *O. onites* L.) {E}

Origanum x *lirium* Heldr. ex Halacsy

Origanum x *majoricum* Cambessedes

Origanum x *minoanum* Davis

Origanum x pabotii Mouterde

Origanum x symeonis Mouterde (*O. syriacum* L. x *O. laevigatum* Boiss.) {E}

Origanum x vulgare L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart x *O. micranthum* Vogel {E}

Origanum x adanense Baser et Duman (*O. laevigatum* Boiss. x *O. bargyli* Mouterde) {E}

Ek olarak belirtilen tür

Origanum pampaninii (Brullo et Fumari) Ietswaart

{E} Türkiye'nin endemik *Origanum* türleri

+ Sadece Ege Adaları'nda yetişen *Origanum* türleri

* Türkiye Florası'nda kayıtlı *Origanum* türleri

2.5.1. *Origanum* L. cinsinin botanik özellikleri

Yarı çalimsı veya otsu çok yıllık, tüylü veya tüysüz (genellikle mavimsi yeşil). Gövdeler birkaç tane, yükselici veya dik, genellikle dallanmış. Yaprak subsesil veya $\pm$ petiolat, eliptik, ovat, kordat veya suborbikular, tam veya $\pm$ dişli, uç kısım obtus veya akuminat. Vertisiller 2-birkaç-çiçekli, infloresens $\pm$ yoğun başak şeklinde olup panikul ya da yalancı korimbus şeklinde düzenlenmiş. Brakte her zaman şekil ve boyut bakımından yapraklardan farklı. Genellikle imbrikat, 1/2-3 x kaliks kadar uzunlukta, ya zarımsı ve kısmen mor ya da sarımsı yeşil veya doku ve renk bakımından yapraklara benzer. Çiçekler hermafrodit veya ginodioik. Kaliks değişken, $\pm$ aktinomorf ve 5-dişli, veya zigomorf ve 1-2 dudaklı, 13 veya yaklaşık 10- damarlı; boğaz kısmı genellikle halka şeklinde tüylü. Korolla mor, pembe veya beyaz, $\pm$ eşit 2-dudaklı, tüp bazen torba şeklinde ya da yassılaştırmış; üst dudak emarginat veya kısa şekilde iki loplu; alt dudak 3-loplu. Stamenler 4, alt çift daha uzun, korolla dışında veya $\pm$ içinde, üst dudak altında yükselici düz veya ayrılmış; filamentler $\pm$ eşit değil; teka ayrılmış. Meyvalar küçük, ovoid, kahverengi (Davis, 1982).

2.5.2. *Origanum onites* L.'in botanik özellikleri

Origanum onites L. Syn. *Origanum smyrnaeum* L.; *O. pallidum* Desf.; *Majorana smyrnaea* (L.) Kostel; *M. onites* (L.) Benth; *M. onites* (L.) Benth var. *columnaris* Rech.

65 cm'e kadar yükseklikte hemen hemen çalimsı bitkiler, hirsut. Dallar her gövdede 10 çift kadar, 13 cm kadar uzunlukta. Yaprak saplıdan hemen hemen sapsız kadar (asplar 6 mm'e kadar), kordat, ovat veya eliptik, 3-22 x 2-19 mm, $\pm$ akut veya akuminat, seyrek olarak serrat veya tam, damarlar $\pm$ alt yüzeyde hemen hemen belirgin. Korimbiform çiçek durumundaki spiküller yaklaşık olarak 3-17 x 4 mm. Brakte obovat veya eliptik, 2-5 x 1.5-4 mm, obtus-akuminat, tam veya dişli. Kaliks 2-3 mm. Korolla beyaz, 3-7 mm. Kayalıklı tepeler ve yamaçlar, genellikle kireçtaşı üzerinde, bazen gölgelikli yerlerde, deniz seviyesi-1400 m (Davis, 1982).

O. onites geniş bir dağılım alanına sahiptir. Yunanistan'ın güneyinde, Girit ve diğer birçok Yunan adasında ve Türkiye'nin güneyi ile batısında bulunur. Genellikle yüksek irtifada açık kayalıklı alanlarda, deniz seviyesinden 1400 m yükseklikte, sıklıkla kireçtaşları üzerinde yetişir. Nisan' dan Ağustos'a dek çiçek açar (Ietswaart, 1980).

2.6. Kekik İhracatı ile İlgili Değerler

Kekik, defne ve adaçayı ülkemizde ihracat, uçucu yağ üretimi ve evde baharat olarak kullanım amacı ile toplanan en önemli üç aromatik bitkidir. Önceleri "Kekik" ismi *Thymus vulgaris* için kullanılmaktaydı. Ancak *Thymus vulgaris* ülkemizde yetişmemektedir. Ayrıca uçucu yağı timol bakımından zengindir. Ancak özellikle kekik adı ile ticareti yapılan *Origanum* türleri ve aynı isimle anılan diğer cinslere ait örnekler karvakrol bakımından zengindir. İhraç edilen, yağ verimi ve karvakrol miktarı yüksek olan beş *Origanum* türü bulunmaktadır: *O. majorana* L. (Beyaz, Alanya beyazı, (Mercanköşk), Anamur beyazı), *O. minutiflorum* (endemik) (Yayla, Çingilli kekik, Toka kekik, Sütçüler

kekiği), *O. onites* L. (syn: *O. smyrneum*) (Bilyalı, İzmir kekiği, Peynir kekiği), *O. syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Iestwaart (Tarsus, Tarsus beyazı), *O. vulgare* L. subsp *hirtum* (Link) Iestwaart (syn: *O. heracleum*) (İstanbul, Karakekik, Çorba kekiği, Çanakkale). Ayrıca daha az miktarda *Thymbra spicata* (Kara kekik), *Satureja spicigera* (Trabzon kekiği) ve *Coridothymus capitatus* (Başlı kekik) toplanmaktadır (Başer, 1994; Başer, 1995; Tümen ve ark., 1995; Baytop, 1995).

Kekik, ticari açıdan toz kekik (baharat), uçucu yağ ve kekik suyu şeklinde değerlendirilmektedir. Kekik ve kekik yağı ihracat değerleri sırası ile Çizelge 2.3. ve 2.4.'te verilmiştir (Kırimer ve ark. 2003).

Çizelge 2.3. Kekik ihracat bilgileri (Kg, tutarı ve birim fiyatı-USD sırasıyla)

GTİP No.	1997	1998	1999	2000	2001	2002
09104011	268.332	83.171	91.711	212.540	123.998	144.230
Yaban Kekigi- Thymus serpyllum- ezilmemiş	679.573 2.53	163.754 1.96	146.096 1.59	377.991 1.77	161.052 1.30	228.79 1.59
09104013	2.493.872	2.6262.744	3.555.682	1.832.839	1.976.980	2.313.570
Ezilmemiş- öğütülmemiş	4.158.268 1.66	5.067.649 1.92	6.524.338 1.83	3.451.979 0.64	3.331.796 1.68	3.339.287 1.44
09104019	3.276.236	4.341.053	3.996.736	5.342.511	6.557.425	5.797.747
Ezilmiş- öğütülmüş	8.399.531 2.56	10.260.706 2.36	9.886.040 2.47	11.536.380 2.15	12.259.315 1.87	9.751.920 1.68
Ortalama birim fiyat USD	2.19	2.19	2.16	2.07	1.81	1.57
TOPLAM	6.038.440 13.237.372	7.050.968 15.492.109	7.644.129 16.556.474	7.387.890 15.366.350	8.658.403 15.752.165	8.255.547 13.114.086

GTİP: Gümrük Tarife İstatistik Pozisyonu

Çizelge 2.4.Kekik yağı ihracat değerleri (Kg, tutarı ve birim fiyatı-USD sırasıyla)

GTİP No.	1998	1999	2000	2001	2002
15 15 90 40 0014 000	6.340	8.652	12.691	13.897	10.563
Ham,Teknik, Sın.	462.365	568.485	725.053	699.358	561.293
	72.92	65.70	57.13	50.32	53.14
15 15 90 59 0014 000	300	2.900	-	-	-
Ham, diğer şekil	21.607	193.707			
	72.02	66.79			
15 15 90 99 0014 000	4.050	2.300	2.905	2.560	1.267
Diğer şekilde Amb.	290.938	158.894	170.243	122.708	69.069
	71.83	69.08	58.60	47.93	54.51
15 15 90 91 0014 000	50	-	-	-	-
Diğer, Ambalajlı	4.007				
	80.14				
Ortalama birim fiyat	75.52	66.49	57.40	49.95	53.83
TOPLAM	10.740	13.852	15.596	16.457	11.830
	778.917	921.086	895.296	822.066	630.362
33 01 29 61 9011 000	2.120	197	-	75	5.669
Diğer uçucu yağlar, Kekik yağından elde edilenler, terpeni alınmamış (ANTALYA)	145.002	14.045		5.461	404.656
	68.39	71.29		72.81	71.38
					-
33 01 29 61 9011 000	1. 500	5.350	7.105	8.335	
(İSTANBUL)					
TOPLAM	14.260	19.499	22.701	24.862	17.499

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu bölümde, çalışmalarda kullanılan bitkisel materyal, cihazlar, kimyasal maddeler ve yöntemler hakkında bilgi verilmektedir.

3.1. Kullanılan Bitkisel Materyal, Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Bitkisel materyal

Çalışmalarda Türer Tarım (İzmir)'dan 2001 yılı içinde temin edilmiş olan ticari kekik (*Origanum onites* L.) kullanılmıştır.

Bitkisel materyal, kuru ve temiz bir zemine yayılarak iyice harmanlanmış, bu şekilde çalışma materyali elde edilmiştir.

3.1.2. Cihazlar

Su Buharı Distilasyonu Cihazı (Pilot ölçekli, 30 l)

Clevenger Apareyi (Avrupa Farmakopesi)

Volumetrik Su Miktar Tayini Cihazı (Avrupa Farmakopesi)

Sudan Hafif ve Ağır Çözücülerle Ekstraksiyon için Normag Ekstraktörler (ALDRICH)

Supelclean LC-8 SPE tüpü (6 ml, 0.5 g)

Yüksek Hacimli Örnekleyici (Visiprep™+Large Volume Sampler, Supelco)

SPE Vakum Manifoldu (Supelco)

Vakum Pompası (BÜCHIVAC, V-500 Rotavapor Pompası)

Flash Kromatografisi Kolonu ve Sistemi

Gaz Kromatografisi (GK) (Shimadzu GC-9A) ve Entegratör (C-R4A)

Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi (GK/KS) (Shimadzu GC/MS-QP 5050 A)

3.1.3. Kimyasal maddeler

Amberlite XAD-4 (Lot 60K0022 SIGMA, 37380-42-0)

3.2. Deneysel Çalışma

Bu bölümde *Origanum onites* L. bitkisel materyali üzerinde yapılan distilasyon çalışmaları ve pilot ölçekte yapılan buhar distilasyonundan elde edilen yağ altı suyunun çeşitli yöntemlerle ekstraksiyonu açıklanmıştır. Elde edilen yağ ve ekstraktların GK ve GK/KS analizleri yapılmıştır.

3.2.1. Distilasyon çalışmaları

3.2.1.1. Su distilasyonu

Bitkisel materyalden su distilasyonu ile uçucu yağ elde etmek ve miktar tayini yapmak için Clevenger tipi aparat kullanılmıştır.

50 g civarında tam tartılmış bitkisel materyal 2 l hacmindeki balona aktarılmıştır. Üzerine 10 katı hacimde distile su ilave edilerek Clevenger aparatında 3 saat süreyle distile edilmiştir.

3.2.1.2. Su buharı distilasyonu

Buhar distilasyonu çalışmalarında paslanmaz çelikten imal edilmiş, 30 l kapasiteli, serpantin tipi kondenserli bir kazan kullanılmıştır. Isı kayıplarını minimuma indirmek için kazanın dış kısmı yalıtılmıştır.

Kekik bitkisinin öğütülmüş herbası belirli miktarda tartıldıktan sonra kazanın içinde bulunan delikli tepsinin üzerine aktarılmıştır. Bitkisel materyal, distilasyon esnasında meydana gelebilecek kanallaşmaları önlemek için kazanın içine homojen bir şekilde yerleştirilmiştir.

Kapağın kenar kısımlarından buhar kaçağının oluşması izolasyon ile önlendikten sonra, kapak kapatılmıştır. Kazanın dip kısmında bulunan ve üzerine eşit buhar dağılımını sağlayacak şekilde delikler açılmış olan buhar halkası ile sisteme su buharı gönderilmiştir. Kondenserden yağ ve su gelmeye başladıktan sonra hacimsel debi mezür ile ölçülmüş ve buhar hızı buhar vanası vasıtasıyla manüel olarak ayarlanmıştır.

Kondensattaki uçucu yağ miktarı suya göre çok az olduğundan, kondensatın debisi sisteme gönderilen buhara eşit kabul edilebilir.

3 saatlik sürenin sonunda uçucu yağı alınan Kekik herbası delikli tepsi ile birlikte kazandan çıkarılarak atılmıştır. Kazanın dibinde biriken kondens suyu ise alttaki vana açılarak boşaltılmıştır. Sistemi temizlemek için kazanın ve kondenserin içinden buhar geçirilmiştir.

3.2.2. Su miktarının tayini

Uçucu yağ verimini kuru baz üzerinden hesaplamak amacı ile Avrupa Farmakopesi'nde verilmiş olan Volumetrik Yöntemle Su Miktar Tayini yöntemi kullanıldı (European Pharmacopoeia, 2002).

500 ml'lik kuru balon içine 200 ml toluen (Merck) ve 2 ml su R aktarılarak 2 saat distile edilmiştir. 30 dakika soğumaya bırakıldıktan sonra, 0.05 ml yaklaşımla su hacmi okunmuştur. 2-3 ml su vermesi gereken ve % 1 doğrulukla tartılan belirli miktarda kekik balona aktarılmıştır. Balon 15 dakika hafifçe ısıtılmış, toluen kaynamaya başlayınca, suyun büyük kısmı distilleninceye kadar saniyede iki damla olacak şekilde hızı ayarlanmıştır. Bundan sonra distilasyon hızı saniyede dört damla olacak şekilde arttırılmıştır. Suyun tümü distillendiğinde kondanser tüpünün içi toluen ile yıkanmıştır. Distilasyona 5 dakika daha devam edilmiş ve ısıtıcı kapatılmıştır. Geri kazanım tüpünün oda sıcaklığına gelmesine ve tüpün cidarlarında yapışmış halde su damlacıklarının kalmamasına dikkat edilmiştir. Su ve toluen tamamen ayrıldığı zaman su hacmi okunmuş ve aşağıda verilmiş olan formül kullanılarak % su miktarı hesaplanmıştır.

$$\% \text{ su miktarı} = 100.(n_2 - n_1)/m$$

m: Bitkisel materyalin gram kütlesi

n_1 : İlk distilasyonda elde edilen suyun ml cinsinden hacmi

n_2 : İki distilasyon sonucunda elde edilen suyun ml cinsinden toplam hacmi

3.2.3. Ekstraksiyon teknikleri

3.2.3.1. Ayırma hunisi

250, 500 ve 1000 ml hacminde ayırma hunileri kullanılmıştır.

3.2.3.2. Soxhlet ekstraksiyonu

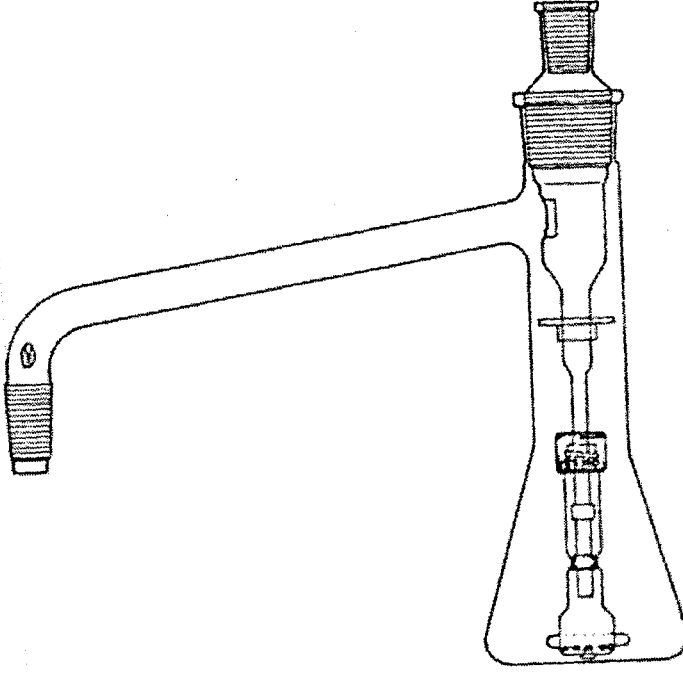
250 ml hacminde Soxhlet ekstraktör ve 500 ml hacminde dibi yuvarlak balon kullanılmıştır.

3.2.3.3. Normag ekstraktörleri

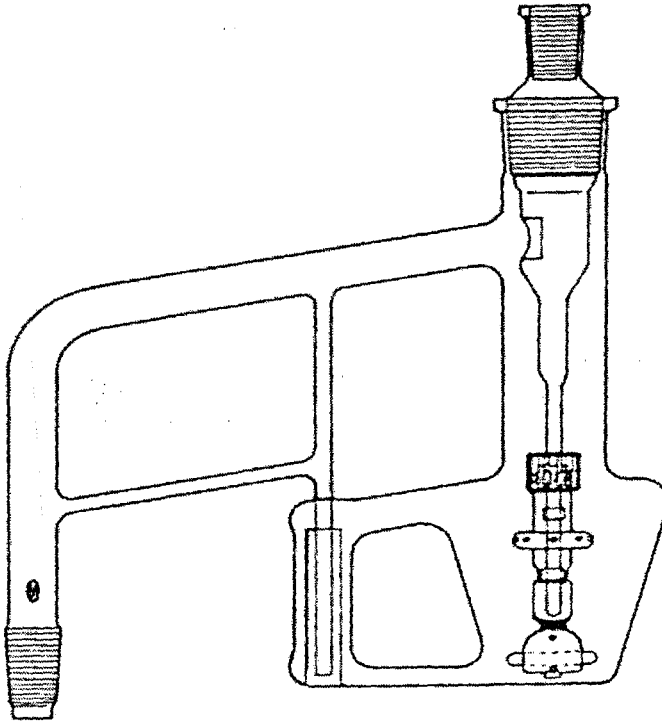
Sudan hafif ve ağır apolar organik çözücüler ile kullanmak üzere farklı dizayn edilmiş iki ekstraktör kullanılmıştır. Ekstraktörlerin şekilleri Şekil 3.1. ve 3.2.'de verilmiştir.

3.2.3.4. Katı faz ekstraksiyonu

Kekik suyunda çözünmüş maddeleri izole etmek için Supelclean LC-8 (KFE tüpü, 6 ml, 0.5 g) Katı Faz Ekstraksiyon tüpleri kullanılmıştır. Kekik suyunu şartlandırılmış KFE tüpüne aktarmak için Yüksek Hacimli Örnekleyici (Visiprep™+Large Volume Sampler, Supelco) kullanılmıştır. Akışın hızlı ve düzenli olarak sağlanması için SPE Vakum Manifoldu'ndan yararlanılmıştır.



Şekil 3.1.Sudan hafif çözücüler için Normag ekstraktörü



Şekil 3.2.Sudan ağır çözücüler için Normag ekstraktörü

3.2.3.5. Amberlite XAD-4 reçine ile ekstraksiyon

Noniyonik polimer yapıda adsorban kullanılmıştır. Reçinenin yüzey alanı 725 m²/g ve ortalama gözenek çapı 40 Å'dur. Islak Mesh boyutu 20-60'dır.

3.2.4. Gaz kromatografisi (GK)

Kekik yağı ve kekik suyundan elde edilmiş olan ekstrater gaz kromatografisine uygulanarak tutunma sürelerine göre ayrılmış ve relatif oranlara göre değerlendirilmiştir. Gaz Kromatografisi analiz koşulları aşağıda verilmiştir:

Cihaz: Shimadzu GC-9A

Kolon: Thermon 600-T (Kaynaşmış (fused) Silica Kapiler Kolon, 50 m x 0.2 mm ϕ)

Taşıyıcı Gaz: Azot

Dedektör: FID

Enjeksiyon Sıcaklığı: 250 °C

Dedektör Sıcaklığı: 250 °C

Split Oranı: 60:1

Isı Programı: 70 °C-10'// 2 °C/dak// 180 °C-30'

Entegratör Yazıcı: C-R4A

3.2.5. Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GK/KS)

Kekiğin su ve su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağları ile farklı ekstraksiyon yöntemleri ile yağ altı suyundan elde edilen ekstrater gaz kromatografisi kolonunda ayrılıp iyonlaştırıldıktan sonra her birinin tek tek spektrumları alınmıştır.

Değerlendirme işlemleri "BAŞER Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi" kullanılarak yapılmıştır. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi analiz koşulları aşağıda verilmiştir:

Cihaz: Shimadzu GC/MS-QP 5050 A sistemi

Kolon: CP Sil 5B (25 mm x 0.25 mm *i.d.*, film kalınlığı 0.4 µm) kapiler kolon

Taşıyıcı gaz: Helyum

Enjeksiyon sıcaklığı: 250 °C

Split oranı: 50:1

Isı programı: 60 °C // 5 °C/dakika // 260 °C-20 dakika

Elektron enerjisi: 70 eV

Kütle aralığı: 35-400 m/z

3.2.6. Flaş kromatografisi (FK)

Flaş Kromatografisi'nde ayrımı yapılacak numunenin miktarına göre boyutları farklı kolonlar kullanılmaktadır. Bu kolonların alt kısmında cam filtre bulunur. Perkolasyon amaçlı ve uç kısmı şilifli olan kolonlar adaptör yardımı ile şilifli bir erlen üzerine yerleştirilebilir.

Adsorban olarak kullanılan silikajel kolona kuru halde doldurulmuştur. Kolon flaş kromatografisi sistemine yerleştirildikten sonra adsorbanı doyurmak için kolona üstten yavaş yavaş çözücü ilave edilmiştir. Bir süre bekledikten sonra alttan (adaptörlü sistem kurulursa adaptörden) vakum uygulanmıştır (Vakum etkisi ile çözücü hızlı bir şekilde kolonu terk eder). Altan alınan çözücü hacmi ile üstten verilen çözücü hacmi arasında fark kalmayınca dek bu işleme devam edilmiştir. Bu şekilde adsorbanın tümüyle çözücü ile doyurulması sağlanmıştır.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon ile elde edilen kloroform ekstresi, 1:2 oranında adsorbana emdirildikten sonra kolonun üst kısmına her tarafında eşit olacak şekilde yayılmıştır. Üstten her seferinde eşit hacimde çözücü ilave edilip alttan vakum uygulanmıştır. Elüatın gelişi kesilinceye dek sisteme vakum uygulanmıştır. Elde edilen bütün fraksiyonların çözücüleri rotavapor yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Bu fraksiyonlar, İTK'ya uygulanarak incelenmiş ve benzer olduğu görülen fraksiyonlar birleştirilmiştir.

3.2.7. İnce tabaka kromatografisi (İTK)

Alınan fraksiyonları kontrol etmek amacıyla 0.25 mm kalınlıkta adsorban ile kaplanmış ve boyutları 20x20 cm olan cam ve alüminyum hazır plaklar kullanılmıştır. Plaklar 1 saat süreyle 100 °C'ye getirilmiş etüvde aktive edilmiştir. Sürüklemeye işlemine geçmeden önce cam kromatografi tankının içine süzgeç kağıdı yerleştirilmiş, bu şekilde tankın çözücü sistemi buharı ile doyması sağlanmıştır. Sürüklemeye işlemi bittikten sonra tanktan çıkarılan İTK plakları oda sıcaklığında kurutulmuştur. Plak üzerinde oluşan lekeler önce UV lamba altında (254 nm ve 365 nm) incelenerek işaretlenmiştir. Plakların üzerine Vanilin-Sülfürik asit reaktifi püskürttükten sonra 100-110 °C'de ısıtılarak lekelerin renkli hale gelmesi sağlanmıştır.

İTK çalışmalarında Çizelge 3.1.'de verilen çözücüler ve çözücü sistemleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. İTK için kullanılan çözücü sistemleri

Sistem	Çözücü Karışımı	Çözücü Oranı
I	Toluen:Etil asetat	93:7
II	Hekzan:Etil asetat	40:25
III	Hekzan:Etil asetat	50:50
IV	Hekzan:Etil asetat	30:70

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Nem Miktarı

Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen yönteme göre 25 g *Origanum onites* L. bitkisinin nem miktarı volumetrik olarak %9 bulunmuştur.

4.2. Kekik Uçucu Yağının Farklı Yöntemlerle Elde Edilmesi ve Distilattan Yağ İzolasyonu

4.2.1. Su distilasyonu

Laboratuvar ölçekte su distilasyonu için 50.2 g kekik 1000 ml su ile birlikte Clevenger apereyinin balonuna aktarılmıştır. 3 saat süren distilasyon işleminin sonunda 1.15 ml uçucu yağ elde edilmiştir (Yağ verimi % 2.3). Uçucu yağın kuru baz üzerinden verimi % 2.5'tir. Uçucu yağın GK analiz sonuçları  izelge 4.1.'de gösterilmiştir.

4.2.2. Su buharı distilasyonu

1500 g bitkisel materyal buhar distilasyonu kazanına yüklendikten sonra. 1:1 kg/ saat olacak şekilde buhar verilmiştir. Separatör olarak ayırma hunisi kullanılmıştır. 3 saatlik distilasyon işleminin sonucunda 25 ml uçucu yağ (Yağ verimi % 1.7) ve 4610 ml kekik suyu elde edilmiştir. Uçucu yağın kuru baz üzerinden verimi % 1.8'dir. Uçucu yağın GK analiz sonuçları  izelge 4.1.'de gösterilmiştir.

4.2.3. Distilattan yağ izolasyonu

Kekik suyu elde edildikten hemen sonra 1000 ml numune alınarak Clevenger apereyinin 2 l lik balonuna aktarılmıştır. Balonun içine birkaç tane

kaynama taşı atıldıktan sonra, 3 saat boyunca distile edilmiştir ve 1.1 ml yağ elde edilmiştir. Uçucu yağın GK analiz sonuçları Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Kekik yağı GK analiz sonuçları

Bileşik	Kekik yağı		
	Buhar Distilasyonu	Clevenger (Bitki)	Clevenger (Kekik Suyu)*
mirsen	0.5	0.5	-
α -terpinen	0.6	0.6	-
γ -terpinen	2.3	2.4	0.1
p-simen	2.4	2.7	0.1
linalool	14.98	13.9	6.2
β -karyofillen	1.1	1.0	0.1
terpinen-4-ol	0.7	1.0	0.7
borneol	1.1	1.0	0.8
β -bisabolen	1.5	1.2	0.1
karyofillen oksit	0.5	0.4	0.05
cis-p-ment-4-en-1,2-diol	0.4	0.2	0.1
timol	3.7	3.5	4.02
karvakrol	64.8	66.7	82.3

*Buhar distilasyonu ile elde edilen Kekik Suyu, Clevenger apareyine aktarıldıktan sonra distilasyonla yağ altı suyundaki uçucu yağ alınmıştır.

Clevenger apareyinde distilasyon işleminden sonra balonda kalan sudan 250 ml alınarak 500 ml lik ayırma hunisine aktarılmıştır. Üzerine 125 ml lik kısımlar halinde 4 defa kloroform (distile edilmiş) ilave edilerek sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen kloroform fazları susuz sodyum sülfat (Merck)'tan süzülerek armudi balona aktarılmış ve çözücü rotavapor balonu kullanılarak 40 °C'de uzaklaştırılmıştır. Balonda kalan

ekstre az miktarda kloroform (Merck) ile alınarak küçük kahverengi şişeye aktarılmıştır. N₂ gazı ile kloroform uzaklaştırıldıktan sonra şişenin tartımı alınmıştır. Uçucu yağın ve kloroform ekstresinin GK analiz sonuçları Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrenin miktarı: 0.05 g (% 0.02)

Çizelge 4.2. Clevenger apareyinde kalan suyun kloroform ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu

Bileşikler	Uçucu Yağ	Kloroform Ekstresi
mirsen	0.5	-
α -terpinen	0.6	-
γ -terpinen	2.3	-
p-simen	2.4	-
linalool	14.98	-
β -karyofillen	1.1	0.1
terpinen-4-ol	0.7	0.6
borneol	1.1	0.3
β -bisabolen	1.5	-
3,7-dimetil-1,5-oktadien-3,7-diol	-	3.4
karyofillen oksit	0.5	0.9
t-p-ment-3-en-1,2-diol	-	1.7
3,7-dimetil-1,7-oktadien-3,6-diol	-	4.4
cis-p-ment-4-en-1,2-diol	0.4	51.8
cis-p-ment-3-en-1,2-diol	-	2.5
timol	3.7	0.9
karvakrol	64.8	11.8

4.2.4. Kekik suyunun organik çözücülerle sıvı-sıvı ekstraksiyonu

4.2.4.1. Ayırma hunisi ile ekstraksiyon

Bir gün boyunca beklemiş olan kekik suyundan 1000 ml numune alınarak 2 l lik ayırma hunisine aktarılmıştır. Bu şekilde bir saat boyunca dinlendirilmiş olan distilanın altından su fazı yavaşça alınmıştır. 250 ml numune ayrılarak 500 ml lik ayırma hunisine aktarılmış ve üzerine 125 ml lik kısımlar halinde 4 defa *n*-hekzan (distile edilmiş) ilave edilerek sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen *n*-hekzan fazları susuz sodyum sülfattan süzülerek armudi balona aktarılmış ve rotavapor balonu kullanılarak çözücü 40 °C de uzaklaştırılmıştır. Balonda kalan ekstre az miktarda *n*-hekzan (Merck) ile alınarak küçük kahverengi şişeye aktarılmıştır. N₂ gazı ile *n*-hekzan uzaklaştırıldıktan sonra şişenin tartımı alınmıştır.

n-Hekzan ile ekstraksiyondan sonra ayırma hunisinde kalan su fazı üzerine 125 ml lik kısımlar halinde 4 defa kloroform (distile edilmiş) ilave edilerek sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Geri kalan süzme ve yoğunlaştırma işlemleri yukarıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

n-Hekzan ile ekstraksiyondan 0.2 g (% 0.08), kloroform ile ekstraksiyondan 0.03 g (% 0.01) ekstre elde edilmiştir. Uçucu yağ, hekzan ve kloroform ekstrelerinin GK analiz sonuçları Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Uçucu yağ, *n*-hekzan ve kloroform ekstrelerinin analiz sonuçları

Bileşikler	Uçucu Yağ	<i>n</i> -Hekzan Ekstresi	Kloroform Ekstresi
mirsen	0.5	-	-
α -terpinen	0.6	-	-
γ -terpinen	2.3	0.05	-
p-simen	2.4	0.05	-
linalool	14.98	5.95	-

Çizelge 4.3. (Devam) Uçucu yağ, *n*-hekzan ve kloroform ekstrelerinin analiz sonuçları

Bileşikler	Uçucu Yağ	<i>n</i> -Hekzan Ekstresi	Kloroform Ekstresi
β -karyofillen	1.1	-	0.1
terpinen-4-ol	0.7	0.7	0.5
borneol	1.1	0.6	0.4
β -bisabolen	1.5	0.05	-
3,7-dimetil-1,5-oktadien-3,7-diol	-	0.04	12.3
karyofillen oksit	0.5	0.06	0.8
t-p-ment-3-en-1,2-diol	-	-	-
3,7-dimetil-1,7-oktadien-3,6-diol	-	0.07	9.2
cis-p-ment-4-en-1,2-diol	0.4	1.5	51.0
cis-p-ment-3-en-1,2-diol	-	0.3	7.7
timol	3.7	4.04	0.5
karvakrol	64.8	83.3	0.4

4.2.4.2. TSE Monografına göre yapılan Soxhlet ekstraksiyonu

Gül suyunun özellik, muayene ve deneyler kısmında ele alınan uçucu yağ tayini model alınarak kekik suyunda yağ miktarının belirlenmesi için Soxhlet cihazı kullanılmıştır. Yöntem ana hatları ile esas alınmış, ancak son aşamada çözücünün ekstreten uzaklaştırılması ve tartımların alınması konusunda daha önce yapılmış olan uygulamalar yerine getirilmiştir. Çözücüyü uzaklaştırmak için sadece azot gazı kullanılmıştır.

2 l'lik ayırma hunisine alınmış ve 1 saat dinlendirilmiş kekik suyu kullanıldı.

Sıcaklığı 20 °C'a getirilmiş olan 100 ml kekik suyu numunesi 0.1 mg hassasiyetle tartıldı ve Soxhlet cihazının dibi yuvarlak balonuna aktarıldı. Üzerine

300 ml metilen klorür (distile edilmiş) ilave edildi. Düzenli bir kaynama sağlamak üzere birkaç tane kaynama taşı ilave edildi. Cihazın ekstraksiyon başlığı ve soğutucusu balona monte edildi. Su banyosu 30 °C'a ayarlandı ve sıcaklık yavaş yavaş arttırıldı. 60 °C'de 6 saat süre ekstrakte edildi. 6 saat sonunda balonda biriken su ve metilen klorür karışımı, 500 ml lik ayırma hunisine aktarıldı. Balon iki defa 20 ml metilen klorür ile yıkandı. Yıkama çözeltileri de ayırma hunisine aktarıldı. Fazlar net bir şekilde ayrılana kadar bir süre beklendi. Metilen klorür fazı (alttaki faz) susuz sodyum sülfat ile doldurulmuş bir süzgeç kağıdından süzülerek uygun hacimli bir rotavapor balonuna aktarıldı. Susuz sodyum sülfatlı süzgeç kağıdı 2 defa 5 ml metilen klorürle yıkandı. Metilen klorür rotavapor cihazı kullanılarak 40 °C'de uzaklaştırıldı.

10 ml lik şişelere az miktarda metilen klorür (Merck) ile alınan ekstrelerin çözücüsü azot gazı ile uzaklaştırıldı. Ekstre (uçucu yağ) miktarı kütlece yüzde olarak hesaplandı.

Soxhlet cihazı ile uçucu yağ miktar tayini için kullanılan kekik suyundan 100 ml alındı ve 500 ml lik ayırma hunisine aktarıldı. Üzerine 100 ml lik kısımlar halinde 3 defa metilen klorür (distile edilmiş) ilave edilerek sıvı-sıvı ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen çözücü fazları susuz sodyum sülfattan süzülerek armudi balona aktarıldı ve rotavapor kullanılarak 40 °C de çözücüler uzaklaştırıldı. Diğer işlemler Soxhlet cihazı ile ekstraksiyonda olduğu şekilde gerçekleştirildi.

Soxhlet cihazı ile ekstraksiyon ve ayırma hunisinde sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucunda 0.1 g (% 0.1) ekstre elde edilmiştir. Her iki ekstrenin GK analiz sonuçları Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Soxhlet apareyi ve ayırma hunisinde ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin GK analiz sonuçları

Bileşikler	Uçucu Yağ	Soxhlet	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon
mirsen	0.5	-	-
α -terpinen	0.6	-	-

Çizelge 4.4. (Devam) Soxhlet apareyi ve ayırma hunisinde ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin GK analiz sonuçları

Bileşikler	Uçucu Yağ	Soxhlet	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon
γ -terpinen	2.3	-	-
p-simen	2.4	-	-
linalool	14.98	5.0	4.9
β -karyofillen	1.1	-	-
terpinen-4-ol	0.7	0.6	0.6
borneol	1.1	0.6	0.6
β -bisabolen	1.5	-	0.04
3,7-dimetil-1,5-oktadien-3,7-diol	-	1.0	1.3
karyofillen oksit	0.5	0.1	0.1
t-p-ment-3-en-1,2-diol	-	0.06	0.05
3,7-dimetil-1,7-oktadien-3,6-diol	-	0.8	0.9
cis-p-ment-4-en-1,2-diol	0.4	5.8	6.4
cis-p-ment-3-en-1,2-diol	-	0.8	0.9
timol	3.7	3.6	3.7
karvakrol	64.8	74.6	75.8

4.2.4.3. Süzölmüş kekik suyunun çözücülerle sıvı-sıvı ekstraksiyonu

4.2.4.4. Ayırma hunisi ile ekstraksiyon

Kekik Suyu, 2 l lik ayırma hunisine aktarıldı ve 1 saat dinlendirildi. Önce ıslatılmış pamuktan sonra da pilelenmiş ve ıslatılmış siyah bant filtre kağıdından süzöldü. Pamuktan ve filtre kağıdından süzerken ilk 10 ml lik kısım atıldı. Elde edilen süzüntüden 250 ml alınarak 500 ml lik ayırma hunisine aktarıldı. Önce *n*-hekzan (distile edilmiş) ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyondan kalan

4.2.4.5. Süzülmüş kekik suyunun Soxhlet apareyi ile ekstraksiyonu

Aynı şekilde dinlendirilmiş ve süzülmüş kekik suyu numunesinde Soxhlet cihazı ve ayırma hunisi kullanılarak uçucu yağ miktar tayini yapıldı. Çözücü olarak metilen klorür (distile edilmiş) kullanıldı. Deneyler, süzülmemiş ancak bekletilmiş kekik suyunda yapıldığı şekilde uygulandı.

Soxhlet cihazı ile ekstraksiyon sonucunda ve ayırma hunisinde sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucunda 0.1 g (% 0.1) ekstre elde edilmiştir.

Her iki ekstrenin GK analiz sonuçları Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Süzülmüş kekik suyunun metilen klorür ile Soxhlet apareyi ve ayırma hunisinde ekstraksiyonu

Bileşikler	Uçucu Yağ	Soxhlet	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon
kamfen	-	-	-
mirsen	0.5	-	-
α -terpinen	0.6	-	-
γ -terpinen	2.3	-	-
p-simen	2.4	-	-
linalool	14.98	5.2	5.2
β -karyofillen	1.1	-	-
terpinen-4-ol	0.7	0.6	0.6
borneol	1.1	0.6	0.6
β -bisabolen	1.5	-	-
3,7-dimetil-1,5-oktadien-3,7-diol	-	1.1	1.3
karyofillen oksit	0.5	0.2	0.1
t-p-ment-3-en-1,2-diol	-	0.07	0.05
3,7-dimetil-1,7-oktadien-3,6-diol	-	0.8	1.0

Çizelge 4.6. (Devam) Süzölmüş kekik suyunun metilen klorür ile soxhlet apareyi ve ayırma hunisinde ekstraksiyonu

Bileşikler	Uçucu Yağ	Soxhlet	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon
cis-p-ment-4-en-1,2-diol	0.4	5.9	6.1
cis-p-ment-3-en-1,2-diol	-	0.8	0.8
timol	3.7	3.8	3.7
karvakrol	64.8	77.0	72.5

4.2.4.6. Normag ekstraktör kullanılarak gerçekleştirilen sıvı-sıvı ekstraksiyon çalışmaları

1500 g bitkisel materyal buhar distilasyonu kazanına yüklendi. 1:1 kg/ saat olacak şekilde buhar verildi. Separatör olarak ayırma hunisi kullanıldı. 24.5 ml uçucu yağ (Yağ verimi % 1.6) ve 4550 ml kekik suyu elde edildi . Uçucu yağın kuru baz üzerinden verimi % 1.8'dir. Uçucu yağın GK analiz sonuçları Çizelge 4.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Buhar distilasyonu ile elde edilen kekik yağının GK analiz sonuçları

Bileşik	Kekik Yağı
α -pinen	0.5
kamfen	0.2
mirsen	0.8
α -fellandren	
α -terpinen	0.7
γ -terpinen	2.9
p-simen	3.2
terpinolen	0.1
linalool	16.4

Çizelge 4.7. (Devam) Buhar distilasyonu ile elde edilen kekik yağının GK analiz sonuçları

Bileşik	Kekik Yağı
β -karyofilen	1.1
terpinen-4-ol	0.8
borneol	1.2
β -bisabolen	1.6
karyofilen oksit	0.4
<i>cis</i> -p-ment-4-en-1,2-diol	0.3
<i>cis</i> -p-ment-3-en-1,2-diol	0.3
timol	3.6
karvakrol	62.3

4.2.4.7. Sudan hafif apolar organik çözücü ile ekstraksiyon

Kekik suyu dinlendirildikten ve ayırma hunisine alınıp yağ fazı ile su fazının tam olarak ayrılması sağlandıktan sonra 500 ml numune alındı. Sudan hafif çözücülerle ekstraksiyon için kullanılan ekstraktörün numune haznesine aktarıldı. Ekstraktörün iç kısmında yer alan çözücüyü dağıtan parça, ana parçanın içine yerleştirildi. Bu parçanın üst kısmına soğutucu bağlandı. Ekstraktörün diğer ucuna 500 ml hekzan (distile edilmiş) içeren ve içine kaynama taşı atılmış balon bağlandı. Ekstraktörün ana parçasının altına manyetik karıştırıcı yerleştirildi. Balon, 80 °C'ye getirilmiş su banyosuna daldırıldı. Çözücü kaynamaya ve soğutucuda yoğunlaşarak kekik suyunun içine akmaya başladıktan sonra manyetik karıştırıcı 8. kademedeki çalıştırıldı. Kekik suyunun ve hekzanın hacimlerini ve su banyosunun sıcaklığını sabit tutarak 1.5, 3 ve 6 saat olmak üzere üç ayrı sürede ekstraksiyon işlemi yapıldı.

Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen ekstreler susuz sodyum sülfat (Merck)'tan süzülerek armudi balona aktarıldı ve rotavapor balonu kullanılarak 40 °C de uzaklaştırıldı. Balonda kalan ekstre az miktarda çözücü ile

alınarak küçük kahverengi şişeye aktarıldı. N₂ gazı ile çözücü uzaklaştırıldı ve şişenin tartımı alındı.

250 ml kekik suyu, 500 ml hacmindeki ayırma hunisinde 500 ml (125 mlx4) hekzan (distile edilmiş) ile ekstre edildi. Ekstraktör ve ayırma hunisiyle yapılan ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstratların verimleri ve işlemler sırasında bileşimlerde meydana gelen değişiklikler belirlendi.

Ekstrelerin GK analiz sonuçları Çizelge 4.8.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Hekzan kullanılarak Normag ekstraktör ile kekik suyunun ekstraksiyonu

Bileşik	Normag			Ayırma Hunisi
	1.5 saat	3 saat	6 saat	
linalool	6.1	6.2	5.7	5.7
cis-p-ment-4-en-1,2-diol	1.4	0.8	5.2	1.7
timol	4.1	4.1	3.8	4.01
karvakrol	84.03	84.2	79.2	83.9

4.2.4.8. Sudan ağır apolar organik çözücü ile ekstraksiyon

Kekik suyu dinlendirildikten ve ayırma hunisine alınıp yağ fazı ile su fazının tam olarak ayrılması sağlandıktan sonra 750 ml numune alındı. Sudan hafif çözücülerle ekstraksiyon için kullanılan ekstraktörün numune haznesine 100 ml kloroform (distile edilmiş) aktarıldı. Üzerine kekik suyu (750 ml) ilave edildi. Ekstraktörün iç kısmında yer alan çözücüye dağıtan parça, ana parçanın içine yerleştirildi. Bu parçanın üst kısmına soğutucu bağlandı. Ekstraktörün diğer ucuna 650 ml kloroform (distile edilmiş) içeren ve içine kaynama taşı atılmış balon bağlandı. Ekstraktörün ana parçasının altına manyetik karıştırıcı yerleştirildi. Balon, 80 °C'ye getirilmiş su banyosuna daldırıldı. Çözücü kaynamaya ve soğutucuda yoğunlaşarak kekik suyunun içine akmaya başladıktan sonra manyetik karıştırıcı 7. kademedeki çalıştırıldı. Kekik suyunun ve kloroformun hacimlerini ve su banyosunun sıcaklığını sabit tutarak 1.5, 3 ve 6 saat olmak üzere üç ayrı sürede ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi.

250 ml kekik suyu, 500 ml hacmindeki ayırma hunisinde 500 ml (125 mlx4) kloroform (distile edilmiş) ile ekstre edildi.

Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen ekstreler susuz sodyum sülfat (Merck)'tan süzülerek armudi balona aktarıldı ve rotavapor balonu kullanılarak 40 °C de uzaklaştırıldı. Balonda kalan ekstre az miktarda çözücü ile alınarak küçük kahverengi şişeye aktarıldı. N₂ gazı ile çözücü uzaklaştırıldı ve şişenin tartımı alındı.

Ekstrelerin GK analiz sonuçları Çizelge 4.9.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Kloroform kullanılarak Normag ekstraktör ile kekik suyunun ekstraksiyonu

Bileşik	Normag			Ayırma Hunisi
	1.5 saat	3 saat	6 saat	
linalool	3.1	7.8	4.3	4.4
metil karvakrol	-	2.1	1.2	-
cis-p-ment-4-en-1,2-diol	9.1	2.9	7.9	7.4
timol	3.3	3.8	3.5	3.5
karvakrol	75.8	74.8	75.6	74.6

Ekstraktör ve ayırma hunisiyle yapılan ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin verimleri ve işlemler sırasında bileşimlerde meydana gelen değişiklikler belirlendi.

Elde edilen ekstrelerin miktarları Çizelge 4.10.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı sürelerde sudan hafif ve ağır apolar organik çözücü ile Normag ekstraktör ve ayırma hunisinde ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin miktarları (g)

Ekstraktör	Süre	Hekzan	Kloroform
Normag	1.5 saat	0.47	0.80
	3 saat	0.45	0.90
	6 saat	0.51	0.82
Ayırma Hunisi	-	0.22	0.34

Elde edilen ekstrelerin yüzde verimleri Çizelge 4.11.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı sürelerde sudan hafif ve ağır apolar organik çözücü ile Normag ekstraktör ve ayırma hunisinde ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin yüzdeleri (%)

Ekstraktör	Süre	Hekzan	Kloroform
Normag	1.5 saat	0.094	0.106
	3 saat	0.090	0.118
	6 saat	0.102	0.109
Ayırma Hunisi	-	0.089	0.134

4.2.4.9. Farklı polaritelerde çözücüler ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon çalışmaları

1500 g bitkisel materyal buhar distilasyonu kazanına yüklendikten sonra. 1:1 kg/ saat olacak şekilde buhar verilmiştir. Separatör olarak ayırma hunisi kullanılmıştır. 3 saatlik distilasyon işleminin sonucunda 24.8 ml uçucu yağ (Yağ verimi % 1.65) ve 4540 ml kekik suyu elde edilmiştir. Uçucu yağın kuru baz üzerinden verimi % 1.8'dir. Uçucu yağın GK analiz sonuçları Çizelge 4.12.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Buhar distilasyonu ile elde edilen kekik yağının GK analiz sonuçları

Bileşik	Kekik Yağı
α -pinen	0.4
kamfen	0.2
mirsen	0.8
α -fellandren	
α -terpinen	0.7
limonen	0.1

Çizelge 4.12. (Devam) Buhar distilasyonu ile elde edilen kekik yağının GK analiz sonuçları

Bileşik	Kekik Yağı
β -fellandren	0.2
γ -terpinen	2.9
p-simen	3.3
terpinolen	0.2
linalool	16.2
β -karyofilen	1.2
terpinen-4-ol	0.8
borneol	1.2
β -bisabolen	1.5
karyofilen oksit	0.3
spatulenol	0.1
cis-p-ment-4-en-1,2-diol	0.3
cis-p-ment-3-en-1,2-diol	0.3
timol	3.6
karvakrol	62.3

Buhar distilasyonu ile elde edilen Kekik Suyu, farklı polaritelerde çözücüler kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon yapıldı. Her çözücü için Kekik Suyu: Çözücü oranı 1:2, 1:1 ve 5:1 olacak şekilde seçildi (Guenther, 1948; Gallori ve ark., 2001). Kekik Suyu süzülmedi, ancak ayırma hunisinde dinlendirildikten sonra alttaki su fazı alınarak çalışma materyali olarak kullanıldı. 250 ml su fazı ayrılarak 500 ml lik ayırma hunisine aktarıldı. Üzerine kısımlar halinde çözücü ilave edilerek sıvı-sıvı ekstraksiyon yapıldı.

Çözücüler 1:2 oranı için 125x4, 1:1 oranı için 100+100+50 ve 5:1 oranı için 20+20+10 olacak şekilde kısımlar halinde kullanıldılar. Kullanılan çözücülerin oranları ve çözücülerin ekstraksiyon için belirlenen miktarları Çizelge 4.13.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. Sıvı-sıvı ekstraksiyon için kullanılan çözücülerin oranları

Çözücü	Çözücülerin Miktarları (ml)		
Hekzan	125x4	100+100+50	20+20+10
Kloroform (Hekzan Ekstraksiyonundan kalan su)	125x4	100+100+50	20+20+10
Dietil eter	125x4	100+100+50	20+20+10
Etil asetat	125x4	100+100+50	20+20+10
Kloroform	125x4	100+100+50	20+20+10
Kekik Suyu :Çözücü Oranlar	1:2	1:1	5:1

Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen ekstreler susuz sodyum sülfat (Merck)'tan süzülerek armudi balona aktarıldı ve rotavapor balonu kullanılarak 40 °C de uzaklaştırıldı. Balonda kalan ekstre az miktarda çözücü ile alınarak küçük kahverengi şişeye aktarıldı. N₂ gazı ile çözücü uzaklaştırıldı ve şişenin tartımı alındı.

Ekstrelerin miktarları Çizelge 4.14.'da, yüzde verimleri ise Çizelge 4.15.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı polaritede çözücülerle ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin miktarları (g) ve Kekik Suyu:Çözücü oranları

Çözücü	Ekstrelerin Miktarları (g)		
Hekzan	0.208	0.208	0.201
Kloroform (Hekzan ekstraksiyonundan kalan su)	0.0570	0.0595	0.0581
Dietil eter	0.240	0.247	0.208
Etil asetat	0.291	0.294	0.259
Kloroform	0.269	0.269	0.251
Kekik Suyu:Çözücü Oranı	1:2	1:1	5:1

Çizelge 4.15. Farklı polaritede çözücülerle ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin verimleri ve Kekik Suyu:Çözücü oranları

Çözücü	Ekstre Verimleri (%)		
Hekzan	0.08	0.08	0.08
Kloroform (Hekzan ekstraksiyonundan kalan su)	0.02	0.02	0.02
Dietil eter	0.10	0.10	0.08
Etil asetat	0.12	0.12	0.10
Kloroform	0.11	0.11	0.10
Kekik Suyu:Çözücü Oranı	1:2	1:1	5:1

Farklı polariteye sahip organik çözücülerle yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon neticesinde elde edilen ekstrelerin GK analiz sonuçları Çizelge 4.16.'da verilmiştir.

Çizelge 4.16. Farklı polaritede çözücülerle ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin GK analiz sonuçları

Bileşik	Kekik Suyu:Çözücü Oranları									
	1:2					1:1				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
linalool	4.7	-	3.6	5.1	5.3	5.0	-	4.1	5.0	5.2
karyofillen oksit	-	8.9	-	1.2	1.3	-	6.9	-	1.1	1.0
cis-p-ment-4-en-1,2-diol	2.2	59.6	10.8	7.8	1.1	1.2	62.8	10.1	7.5	8.5
timol	3.6	0.5	3.3	3.6	3.5	3.8	0.4	3.3	3.4	3.5
karvakrol	82.7	1.8	70.9	72.0	70.1	83.8	0.7	73.1	70.2	73.2

I: Hekzan

II: Kekik Suyunun Hekzan İle Ekstraksiyonundan Kalan Suyun Kloroform İle Ekstraksiyonu

III: Dietileter

IV: Etil asetat

V: Kloroform

Çizelge 4.16. (Devam) Farklı polaritede çözücülerle ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin analiz sonuçları

Bileşik	Kekik Suyu:Çözücü Oranı				
	5:1				
	I	II	III	IV	V
linalool	5.4	-	4.8	5.8	5.6
karyofillen oksit	-	2.9	-	0.4	0.4
cis-p-ment-4-en-1,2-diol	0.5	50.4	4.4	5.0	6.1
timol	3.8	1.1	3.6	3.7	3.6
karvakrol	85.5	14.4	81.1	77.4	77.1

4.2.5. Katı faz ekstraksiyon tekniği ve Amberlite XAD-4 reçine kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları

1500 g bitkisel materyal buhar distilasyonu kazanına yüklendi. 1:1 kg/ saat olacak şekilde buhar verildi. Separatör olarak ayırma hunisi kullanıldı. 24 ml uçucu yağ (Yağ verimi % 1.6) ve 4540 ml kekik suyu elde edildi . Uçucu yağın kuru baz üzerinden verimi % 1.8'dir. Uçucu yağın GK analiz sonuçları Çizelge 4.17.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. Buhar distilasyonu ile elde edilen kekik yağının GK analiz sonuçları

Bileşik	Kekik Yağı
α -pinen	0.3
kamfen	0.1
mirsen	0.5
α -fellandren	0.1
α -terpinen	0.6
γ -terpinen	2.4
p-simen	2.7

Çizelge 4.17. (Devam) Buhar distilasyonu ile elde edilen kekik yağının GK analiz sonuçları

Bileşik	Kekik Yağı
terpinolen	0.1
linalool	15.7
β -karyofilen	1.1
terpinen-4-ol	0.8
borneol	1.2
β -bisabolen	1.4
karyofilen oksit	0.4
spatulenol	0.2
<i>cis</i> -p-ment-4-en-1,2-diol	0.3
<i>cis</i> -p-ment-3-en-1,2-diol	0.3
timol	3.7
karvakrol	63.8

4.2.5.1. Katı faz ekstraksiyon tekniği ile kekik suyunun ekstraksiyonu

Katı Faz ekstraksiyon tekniği için Supelclean LC-8 KFE tüpü (6 ml, 0.5 g) kullanıldı. Kekik Suyu süzülmedi, ancak dinlendirildikten sonra alttaki su fazı alınarak kullanıldı. 250 ml Kekik Suyu, 300 ml hacminde erlene alındı. KFE tüpü, Vakum Manifoldu üzerine yerleştirildi. Vakum, -15 mmHg'ye ayarlandı. Damla damla olacak şekilde 6 ml etanol ve ardından 6ml distile su geçirilerek şartlandırıldı. 2 dakika daha vakum geçirilerek tüpün içindeki etanol ve su tamamen uzaklaştırıldı. Yağ altı suyu, Yüksek Hacimli Örnekleyici (Visiprep™+Large Volume Sampler, Supelco) kullanılarak, vakum yardımıyla KFE tüpü (önceden etanol ile şartlandırılmış)'nın içine aktarıldı. Su fazı, tüpün alt kısmından damla damla alınacak şekilde geçirildi. Tüpün içindeki adsorban tabakanın hemen fritin altına gelen kısmı kahverengi, geri kalan büyük bölümü ise

sarı renk aldı. Bulanık bir görünüme sahip olan Kekik Suyu ile karşılaştırıldığında, tüpün altında toplanan su fazının berrak olduğu görüldü.

Tüpün içinden 5x2 ml etanol (distile) geçirildi. Etanol ekstresi susuz sodyum sülfat (Merck)'tan süzülerek armudi balona aktarıldı ve çözücü 40 °C de rotavapor kullanılarak uzaklaştırıldı. Balonda kalan ekstre tartıldıktan sonra GK/KS analizi yapıldı.

KFE tüpünün altına geçen su fazı distile edilmiş kloroform ile ayırma hunisinde ekstre edildi (Kekik Suyu: Çözücü oranı, 5:1). Süzme, yoğunlaştırma ve tartma işlemleri daha önce belirtildiği şekilde yapıldı. KFE tekniği uygulanırken etanolün dışında aseton ve metanol de şartlandırma ve ekstraksiyon işlemlerinde çözücü olarak kullanıldı. KFE tüpünden geçen su fazları üzerinde aynı işlemler gerçekleştirildi.

Elde edilen ekstrelerin miktarları Çizelge 4.18'de, ekstrelerin verimleri Çizelge 4.19'da ve GK/KS analiz sonuçları Çizelge 4.20.'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Katı Faz Ekstraksiyon tekniği ile kekik suyundan elde edilen ekstrelerin miktarları (g)

Çözücü	KFE	KFE'den Kalan Su, Kloroform	Sıvı-Sıvı Eks., Kekik Suyu
Etanol	0.18	0.07	-
Aseton	0.20	0.07	-
Metanol	0.18	0.095	-
Hekzan	-	-	0.205
Kloroform	-	-	0.05

Çizelge 4.19. Katı Faz Ekstraksiyon tekniği ile kekik suyundan elde edilen ekstrelerin verimleri

Çözücü	KFE	KFE'den Kalan Su, Klorofom	Sıvı-Sıvı Eks., Kekik Suyu
Etanol	0.07	0.03	-
Aseton	0.08	0.03	-

Çizelge 4.19. (Devam) Katı Faz Ekstraksiyon tekniği ile kekik suyundan elde edilen ekstrelerin verimleri

Çözücü	KFE	KFE'den Kalan Su, Kloroform	Sıvı-Sıvı Eks., Kekik Suyu
Metanol	0.07	0.04	-
Hekzan	-	-	0.08
Kloroform	-	-	0.02

Çizelge 4.20. Katı Faz Ekstraksiyon tekniği ile kekik suyundan elde edilen ekstrelerin GK/KS analiz sonuçları

Bileşik	KFE			KFE den Geçen su, Kloroform			Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon (Kekik Suyu)	
	I	II	III	I	II	III	Hekzan	Kloroform
butil asetat	-	-	-	-	-	-	0.3	-
(E)-2-hekzenal	-	-	-	-	-	-	e	-
1-okten-3-ol	-	-	-	-	-	-	e	-
4-metil-4-vinil butirolakton	-	-	-	-	0.2	0.2	-	-
fenil asetaldehit	-	-	-	-	0.5	-	e	-
p-simen	-	-	-	-	-	-	e	-
1,8-sineol	-	-	-	-	-	-	e	-
γ-terpinen	-	-	-	-	-	-	e	-
trans-linalool oksit (furanoid)	-	-	-	0.8	0.7	0.7	e	0.4
cis-linalool oksit (furanoid)	-	-	-	0.9	0.9	0.8	e	0.6
fenil etil alkol	-	-	-	-	0.2	-	-	0.6
hotrienol	-	-	-	-	0.3	-	-	-
linalool	6.6	7.7	7.6	0.2	-	0.2	5.0	-
trans-linalool oksit (piranoit)	-	-	-	0.3	0.3	0.3	-	0.5
borneol	-	0.6	0.5	-	-	-	0.3	-

Çizelge 4.20. **(Devam)** Katı Faz Ekstraksiyon Tekniği ile kekik suyundan elde edilen ekstrahların GK/KS analiz sonuçları

Bileşik	KFE			KFE den Geçen su, Kloroform			Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon (Kekik Suyu)	
	I	II	III	I	II	III	Hekzan	Kloroform
<i>cis</i> -linalool oksit (piranoit)	-	-	-	0.3	0.4	0.3	-	0.6
1,8-mentadien-4-ol		0.2	-	-	0.7	-		-
<i>p</i> -simen-8-ol	-	-	-	0.4	-	0.4	-	0.4
terpinen-4-ol		1.0	-	0.7	-	0.7		-
3,7-dimetil-1,5-oktadien-3,7-diol	-	-	-	1.8	1.8	1.6	-	2.7
3,7-dimetil-1-okten-3,7-diol	-	-	-	0.2	-	0.2	-	-
3,7-dimetil-1,7-oktadien-3,6-diol	-	-	-	2.1	2.2	1.9	-	3.1
timol	3.3	4.4	4.1	4.0	3.9	3.7	3.1	0.7
karvakrol	90.1	81.8	82.5	46.8	46.4	46.6	90.0	18.5
<i>trans</i> - <i>p</i> -ment-3-en-1,2-diol	-	-	0.3	1.8	1.8	1.6	-	2.1
<i>cis</i> - <i>p</i> -ment-4-en-1,2-diol	-	3.5	3.3	31.0	30.9	30.8	0.4	58.2
<i>cis</i> - <i>p</i> -ment-3-en-1,2-diol	-	0.3	0.2	3.1	3.2	3.1	-	4.9
bp. 151	-	-	-	-	3.8	3.6	-	4.4

I: Etanol

II: Aseton

III: Metanol

4.2.5.2. Amberlite XAD-4 reçine ile kekik suyunda çözünen bileşiklerin ekstraksiyonu

XAD-4 reçine'den 10 g tartılarak bir beher içine alındı. Üzerine 25 ml metanol (Merck) ilave edildi. Reçine, şişmesi için bir gece boyunca bekletildi.

Reçine hacminin ekstraksiyona olan etkisini incelemek için 2.5, 5 ve 10 ml hacminde reçine kullanıldı. 25 ml hacmindeki bütetin dip kısmına az miktarda

cam pamuğu yerleştirildi. Daha önce reçineyi şişirmek için kullanılan beherdeki metanol dekante edildi. Metanolü uzaklaştırmak için distile su ile reçine yıkandı. Su ile birlikte kontrollü bir şekilde istenen hacimde bürete aktarıldı. Büretteki reçine 100 ml distile su ile tekrar yıkandı. Reçinenin üzerinde 1 ml hacminde su bırakıldı.

250 ml hacminde dinlendirilmiş ancak süzme işlemi yapılmamış kekik suyu 500 ml hacminde ayırma hunisine aktarıldı. Ayırma hunisi üst kısmına huni konmuş olan bütetin üzerine yerleştirildi. Suyun akış hızı üstten ve bütetin musluğundan 1 damla/sn olacak şekilde ayarlandı. Kekik suyunun tümü geçtikten sonra bütetin musluğu kapatıldı ve üzerine bütetteki reçinenin hacminin 5 katı kadar etanol (distile edilmiş) kısımlar halinde (2.5 ml bütet hacmi için 2.5 ml x 5, 5 ml için 5 ml x 5 ve 10 ml için 10 ml x 5) için eklendi. Etanol, bütetin içinden 1 damla/sn hızla geçirildi. Etanol fazları birleştirildi. Susuz sodyum sülfat (Merck)'tan süzöldükten sonra 40 °C'de rotavaporda yoğunlaştırıldı ve GK/KS ile analizi yapıldı.

Reçineden geçen su fazı kloroform ile ekstre edildi (Kekik Suyu: Çözücü oranı, 5:1). Kloroform fazı susuz sodyum sülfat (Merck)'tan süzöldükten sonra 40 °C'de rotavaporda yoğunlaştırıldı ve GK/KS ile analizi yapıldı.

Elde edilen ekstrelerin miktarları Çizelge 4.21.'de, ekstre verimleri 4.22.'de ve GK/KS analiz sonuçları Çizelge 4.23.'te verilmiştir.

Çizelge 4.21. Amberlite XAD-4 reçine ile kekik suyundan elde edilen ekstrelerin miktarları (g)

Kullanılan Materyal	Çözücü	Reçine Yatak Hacmi (ml)		
		10	5	2.5
Kekik Suyu (Reçine)	Etanol	0.25	0.23	0.22
Reçineden Geçen Su	Kloroform	0.002	0.004	0.02
Kekik Suyu (Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon)	Hekzan	0.205		
	Kloroform	0.05		

Çizelge 4.22. Amberlite XAD-4 reçine ile kekik suyundan elde edilen ekstrelerin verimleri

Kullanılan Materyal	Çözücü	Reçine Yatak Hacmi (ml)		
		10	5	2.5
Kekik Suyu (Reçine)	Etanol	0.1	0.09	0.088
Reçineden Geçen Su	Kloroform	0.0008	0.002	0.008
Kekik Suyu (Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon)	Hekzan	0.08		
	Kloroform	0.02		

Çizelge 4.23. Amberlite XAD-4 reçine ile elde edilen ekstrelerin GK/KS analiz sonuçları

Bileşik	XAD-4 Etanol			Reçineden Geçen su, Kloroform			Sıvı-Sıvı Eks.	
	10	5	2.5	10	5	2.5	Hekzan	Kloroform
butil asetat	-	-	-	-	-	-	0.3	-
(E)-2-hekzenal	-	-	-	-	-	-	e	-
1-okten-3-ol	-	-	e	-	-	-	e	-
4-metil-4-vinil-butirolakton	-	-	-	-	-	0.3	-	-
benzil alkol	-	-	-	-	-	-	-	-
fenil asetaldehit	-	-	-	-	-	-	e	-
p-simen	-	-	e	e	e	-	e	-
1,8-sineol	-	-	-	-	-	-	e	-
γ-terpinen	-	-	-	-	-	-	e	-
trans-linalool oksit (furanoid)	0.2	0.3	0.2	e	e	1.1	e	0.4
cis-linalool oksit (furanoid)	0.3	0.4	0.3	e	e	1.5	e	0.6
linalool	3.9	5.2	5.1	e	e	3.2	5.0	-
hotrienol	-	-	-	-	e	e	-	0.6
fenil etil alkol	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.23. (Devam) Amberlite XAD-4 reçine ile elde edilen ekstrelerin GK/KS analiz sonuçları

Bileşik	XAD-4 Etanol			Reçineden Geçen su, Kloroform			Sıvı-Sıvı Eks.	
	10	5	2.5	10	5	2.5	Hekzan	Kloroform
<i>trans</i> -linalool oksit (piranoit)	-	-	-	e	e	1.6	-	0.5
borneol	0.3	0.3	0.3	e	-	e	0.3	-
<i>cis</i> -linalool oksit (piranoit)	-	-	-	e	-	1.0	-	0.6
p-simen-8-ol	-	-	-	-	-	0.8	-	0.4
terpinen-4-ol	0.6	0.6	0.7	-	-	0.8	-	-
α -terpineol	-	0.1	0.2	-	-	e	-	-
3,7-dimetil-1,5-oktadien-3,7-diol	1.7	1.6	1.1	9.0	6.2	3.9	-	2.7
3,7-dimetil-okt-1-en-3,7-diol	-	-	-	e	-	0.4	-	-
3,7-dimetil-1,7-oktadien-3,6-diol	1.0	-	-	6.9	5.3	3.7	-	3.1
timol	3.8	5.2	5.0	e	e	1.6	3.1	0.7
karvakrol	71.1	69.8	73.4	8.4	30.4	24.4	90.0	18.5
<i>trans</i> -p-ment-3-en-1,2-diol	0.6	0.6	0.5	-	-	2.2	-	2.1
<i>cis</i> -p-ment-4-en-1,2-diol	13.0	12.7	10.4	68.4	52.6	42.0	0.4	58.2
<i>cis</i> -p-ment-3-en-1,2-diol	1.4	1.4	1.0	7.2	5.0	4.7	-	4.9
bp. 151	1.0	1.0	0.8	-	-	1.3	-	4.4

4.2.6. Flaş kromatografisi ile kloroform ekstresinde bulunan oksijenli bileşiklerin ayrırımı

Kekik suyunun *n*-hekzan ve sonra kloroform ile ekstre edilmesi ile iki ayrı bileşimde ekstre elde edildiği görülmektedir. Kloroform ekstresi oksijenli bileşikler bakımından zengindir. Bu sonuçtan hareketle iki buhar distilasyonu çalışması yapılarak elde edilmiş olan kekik sularının her ikisi de 1500 ml lik üç kısma ayrıldı. Her 1500 ml lik kısım önce 300 ml *n*-hekzan (distile edilmiş) sonra da 300 ml kloroform (100+100+100 ml) ile ekstre edildi. *n*-Hekzan ve kloroform

ekstreleri ayrı ayrı erlenlere alınarak birleştirildi. Susuz sodyum sülfattan süzöldükten sonra 40 °C'de rotavaporda yoğunlaştırıldı. Her iki çalışmadan % 0.1 verimle *n*-hekzan ekstresi ve % 0.02 verimle kloroform ekstresi elde edildi. Kloroform ekstreleri birleştirilerek Flaş Kromatografisi'nde kullanıldı (Ekstre miktarı:1.8 g).

Flaş Kromatografisi için 250 ml hacminde kolon kullanıldı. 60 g silikajel önceden dibine cam pamuğu yerleştirilmiş kolona dikkatli bir şekilde aktarıldı. Kolondan üstten verilen ve alttan alınan hacimler eşit oluncaya kadar *n*-hekzan geçirildi. Kolondaki şartlar sağlandıktan sonra, üzerine ekstre emdirilmiş silikajel her tarafında eşit olacak şekilde kolondaki adsorbanın üzerine yerleştirildi. 100 ml hacmindeki çözücü ve çözücü karışımları geçirilerek fraksiyonlar toplandı. Kullanılan çözücüler, elüsyon için geçerli olan şartlar ve fraksiyonların miktarları Çizelge 4.24.'te verilmektedir.

Çizelge 4.24. Flaş kromatografisi'nde kullanılan çözücüler, elüsyon şartları ve fraksiyonların miktarları

Kullanılan Çözücü	Çözücü Oranı	Çözücü Miktarı	Fraksiyon No	Miktar (g)
Hekzan	-	100	1	-
Hekzan:Etil asetat	95:5	100	2	-
Hekzan:Etil asetat	90:10	100	3	-
Hekzan:Etil asetat	80:20	100	4	0.4
Hekzan:Etil asetat	70:30	100	5	0.08
Hekzan:Etil asetat	60:40	100	6	0.1
Hekzan:Etil asetat	55:45	100	7	0.2
Hekzan:Etil asetat	50:50	100	8	0.7
Hekzan:Etil asetat	40:60	100	9	0.2
Hekzan:Etil asetat	30:70	100	10	0.06
Hekzan:Etil asetat	20:80	100	11	0.02
Hekzan:Etil asetat	10:90	100	12	0.01

Çizelge 4.24. (Devam) Flaş kromatografisi'nde kullanılan çözücüler, elüsyon şartları ve fraksiyonların miktarları

Kullanılan Çözücü	Çözücü Oranı	Çözücü Miktarı	Fraksiyon No	Miktar (g)
Etil asetat	-	100	13	0.01
Etil asetat:MeOH	50:50	100	14	-

İlk 8 fraksiyon için Toluen:Etil asetat (93:7), alınan tüm fraksiyonlar için Hekzan:Etil asetat (40:25) ve 8-12 nolu fraksiyonlar için Hekzan:Etil asetat (50:50) çözücü sistemleri kullanılarak fraksiyonlar İTK'da incelendi. 4 nolu fraksiyondan itibaren tüm fraksiyonlar filtre kağıdından süzüldü. Süzüntüler 40 °C'de rotavaporda yoğunlaştırıldı. 4-14 arasındaki tüm fraksiyonlar eter ile çözüldü. Hekzan:Etil asetat (30:70) çözücü sistemi kullanılarak İTK'da incelendi. 8, 9 ve 10 nolu fraksiyonların tek leke verdikleri görüldü. Bu fraksiyonların GK analizi sonuçları Çizelge 4.25.'te verilmiştir.

Çizelge 4.25. Flaş kromatografisi ile elde edilen oksijenli bileşik bakımından zengin 8, 9 ve 10 nolu fraksiyonların GK analiz sonuçları

Bileşik	Fraksiyon No		
	8	9	10
3,7-dimetil-1,5-oktadien-3,7-diol	2.7	12.4	12.7
<i>trans</i> -p-ment-3-en-1,2-diol	2.7	-	-
3,7-dimetil-1,7-oktadien-3,6-diol	6.8	0.6	-
<i>cis</i> -p-ment-4-en-1,2-diol	76.3	67.7	25.0
<i>cis</i> -p-ment-3-en-1,2-diol	0.6	14.6	53.4
karvakrol	1.7	-	1.4

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada su buharı distilasyonu ile *Origanum onites* L. (Kekik)'den elde edilen yağ altı suyu üzerinde geleneksel ve modern yöntemler ile sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemleri yapılmış ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Bu amaçla ayırma hunisi, Soxhlet ekstraktörü ile sudan hafif ve ağır çözücüler ile çalışmaya olanak sağlayan Normag ekstraktörler kullanılmıştır. Bunun yanında kekik bitkisi üzerinde uçucu yağ miktar tayini ve volumetrik yöntemle su miktar tayini gibi bazı Farmakognozik incelemeler de gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarda bitkisel materyal olarak Türkiye'de kekik yağının ve kekik suyunun üretilmesi için geniş mikyasta kullanım bulan bir tür olan *Origanum onites* L. tercih edilmiştir. Endüstriyel ölçekte kekik yağının ve yağ altı suyunun elde edilmesi için su buharı distilasyonu kullanılır. Bu nedenle yöntem olarak buhar distilasyonu kullanılmıştır. Kekik suyunun içermiş olduğu bileşiklerin zaman içinde yapısında değişmelerin meydana gelmesi nedeniyle küçük ölçekte çalışmalar yapılarak elde edilen distilatın hemen kullanılması hedeflenmiştir.

Buhar distilasyonu ile elde edilmiş olan kekik yağ altı suyu, Clevenger apareyinde distile edilmiştir. Bu şekilde dekante edilerek ayrılması mümkün olmayan suda çözünmüş veya dağılmış halde bulunan uçucu yağın kazanılması sağlanmıştır. Bu uçucu yağın analizi, bitkiden buhar distilasyonu ve Clevenger apareyi kullanılarak su distilasyonu işlemleri neticesinde elde edilen uçucu yağların analizi ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Ayrıca distilasyondan sonra yağından kurtarılmış yağ altı suyu kloroform ile ekstre de edilmiştir. Bu kloroform ekstresinde ana bileşik *cis-p-ment-4-en-1,2-diol* (% 51.8)'dür.

Kaynaklar incelendiğinde ayırma hunisi ile yapılan çalışmalarda sıvı-sıvı ekstraksiyonun yapılabilmesi için tek bir yöntem mevcut değildir. Ancak iki kaynakta doğrudan konu ile ilgili ve uygun bir yöntem olduğu görülmektedir (Guenther, 1948; Gallori ve ark., 2001). Deneyler, bu iki yöntemin incelenmesine yönelik olarak sürdürülmüştür. Organik çözücülerin kullanılmasında göz önüne alınması gereken iki husus bulunmaktadır. Öncelikle bu maddeler toksiktir ve ortamdan tam olarak uzaklaştırılmaları gerekir. Ayrıca kullanılan çözücü miktarı önceki iki durumu etkilediği gibi yöntemin maliyetinde de önemli artışlara yol

açabilmektedir. Bunu engellemek için en uygun miktarı bulmak gerekir. Guenther iki kez çözücü harcanmasının gerektiğini söylemekte (Guenther, 1948), bunun yanında diğer kaynakta aromatik su: çözücü oranının 5:1 olması gerektiği belirtilmektedir (Gallori ve ark., 2001). Her iki oranın yanında 1:1 aromatik su: çözücü oranı da kullanılmıştır. Ekstrelerin verimi açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığı, işlemin 5:1 oranı ile daha ekonomik olabileceği görülmüştür.

Kekik suyunun organik çözücülerle sıvı-sıvı ekstraksiyonunda daha önce yapılmış bir çalışmada *n*-hekzan ve kloroform kullanılmıştır (Aydın, 1996). Ön çalışmalarda ekstraksiyon için yine bu çözücülerin kullanılması uygun görülmüştür. Ayrıca metilen klorür kullanılarak ayırma hunisinde ve Soxhlet apareyinde sıvı-sıvı ekstraksiyonu da yapılmıştır. Metilen klorür ile Soxhlet ekstraksiyonu gül suyu için TSE’de verilmiş bir yöntemdir. Bu şekilde kekik suyunun ve başka bitkilerden elde edilen aromatik suların incelenmesinde verilen yöntemin kullanılabilmesi de gösterilmiştir. Metilen klorür ekstrelerinin miktarları, *n*-hekzan ve sonra kloroform kullanımı ile elde edilen ekstrelerin miktarları toplamına çok yakındır. Tek başına metilen klorür ile ekstraksiyonun kekik suyundaki bileşikler elde etmek için yeterli olduğu gösterilmiş bulunmaktadır. Bunun yanında kekik suyunun farklı polariteye sahip *n*-hekzan, kloroform, dietileter ve etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu şekilde çözücünün elde edilen ekstrenin verimine ve bileşimine olan etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Çözücüler 1:2, 1:1 ve 5:1 Kekik suyu:Çözücü oranı olacak şekilde kullanılmıştır. GK analizinde ana bileşikler göz önüne alındığında belirgin bir farklılık görülmemektedir. Ekstre miktarları ve yüzdeleri incelendiğinde Kekik suyu:Çözücü oranının ekstre verimini etkilemediği görülmektedir. Bileşim açısından tek farklılık hangi çözücü oranı kullanılırsa kullanılsın *n*-hekzandan sonra kloroform ile ekstraksiyon sonucunda *cis*-p-ment-4-en-1,2-diol’ün relatif yüzdesinin en yüksek değerde elde edilebilmesidir. Bu bileşik kullanılan bütün organik çözücülerle elde edilmiş olan ekstrelerde bulunmaktadır. Ancak sadece *n*-hekzan ile ekstraksiyondan kalan kekik suyunun kloroform ile ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrede en yüksek değere

ulaşabilmektedir. Bu durum bu bileşiğin ekstreden kromatografik yöntemlerle yüksek verimde izole edilebilmesi için önemli bir faktör olarak görülmektedir.

Süzülmüş kekik suyunun sıvı-sıvı ekstraksiyonundan elde edilen veriler, kekik suyunun süzülmeden kullanımı ile aynı değerleri vermiştir. Ekstre miktarları ve GK analiz sonuçları çok benzerdir. Ancak çalışmalarda kekik suyunun üzerinde bulunan uçucu yağın hemen tamamının işlemiden kısa bir süre sonra dekante edilerek ayrıldığı unutulmamalıdır. Uzun süre beklemiş olan kekik sularında bir tortu oluştuğu görülmüştür. Süzme işlemi bu tortunun uzaklaştırılmasında kullanılabilir. Büyük uçucu yağ damlalarının ayrılması dışında süzme işleminin yararı görülmemektedir.

Modern ekstraktörlerden biri olan laboratuvar ölçekli Normag ekstraktörün iki farklı tipi ile sudan hafif ve sudan ağır çözücüler ile sıvı-sıvı ekstraksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Farklı sürelerde ancak aynı miktarda çözücü kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçları karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Her iki tip organik çözücü kullanılarak elde edilen sonuçlar incelendiğinde değişen sürenin ekstraksiyon verimine anlamlı bir etki yapmadığı görülmektedir. Ayrıca ayırma hunisinde 1:2 oranında (kekik suyu:çözücü) çözücü kullanılarak yapılan ekstraksiyon ile ekstraktörde 1:1 oranında (kekik suyu:çözücü) çözücü kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemleri arasında da verim açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Çalışmaların bir sonraki aşaması çözücü miktarının daha aşağıya çekilmesi yönünde olmalıdır.

KFE tekniğinde, kekik suyunda bulunan uçucu yağ ters faz Supelclean LC-8 KFE tüpü (6 ml, 0.5 g) kullanılarak sudan ayrılmış ve etanol, aseton ve metanol kullanılarak tüpten alınmıştır. 250 ml kekik suyu için 10 ml çözücü kullanılmıştır. Elde edilen ekstre miktarlarının, farklı polaritelerde organik çözücülerle ekstraksiyon çalışmalarından elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık göstermediği ortaya çıkmıştır. Etanol, aseton ve metanol ekstrelerinin miktarları sırası ile 0.18, 0.20 ve 0.18 g'dır. Kekik suyunun *n*-hekzan ile ekstraksiyonundan gelen ekstrenin miktarı ise 0.205 g'dır. Çok az miktarda çözücü ile yağ altı suyunda bulunan uçucu yağların büyük bir kısmını ayırmak mümkün olmuştur. Ancak yine de uçucu yağın tümüyle ayrıldığını söylenemez.

Tüpün altına geçen su kloroform ile ekstre edildiğinde bir miktar daha maddenin suda kaldığı görülmektedir. Bu ekstrelerin miktarları yağ altı suyunun önce *n*-hekzan sonra da kloroform ile ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında, KFE tekniğinde 0.07-0.095 g arasında değişirken, sıvı-sıvı ekstraksiyonda bu değer 0.05 g'dır.

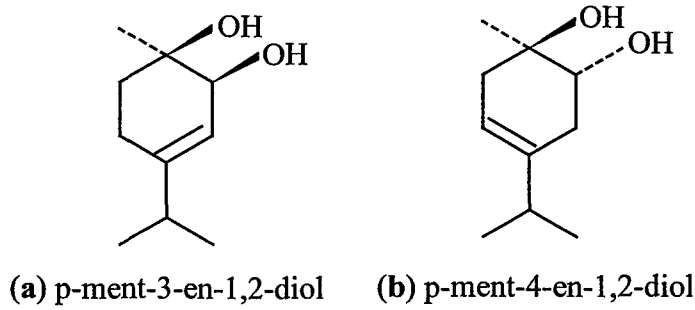
Kekik suyunda bulunan bileşiklerin Amberlite XAD-4 reçine ile ayrılmasına yönelik çalışmada farklı hacimlerde reçine ve buna bağlı olarak farklı hacimlerde metanol kullanılmıştır. Bu şekilde yatak hacmi ve çözücü miktarının adsorpsiyon ile kazanıma etkisi incelenmiştir. Etanol ekstrelerinin miktarları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. Reçineden geçen su kloroform ile ekstre edilmiştir. Bu şekilde reçinenin yağ altı suyundaki maddelerin tümünü adsorbe edip etmediği incelenmiştir. Bu şekilde elde edilen kloroform ekstresinin miktarı suyun doğrudan önce *n*-hekzan sonra kloroform ile ekstraksiyonundan gelen ekstrenin miktarından daha düşüktür.

İki kez yapılan buhar distilasyonu sonucunda alınan 9 l hacmindeki kekik suyu, geleneksel yöntemle ayırma hunisinde *n*-hekzan ile ve kalan su kloroformla ekstre edilmiştir. Kloroform ekstreleri birleştirilerek Flash Kromatografisi'nde kullanılmıştır. Bu şekilde kekik suyunda bulunan oksijenli bileşiklerin izolasyonu hedeflenmiştir. Alınan 14 fraksiyondan 8, 9 ve 10 nolu fraksiyonların oksijenli bileşikler bakımından zengin olduğu görülmektedir. GK/KS analizi sonuçlarına göre 8, 9 ve 10 nolu fraksiyonlarda *cis*-p-ment-4-en-1,2-diol yüzdeleri sırası ile % 84.8, % 77.5 ve % 28.2'dir. Bu üç fraksiyondan 9 ve 10. fraksiyon, İTK'da (Hekzan:Etil asetat 30:70 çözücü sisteminde) aynı R_f'e sahip mor renkli tek leke şeklinde ortaya çıkmaktadır. Sadece aynı R_f'e ve mor renge sahip 8 nolu fraksiyonun üstünde bir leke daha olduğu görülmüştür. *cis*-p-ment-3-en-1,2-diol ise bu fraksiyonlardaki ikinci ana bileşiktir. 8, 9 ve 10 nolu fraksiyonlardaki yüzde değerleri sırası ile % 0.9, % 11.7 ve % 54.1'dir. Bu fraksiyonlardaki 3. ana bileşik 3,7-dimetil-1,5-oktadien-3,7-diol'dür. Bu bileşikte *cis*-p-ment-3-en-1,2-diol'e benzer şekilde 8. fraksiyonda en düşük, 10. fraksiyonda ise en yüksek değerine ulaşmaktadır. Fraksiyonlardaki yüzdesi sırası ile % 2.7, % 7.5 ve % 13.1'dir. Bundan başka 8 nolu fraksiyonda olup 9 ve 10 nolu fraksiyonda bulunmayan

bileşikler de vardır. Bu bileşikler 3,7-dimetil-1,7-oktadien-3,6-diol ve *trans*-p-ment-3-en-1,2-diol'dür.

Şekil 5.1.'de verilmiş olan p-ment-3-en-1,2-diol (a) ve p-ment-4-en-1,2-diol (b) isimli bileşikler, *Corynespora cassiicola*'nın γ -terpinen' den oluşturduğu biyotransformasyon ürünleri olarak bildirilmiştir (Abraham ve ark., 1986).

Aynı bileşikler *Ferula jaeschkeana*'nın uçucu yağından izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Buckingham, 1994; Garg ve Agarwal, 1988).



Şekil 5.1. p-ment-3-en-1,2-diol (a) ve p-ment-4-en-1,2-diol (b) isimli bileşiklerin molekül formülleri

Literatür incelendiğinde p-ment-3-en-1,2-diol ve p-ment-4-en-1,2-diol isimli bileşiklerin *Ferula jaeschkeana*'dan çok aşamalı yöntemlerle izole edildiği anlaşılmaktadır. Her ne kadar *n*-hekzan ile ekstraksiyondan sonra elde edilen kloroform ekstresi miktarı az olsa da distilasyon işlemi sonrasında yan ürün olarak çok miktarda kekik suyunun ortaya çıkması ve verimli bir yöntemle bu yağ altı suyundaki bileşiklerin kolay ve verimli bir şekilde izole edilebilmesi olasılığı nedeni ile *Ferula jaeschkeana* uçucu yağından izolasyona göre bu bileşiklerin daha kolay saflaştırılabileceği görülmektedir.

Suda çözünmüş ya da dağılmış halde bulunan uçucu yağ bileşiklerinin veya damlacıklarının sudan ayrılması için kullanılabilecek bir çok yöntem bulunmaktadır. Tez çalışmaları içinde bunlardan bir kısmı incelenebilmiştir. Ayırım metodları içinde tezde yer almayan poroplast ekstraksiyon yöntemi ve pervaporasyonun önemli bir yeri bulunmaktadır. Poroplast ekstraksiyon yönteminin suda çözünmüş uçucu yağ bileşiklerinin sudan ayrılması için kullanımı daha eskiye dayanmaktadır. Pervaporasyon ise bu konuda gelecek vaat

etmektedir. KFE'nin kolay, hızlı ve ekonomik bir yöntem olduğu çalışma sonuçlarından görölmektedir. Bu yöntemde az miktarda çözücü kullanılmaktadır. KFME tekniğinin ise yağ altı suyundaki ana bileşiğin miktar tayininin yapılmasında kullanılabileceği görölmektedir (Boydağ ve ark., 2000b). KFE'ye benzer şekilde Amberlite XAD-4 reçine ile adsorpsiyon çalışmalarında da düşük hacimde reçine yatağı ve çözücü kullanılabileceği gösterilmiştir. Ters faz C₁₈ adsorban ve Amberlite XAD-4 reçine ile uçucu yağ bileşiklerinin sudan ayrılabilceği kanıtlanmıştır.

Çizelge 5.1.'de göröldüğü gibi,

1) KFE tekniği ile etanol kullanımı kekik suyu bileşiminin belirlenmesi için hızlı bir yöntem olarak önerilir. Özel adsorbanı ve vakum pompası gereksinimi yanında toksisitesi çok düşük olan etanol az miktarda (250 ml kekik suyu için 10 ml) kullanılmaktadır.

2) Daha ekonomik ve herhangi bir laboratuvarıda uygulanabilir bir yöntem olarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile kekik suyunun bileşimi belirlenecek ise ayırma hunisi ile metilen klorürün 5:1 oranında (Kekik suyu:Çözücü oranı) kullanılması önerilir.

3) Noniyonik bir reçine olan Amberlite XAD-4 ile 10 ml hacmindeki reçine için 50 ml etanol kullanılarak kekik suyu bileşiklerini elde etmek mümkündür.

4) Kekik suyunun *n*-hekzan ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin bileşimi uçucu yağ bileşimi ile paralellik göstermektedir. Bu ekstrede ana bileşik karvakrol'dür. Hekzan ile ekstraksiyondan kalan suyun kloroform ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrede ise ana bileşik *cis*-p-ment-4 -en-1,2,-diol'dür.

5) Süzölmüş ve süzölmeden kullanılan kekik suyu ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon çalışmaları arasında verim açısından bir farklılık olmadığı görölmüştür.

6) Kekik suyunun ana bileşikleri olarak karvakrol, linalool, timol ve *cis*-p-ment-4-en-1,2-diol bulunmuştur.

Aromatik suların kullanımının gün geçtikçe yaygın ve “popüler” hale geldiği görülmektedir. Marketlerde ve eczanelerde bazı firmaların ürettiği tek bitkiden veya bitki karışımlarından hazırlanan aromatik sular satışı sunulmaktadır. Bu aromatik suların çok farklı biyolojik aktivitelere sahip olduğu iddia edilmektedir. Bu aromatik sularda bulunan bileşiklerin zaman içinde nasıl ve ne miktarda değişime uğradığı araştırılmalıdır. Farklı firmaların piyasaya sunduğu kekik sularında yapılan bir incelemede bileşimlerin çok farklı olduğu anlaşılmıştır (Boydağ ve ark., 2002). Bu durum kullanılan bitki, distilasyon işlemi ve bekleme süresinden kaynaklanıyor olabilir. Sebep ne olursa olsun bileşimin değişmesinin etkide değişmelere yol açabileceği göz önüne alınmalıdır.

Çizelge 5.1. Ekstraksiyon için kullanılan tekniklerin çözücü, verim (%) ve ana bileşikler açısından karşılaştırılması

Teknik	Çözücü	Verim	Ana Bileşik			
			linalool	cis-p-ment-4-en-1,2-diol	timol	karvakrol
Ayırma Hunisi*	Hekzan	0.08-0.09	4.7-5.95	1.2-2.2	3.6-4.04	82.7-85.5
	Kloroform (HKSE)	0.01-0.02	-	50.4-62.8	0.4-1.1	0.7-14.4
	Metilen Klorür	0.1	4.9	6.4	3.7	75.8
	Dietileter	0.08-0.1	3.6-4.8	4.4-10.8	3.3-3.6	70.9-81.1
	Etilasetat	0.1	5.0-5.8	5.0-7.8	3.4-3.7	70.2-77.4
	Kloroform	0.1	5.2-5.6	1.1-8.5	3.5-3.6	70.1-77.1
Soxhlet*	Metilen Klorür	0.1	5.0	5.8	3.6	74.6
Normag Ekstraktör*	Hekzan	0.09-0.1	5.7-6.2	0.8-5.2	3.8-4.1	79.2-84.2
	Kloroform	0.1	3.1-7.8	2.9-9.1	3.3-3.8	74.8-75.8
KFE**	Etanol	0.07	6.6	-	3.3	90.1
	Aseton	0.08	7.7	3.5	4.4	81.8
	Metanol	0.07	7.6	3.3	4.1	82.5
Amberlite XAD-4**	Etanol	0.09-0.1	3.9-5.2	10.4-13.0	3.8-5.2	69.8-73.4

HKSE: *n*-Hekzan ile ekstraksiyondan kalan suyun ekstraksiyonu

*:GK analiz sonuçları

** :GK/KS analiz sonuçları

Yağ altı sularının içinde gül suyu önemli bir yer tutar. Gül yağının çok pahalı bir uçucu yağ olduğu düşünülürse gül suyunun içerdiği bileşikler yapılarını bozmadan elde etmenin ekonomiye yarar sağlayacağı ortadadır. Bileşikler gül suyundan izole etmek için Pervaporasyon tekniği kullanılabilir. Pervaporasyon işlemi çözücü kullanılmadığı ve işlem yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmediği için koku özelliği kaybedilmeden “ikincil” yağın sudan alınması sağlanabilecektir. Bu niteliği ile incelemeye değer bir konudur.

Yağ altı sularının değerlendirilmesinin sağlayacağı faydalar şu şekilde özetlenebilir:

* Yağ altı sularında bulunan uçucu yağın geri kazanılması, bu şekilde bitkideki koku özelliğinin tam olarak belirlenmesi (Ana yağ ve “ikincil” yağın koku özelliklerinin birleşmesi bitkinin koku özelliğine yaklaşmamızı sağlar).

*Atılan yağ altı sularında bulunan uçucu yağın alınarak ekonomiye kazandırılması.

*Başka kaynaklarda bulunan ve izolasyonu zor olan bileşiklerin veya değerli oksijenli bileşiklerin elde edilmesi (Kekik suyunda bu durum mevcuttur. Diğer bitkilerden elde edilen yağ altı sularında bu durumun mevcut olup olmadığı yapılacak çalışmalarla ortaya çıkarılabilir).

Yukarıda özetlenen yararların ekonomiye sağlayacağı katkı yanında, asıl üzerinde titizlikle durulması gereken konu dahilen kullanılan ve önemli miktarda tüketimi olan yağ altı sularının kalitesidir. Kekik suyu bu anlamda büyük önem taşımaktadır. Kekik suyunun etken bileşiklerinin belirlenmesi ve standardizasyonunun sağlanması hem halkımızın sağlığı hem de bu ürünün dış pazarlara sunulması için önemlidir. Üretimi standart hale getirildiğinde bu ürün dış pazarlara da açılacağından ekonomimize katkısı büyük olacaktır.

Araştırmamızda elde edilen sonuçlar ışığında kekik suyunun önemi bir kez daha ortaya çıkmıştır. Ancak kekik suyu yanında piyasada bulunan diğer aromatik suların da kimyasal, biyolojik aktivite, mikrobiyolojik ve stabilite çalışmalarının eksik olduğu görülmektedir. Bu ürünlerin standartlaştırılması şarttır. Bu tezde kekik suyu model alınarak yapılan çalışmalar yer almaktadır. Benzer çalışmalar diğer aromatik suların standardizasyonunda kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- ABE, I., FUKUHARA, T., MARUYAMA, J., TATSUMOTO, H., IWASAKI, S., Preparation of Carbonaceous Adsorbents for Removal of Chloroform from Drinking Water, *Carbon*, 39, 1069-1073 (2001).
- ABRAHAM, W.R., STUMPF, B., KIESLICH, K., Microbial Transformations of Terpenoids with 1-p-menthene Skeleton, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 24, 24-30 (1986).
- ACAR, M. İ., GÜL, G. S., ÖRTEL, E., Türkiye’de Kızılçam Ormanlarından Akma Reçine Üretiminde Asit-Pasta Tahrik Tekniğinin Uygulanması Esasları Üzerine Araştırmalar, T.C. Orman Bakanlığı Ege Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Orman Bakanlığı Yayın No: 25, Teknik Bülten No:5, İzmir (1996).
- AIKEN, G. R., THURMAN, E. M., MALCOLM, R. L., Comparison of XAD Macroporous Resins for the Concentration of Fulvic Acid from Aqueous Solution, *Anal. Chem.*, 51, 1799-1803 (1979).
- ALPENDURADA, M. F., Solid-Phase Microextraction: A Promising Technique for sample Preparation in Environmental Analysis (Review), *J. Chromatogr. A*, 889, 3-14 (2000).
- AMIN, L. P., PANGARKAR, V. G., BEENACKERS, A. A. C. M., Recovery of Valuable Perfumery Compounds from a Geranium Steam Distillation Condensate Using Polymeric Adsorbents, *Separ. Sci. Technol.*, 36, 3639-3655 (2001).
- ANTONELLI, A., FABBRI, C., Essential Oils: SPE Fractionation, *Chromatographia*, 49, 125-130 (1999).
- ARCTANDER, S., Perfume and Flavor Materials of Natural Origin, Elizabeth, N.J., U.S.A. (1960).
- ARSLANDERE, Ö., Yağaltı Sularının Kimyasal Bileşimi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Şubat (2002).
- ATAL, C. K., Fractional Distillation of Essential Oils, 2nd Unido Workshop On Essential Oil Industries, Manila, 4-8 Şubat (1991).

ATRA, R., VATAI, G., BÉKÁSSY-MOLNÁR, E., Isopropanol Dehydration by pervaporation, Chem. Eng. Process., 38, 149-155 (1999).

AUGUSTO, F., LEITE E LOPES, A., ALCARAZ ZINI, C., Sampling and Sample Preparation for Analysis of Aromas and Fragrances, Trends Anal. Chem., 22, 160-169 (2003).

AU-YEUNG, C. Y., MACLEOD, A. J., A Comparison of the Efficiency of the Likens and Nickerson Extractor for Aqueous, Lipid/Aqueous, and Lipid Samples, J. Agric. Food Chem., 29, 502-505 (1981).

AYALA, R. S., LUQUE DE CASTRO, M. D., Continuous subcritical Water Extraction as a Useful Tool for Isolation of Edible Essential Oils, Food Chem., 75, 109-113 (2001).

AYDIN, S., BAŞER, K.H.C., ÖZTÜRK, Y., The Chemistry and Pharmacology of *Origanum* (Kekik) Water, Essential Oils: Basic and Applied Research, Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils, Viyana, Avusturya, 8-11 Eylül (1996a).

AYDIN, S., Kekik (*Origanum onites* L.) Yağ Altı Suyunun Farmakolojisi, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Ocak (1996).

AYDIN, S., ÖZTÜRK, Y., BAŞER, K. H. C., Ege Yöresinde Yetişen *Origanum onites* L. (İzmir Kekiği) Üzerinde Etnofarmakolojik Araştırmalar, X. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, İzmir, 20-22 Mayıs (1993a).

AYDIN, S., ÖZTÜRK, Y., BAŞER, K. H. C., Kekik (*Origanum onites* L.) Yağ-altı-suyu'nun Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi, XI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara, 22-24 Mayıs (1996b).

AYDIN, S., ÖZTÜRK, Y., BAŞER, K. H. C., Kekik (*Origanum onites* L.) Yağ-altı-suyu'nun Koleretik Etkisi, XI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara, 22-24 Mayıs (1996c).

AYDIN, S., ÖZTÜRK, Y., BAŞER, K. H. C., *Origanum onites* L. (İzmir Kekiği)'nin Uçucu ve Uçucu Olmayan Fraksiyonlarının Barbiturat Uyku Zamanı Üzerine Etkisi ve Akut Letal Toksisitesi, X. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, İzmir, 20-22 Mayıs (1993b).

- BAIRD, M. H. I., Special Techniques. In: Handbook of Solvent Extraction, Lo, T. C., Baird, M. H. I., Hanson, C. (eds.), John Wiley&Sons, New York (1983).
- BAPTISTA, J. A. B., TAVARES, J. F. DA P, CARVALHO, R. C. B., Comparison of Catechins and Aromas among Different Green Teas Using HPLC/SPME-GC, Food Res. Int., 31, 729-736 (1998).
- BARBE, A. M., BARTLEY, J. P., JACOBS, A. L., JOHNSON, R. A., Retention of Volatile Organic Flavour/Fragrance Components in the Concentration of Liquid Foods by Osmotic Distillation, J. Membrane Sci., 145, 67-75 (1998).
- BARKER, S. A., Matrix Solid-Phase Dispersion (Review), J. Chromatogr. A, 885, 115-127 (2000).
- BARKER, S. A., Matrix Solid-Phase Dispersion, LC GC-Mag. Sep. Sci., 11, 719-724 (1998).
- BARTAK, P., CAP, L., Determination of Phenols by Solid-Phase Microextraction, J. Chromatogr. A, 767, 171-175 (1997).
- BARTÁK, P., FRNKOVÁ, P., ČÁP, L., Determination of Phenols Using Steam Distillation-Extraction, J. Chromatogr. A, 867, 281-287 (2000).
- BAŞER, K. H. C., Aromatic Plant and Essential Oil Production in Turkey, 4th International Conference of Aromatic and Medicinal Plants, Nyons, Fransa, 5-7 Aralık (1994).
- BAŞER, K. H. C., Essential Oils from Aromatic Plants Which Are Used As Herbal Tea in Turkey, K. H. C. Başer (ed.), Flavours, Fragrances and Essential Oils, Proceedings of the 13th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils, pp. 67-79, AREP Publ., İstanbul, 15-19 Ekim (1995).
- BAŞER, K. H. C., The Turkish *Origanum* Species. In: Oregano, The Genera *Origanum* and *Lippia*, Kitzios, S. E. (ed.), Taylor & Francis, Londra (2002).
- BAYRAK, A., ŞENCAN, D., Güly ağından Gülsuyuna Geçen Bazı Monoterpen Alkollerin Gaz Kromatografisiyle Belirlenmesi, Standard, 70-77 (Aralık 1995).
- BAYTOP, A., Türkiye’de Kullanılan Yabani ve Yetiştirilmiş Aromatik Bitkiler, Doğa, Tr. J. Pharmacy, 1, 76-88 (1991).

BAYTOP, T., BAŞER, K. H. C., On Essential Oils And Aromatic Waters Used As Medicine in Istanbul Between 17th and 19th Centuries, K. H. C. Başer (ed.), Flavours, Fragrances and Essential Oils, Proceedings of the 13th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils, 99-107, AREP Publ., İstanbul, 15-19 Ekim (1995).

BAYTOP, T., ÖZTEKİN, A., Türkiye'nin Bitkisel Katran Çeşitleri Üzerinde Araştırmalar, V. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Ankara, 15-17 Kasım (1984).

BAYTOP, T., Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul (1999).

BEAUCHÊNE, D., GRUA-PRIOU, J., LAMER, T., DEMAÏMAY, M., QUÉMENEUR, F., Concentration by Pervaporation of Aroma Compounds from *Fucus serratus*, J. Chem. Technol. Biot., 75, 451-458 (2000).

BELTRAN, J., LÓPEZ, F. J., HERNÁNDEZ, F., Solid-Phase Microextraction in Pesticide Residue Analysis (Review), J. Chromatogr. A, 885 389-404 (2000).

BÉNÉ, A., FORNAGE, A., LUISIER, J.-L., PICHLER, P., VILLETZ, J. -C., A New Method for the Rapid Determination of Volatile Substances: The SPME-Direct Method, Part I: Apparatus and Working Conditions, Sensor. Actuat. B-Chem., 72, 184-187 (2001).

BENGTSSON, E., TRÄGÅRDH, G., HALLSTRÖM, B., Concentration of Apple Juice Aroma from Evaporator Condensate using Pervaporation, Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 25, 29-34 (1992).

BICCHI, C., DRIGO, S., RUBIOLO, P., Influence of Fibre Coating in Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatographic Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, J. Chromatogr. A, 892, 469-485 (2000).

BICCHI, C., JOULAIN, D., Headspace-Gas Chromatographic Analysis of Medicinal and Aromatic Plants and Flowers, Flavour Fragr. J., 5, 131-145 (1990).

BLANCH, G. P., TABERA, J., HERRAIZ, M., REGLERO, G., Preconcentration of Volatile Components of Foods: Optimization of the Steam Distillation-Solvent Extraction at Normal Pressure, J. Chromatogr., 628, 261-268 (1993).

BOHRA, P., VAZE, A. S., PANGARKAR, V. G., TASKAR, A., Adsorptive Recovery of Water Soluble Essential Oil Components, J. Chem. Tech. Biotech., 66, 97-102 (1994)

BOUVIER, E. S. P., MARTIN, D. M., IRANETA, P. C., CAPPARELLA, M., CHENG, Y.-F., PHILLIPS, D. J., A Novel Polymeric Reversed-Phase Sorbent for Solid Phase Extraction, LC GC-Mag. Sep. Sci., 10, 577-585 (1997).

BOYDAĞ, İ., ARSLANDERE, Ö., KIRIMER, N., KÜRKÇÜOĞLU, M., BAŞER, K.H.C., Ticari Kekik Sularında Çözünen Bileşiklerin İzolasyonu ve Kimyasal Bileşimlerinin Belirlenmesi, XIV. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (XIV. BİHAT), Eskişehir, 29-31 Mayıs (2002).

BOYDAĞ, İ., KÜRKÇÜOĞLU, M., BAŞER, K.H.C., Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE) Tekniği ile Kekik Suyunda Bulunan Aromatik Bileşiklerin İzolasyonu, XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, İstanbul, 20-22 Eylül (2000a).

BOYDAĞ, İ., KÜRKÇÜOĞLU, M., BAŞER, K.H.C., The Headspace and Immersion Type SPME Trapping of Volatiles in the Aromatic Water of *Origanum onites*, 31st International Symposium on Essential Oils (ISEO 2000), Hamburg, Germany, 10-13 Eylül (2000b).

BOYDAĞ, İ., KÜRKÇÜOĞLU, M., ÖZEK, T., BAŞER, K. H. C., Isolation of Some Soluble and Dispersed Materials of Oregano Water, Chem. Nat. Prod., 39, 465-469 (2003).

BOYDAĞ, İ., KÜRKÇÜOĞLU, M., ÖZEK, T., BAŞER, K.H.C., The Isolation of Some Soluble and Dispersed Materials of Oregano Water, The 4th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (SCNC), Isparta, Turkey, 6-8 Haziran (2001).

BRUNO, T. J., ELY, J. P., Supercritical Fluid Technology: Reviews in Modern Theory and Applications, Boca Raton, CRC Press, FL, U.S.A. (1991).

BUCKINGHAM, J., (Executive Ed.), Dictionary of Natural Products, Cilt 4, 1. Baskı, Chapman&Hall, Londra (1994).

CAI, J., LIU, B., SU, Q., Comparison of Simultaneous Distillation Extraction and Solid-Phase Microextraction for the Determination of Volatile Flavor Components, J. Chromatogr. A, 930, 1-7 (2001).

CALABRÒ, V., JIAO, B. L., DRIOLI, E., Theoretical and Experimental Study on Membrane Distillation in the Concentration of Orange Juice, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 33, 1803-1808 (1994).

CAMEL, V., Recent Extraction Techniques for Solid Matrices-Supercritical Fluid Extraction, Pressurized Fluid Extraction and Microwave-Assisted Extraction: Their Potential and Pitfalls, *Analyst*, 126, 1182-1193 (2001).

CARLINI, E. A., DE OLIVEIRA, A. B., DE OLIVEIRA, G. G., Psychopharmacological Effects of the Essential Oil Fraction and of the Hydrolate Obtained from the Seeds of *Licaria puchury-major*, *J. Ethnopharmacol.*, 8, 225-236 (1983).

CARSON, J. F., WONG, F. F., The Volatile Flavor Components of Onions, *J. Agr. Food Chem.*, 9, 140-143 (1961).

CARVALHO, A. F. U., MELO, V. M. M., CRAVEIRO, A. A., MACHADO, M. I. L., BANTIM M. B., RABELO E. F., Larvicidal Activity of the Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn., *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 569-571 (2003).

CATTY, S., Hydrosols: The Missing Link, Science and Emotion, Proceedings of the 3rd Aromatherapy Conference on Therapeutic Uses of Essential Oils, Kurt Schnaubelt (ed.), San Francisco, 30 Ekim-1 Kasım (1998).

CHARBIT, G., CHARBIT, F., MOLINA, C., Study of Mass Transfer Limitations in the Deterpenation of Waste Waters by Pervaporation, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 30, 382-387 (1997).

CHEREMISINOFF, N. P., Liquid Filtration, 2. Baskı, Butterworth-Heinemann, U.S.A. (1998).

CHISTIAKOVA, L. M., Technology for Preparing Concentrates of Mint and Rose Aromatic Waters, *Farmatsevtichnyi Zhurnal*, 3, 39-40 (1978).

CLARK, R. G., CRONIN, D. A., The Use of Activated Charcoal for the Concentration and Analysis of Headspace Vapours Containing Food Aroma Volatiles, *J. Sci. Food Agric.*, 26, 1615-1624 (1975).

- CLARK, T. J., BUNCH, J. E., Qualitative and Quantitative Analysis of Flavor Additives on Tobacco Products Using SPME-GC-Mass Spectroscopy, *J. Agr. Food Chem.*, 45, 844-849 (1997).
- CROSS, R. A., STRATHMANN, H., Barrier Separation Processes. In: *An Introduction to Separation Science*, Karger, B. L., Snyder, L. R., Horwath, C. (eds.), John Wiley&Sons, New York, (1973).
- CURTIS, T., WILLIAMS, D. G., *Introduction to Perfumery*, pp. 220-221, Ellis Horwood, New York (1994).
- DAVIS, P. H., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Volume Seven, 297-313, Edinburgh University Press (1982).
- DEMOLE, E., ENGGIST, P., OHLOFF, G., 1-p-Menthene-8-thiol: A Powerful Flavor Impact Constituent of Grapefruit Juice (*Citrus paradisi* Macfayden), *Helv. Chim. Acta*, 65, 1785-1794 (1982).
- DENNY, E. F. K., *Hydro-Distillation of Oils from Aromatic Herbs*, *Perf. & Flav.*, Vol. 14, 57-63 (1989).
- DESHPANDE, S. S., BOLIN, H. R., SALUNKHE, D. K., Freeze Concentration of Fruit Juices, *Food Technol.*, 36, 68-82 (1982).
- DESMUKH, S. W., PANGARKAR, V. G., Recovery of Organic Chemicals from Effluents by Adsorption over Polymeric Adsorbents, *Ind. Chem. Engr.*, 26, 35-38 (1984).
- DI GIACOMO, G., BRANDANI, V., DEL RE, G., MUCCIANTE, V., Solubility of Essential Oil Components in Compressed Supercritical Carbon Dioxide, *Fluid Phase Equilib.*, 52, 405-411 (1989).
- DÍAZ-MORETO, M. C., PÉREZ-COELLO, M. S., CABEZUDO, M. D., Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Volatiles from Spices, Comparison with Simultaneous Distillation-Extraction, *J. Chromatogr. A*, 947, 23-29 (2002).
- DUMAN, H., AYTAÇ, Z., EKİCİ, M., KARAVELİOĞULLARI, F. A., DÖNMEZ, A., DURAN, A., Three New Species (Labiatae) from Turkey , *Flora Mediterranea*, 5, 221-228 (1995).

- EBRAHIM, S., BOU-HAMED, S., ABDEL-JAWAD, M., BURNEY, N., Microfiltration System as a Pretreatment for RO Units: Technical and Economic Assessment, *Desalination*, 109, 165-175 (1997).
- EDRIS, A. E., GIRGIS, B. S., FADEL, H. H. M., Recovery of Volatile Aroma Components from Aqueous Waste Streams using an Activated Carbon Column, *Food Chem.*, 82, 195-202 (2003).
- EISERT, R., PAWLISZYN, J., New Trends in Solid-Phase Microextraction, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 27, 103-135 (1997).
- EL-GAMMAL, S. Y., Extraction of Volatile Oils Throughout History, *Hamdard, Cilt 34*, 57-80 (1991).
- ELLERBE, R. W., Steam-Distillation Basics, *Chem. Eng.*, 105-112 (1974).
- ERICSON, A. P., MATTHEWS, R. F., TEIXEIRA, A. A., MOYE, H. A., Recovery of Graperuit Oil Constituents from Processing Waste Water Using Styrene-divinylbenzene Resins, *J. Food Sci.*, 57, 186-189 (1992).
- ESKILSSON, C. S., BJÖRKLUND, E., Analytical Scale Microwave-Assisted Extraction, *J. Chromatogr. A*, 902, 227-250 (2000).
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4th Edition, Council of Europe, Strasbourg, (2002).
- EVANS, W. C., Trease and Evans, *Pharmacognosy*, Fifteenth Edition, pp. 264-266, W. B. Saunders, Edinburgh (2002).
- EYKAMP, W., STEEN, J., Ultrafiltration and Reverse Osmosis. In: *Handbok of Separation Process Technology*, Rousseau, R. W. (ed.), John Wiley&Sons, New York (1987).
- FABRE, C. E., BLANC, P. J., SOUCHON, I., VOILLEY, A., Extraction of 2-Phenylethyl Alcohol, *Perf.& Flav.*, 21, 27-40 (1996).
- FAVRE, E., NGUYEN, Q. T., Extraction of 1-Butanol from Aqueous Solutions by Pervaporation, *J. Chem. Technol. Biot.*, 65, 221-228 (1996).
- FENG, X., HUANG, R. Y. M., Liquid Separation by Membrane Pervaporation: A Review, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 36, 1048-1066 (1997).

FICHAN, I., LARROCHE, C., GROS, J. B., Water Solubility, Vapor Pressure and Activity Coefficients of Terpenes and Terpenoids, J. Chem. Eng. Data, 44, 56-62 (1999).

FLEISHER, A. FLEISHER, Z., The Essential Oil of Annual *Carum carvi* L. Grown in Israel. In: *Flavors and Fragrances: A World Perspective*, B. M. Lawrence, B. Mookherjee and B. J. Willis (edits.), Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam (1988).

FLEISHER, A., A New Method for Oil Recovery from Distillation Water, IXth International Congress of Essential Oils, Flavors & Fragrances, Singapore, 13-17 Mart (1983).

FLEISHER, A., *Citrus* Hydrocarbon-Free Essential Oils, Perf. & Flav., 19, 11-15 (1994).

FLEISHER, A., Essential Oils from Two Varieties of *Ocimum basilicum* L. Grown in Israel, J. Sci. Food Agr., 32, 1119-1122 (1981).

FLEISHER, A., FLEISHER, Z., Yield and Quality of Essential Oil from *Pelargonium graveolens* Cultivated in Israel, J. Sci. Food Agr., 36, 1047-1050 (1985)

FLEISHER, A., The Poroplast Extraction Technique in The Flavor and Fragrance Industry, Perf. & Flav., 15, 27-35 (1990).

FLEISHER, A., Water- Soluble Fractions of The Essential Oils, Perf. & Flav., 16, 37-41 (1991).

FOSTER, P. J., BURGOYNE, A., VAHDATI, M. M., Improved Process Topology for Membrane Distillation, Separ. Purif. Technol., 21, 205-217 (2001).

FREISER, H., Solvent Extraction. In: *An Introduction to Separation Science*, Karger, B. L., Snyder, L. R., Horwath, C. (edits.), John Wiley and Sons, New York (1973).

FRITZ, J. S., MACKA, M., Solid-Phase Trapping of Solutes for Further Chromatographic or Electrophoretic Analysis (Review), J. Chromatogr. A, 902, 137-166 (2000).

- GALLORI, S., FLAMINI, G., BILIA, A. R., MORELLI, I., LANDINI, A., VINCIERI, F. F., Chemical Composition of Some Traditional Herbal Drug Preparations: Essential Oil and Aromatic Water of Costmary (*Balsamita suaveolens* Pers.), J. Agric. Food Chem., 49, 5907-5910 (2001).
- GÁMIZ-GRACIA, L., LUQUE DE CASTRO, M. D., Continuous Subcritical Water Extraction of Medicinal Plant Essential Oil: Comparison with Conventional Techniques, Talanta, 51, 1179-1185 (2000).
- GANG, L., QIONGHUA, L., PANSHENG, L., Break-Down of Liquid Membrane Emulsion under High Electric Field, J. Membrane Sci., 128, 1-6 (1997).
- GANZLER, K., SALGÓ, A., VALKÓ, K., Microwave Extraction : A Novel Sample Preparation Method for Chromatography, J. Chromatogr. A, 371, 299-306 (1986).
- GARG, S.N., AGARWAL, S.K., New Monoterpene Diols from Essential Oil of *Ferula jaeschkeana*, Phytochemistry, 27, 936-937 (1988).
- GIRARD, B., FUKUMOTO, L. R., Membrane Processing of Fruit Juices and Beverages: A Review, Crit. Rev. Biotechnol., 20, 109-175 (2000).
- GODEFROT, M., SANDRA, P., VERZELE, M., New Method for Quantitative Essential Oil Analysis, J. Chromatogr. A, 203, 325-335 (1981).
- GODINO, P., PEÑA, L., MENGUAL, J. I., Membrane Distillation: Theory and Experiments, J. Membrane Sci., 121, 83-93 (1996).
- GOKHALE, N. N., The Distillation Waters, Indian Perfumer, 3, 95-97 (1959).
- GOODARZANIA, I., EIKANI, M. H., Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Essential Oils: Modelling and Simulation, Chem. Eng. Sci., 53, 1387-1395 (1998).
- GRYTA, M., KARAKULSKI, K., The Application of Membrane Distillation for the Concentration of Oil-Water Emulsions, Desalination, 121, 23-29 (1999).
- GRYTA, M., TOMASZEWSKA, M., Heat Transport in the Membrane Distillation Process, J. Membrane Sci., 144, 211-222 (1998).
- GUENTHER, E., The Essential Oils, Ciltler I-VI, Robert E. Krieger Publishing Co., Inc., Malabar, Florida (1948).

GÜNER, A., ÖZHATAY, N., EKİM, T., BAŞER, K. H. C., Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement 2), 11. Cilt, Royal Botanic Garden, Edinburg, (2000).

GÜRBÜZ, O., Gaz Kromatografisinde Katı-Faz Mikroekstraksiyon Tekniği (Derleme), Gıda, 40-42 (1998).

GÜVEN, K. C. Tıbbi ve Kozmetik Formüller, 10. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul (2001).

HAMM, W., Liquid-Liquid Extraction in the Food Industry. In: Handbook of Solvent Extraction, Lo, T. C., Baird, M. H. I., Hanson, C. (edits.), John Wiley and Sons, U.S.A. (1983).

HAWTHORNE, S. B., RICKKOLA, M.-J., SCRENIUS, K., HOLM, Y., HILTUNEN, R., HARTONEN, K., Comparison of Hydrodistillation and Supercritical Fluid Extraction for the Determination of Essential Oils in Aromatic Plants, J. Chromatogr. A, 634, 297-308 (1993).

HEATH, H. B., Source Book of Flavors, The Avi Publishing Company Inc., Westport, Connecticut, U.S.A. (1981).

HENNION, M.-C., Graphitized Carbons for Solid Phase Extraction (Review), J. Chromatogr. A., 885, 73-95 (2000).

HOLT, R. U., Mechanisms Effecting Analysis of Volatile Flavour Components by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography, J. Chromatogr. A, 937, 107-114 (2001).

HUCK, C. W., BONN, G. K., Recent Developments in Polymer-Based Sorbents for Solid Phase Extraction (Review), J. Chromatogr. A, 885, 51-72 (2000).

HUMPHREY, J. L., KELLER II, G. E., Separation Process Technology, pp. 225-393, McGraw-Hill, U.S.A. (1997).

HUTCHINS, R. A., Activated-Carbon Systems for Separation of Liquids. In: Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers, Philip A. Schweitzer (ed.), 3. Baskı, Mc Graw-Hill, New York (1997).

IBÁÑEZ, E., LÓPEZ-SEBASTIÁN, S., RAMOS, E., TABERA, J., REGLERO, G., Analysis of Volatile Fruit Components by Headspace Solid-Phase Microextraction, *Food Chem.*, 63, 281-286 (1998).

IETSWAART, J. H., A Taxonomic Revision of The Genus *Origanum* (Labiatae), Leiden University Press, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague (1980).

ISMAN, M. B., Plant Essential Oils for Pest and Disease Management, *Crop Prot.*, 19, 603-608 (2000).

İBRAHİM, Y. K. E., OGUNMODEDE, M. S., Growth and Survival of *Pseudomonas aeruginosa* in Some Aromatic Waters, *Pharm. Acta Helv.* 66, 286-288 (1991).

İZGÜ, E., Genel ve Endüstriyel Farmasi, Ayyıldız Matbaası, Ankara (1973).

JANDA, V., KRIJT, K., Recovery of Phenols from Water by continuous Steam Distillation- Extraction, *J. Chromatogr. A*, 283, 309-314 (1984).

JAYATILACA, A., POOLE, S. K., POOLE, C. F., CHICHILA, T. M. P., Simultaneous Micro Steam Distillation/Solvent Extraction for the Isolation of Semivolatile Flavor Compounds from Cinnamon and Their Separation by Series Coupled-Column Gas Chromatography, *Anal. Chim. Acta*, 302, 147-162 (1995).

JEANNOT, V., CHAHBOUN, J., RUSSEL, D., CASABIANCA, H., *Origanum compactum* Bentham: Composition of the Hydrolat Aromatic Fraction, Comparison with the Essential Oil and its Interest in Aromatherapy, *International Journal of Aromatherapy*, 13, 90-94 (2003).

JENNINGS, W. G., NURSTEN, H. E., Gas Chromatographic Analysis of Dilute Aqueous Systems, *Anal. Chem.*, 39, 521-523 (1967).

JIMÉNEZ-CARMONA, M. M., UBERA, J. L., LUQUE DE CASTRO, M. D., Comparison of Continuous Subcritical Water Extraction and Hydrodistillation of Marjoram Essential Oil, *J. Chromatogr. A*, 855, 625-632 (1999).

JOGDEO, D. A., NIRANJAN, K., PANGARKAR, V. G., Recovery of Allyl Isothiocyanate from Steam Distillation Condensate using Adsorption, *J. Chem. Technol. Biot.*, 75, 673-680 (2000).

- JONES, G. R., OLDHAM, N. J., Pheromone Analysis Using Capillary Gas Chromatographic Techniques (Review), *J. Chromatogr. A*, 843, 199–236 (1999).
- JÖNSSON, J. Å., MATHIASSEN, L., Membrane-Based Techniques for Sample Enrichment (Review), *J. Chromatogr. A*, 902, 205–225 (2000).
- JUNTING, L., CHENG PENG, C., SUZUKI, O., Solid-Phase Microextraction (SPME) of Drugs and Poisons from Biological Samples, *Forensic Sci. Int.*, 97, 93–100 (1998).
- KANPUR, U.P., Essential Oils, Development of Essential Oil Industry in Uttar Pradesh, Harcourt Butler Technological Institute (1958).
- KARLSSON, H. O. E., TRÄGÅRDH, G., Aroma Compound Recovery with Pervaporation-Feed Flow Effects, *J. Membrane Sci.*, 81, 163–171 (1993).
- KARLSSON, H. O. E., TRÄGÅRDH, G., Aroma Recovery During Beverage Processing, *J. Food Eng.*, 34, 159–178 (1997).
- KARLSSON, H. O. E., TRÄGÅRDH, G., OLSSON, J., The Performance of Pervaporative Aroma Recovery Units: Process Simulations, *Separ. Sci. Technol.*, 33, 1629–1652 (1998).
- KATAOKA, H., LORD, H. L., PAWLISZYN, J., Applications of Solid-Phase Microextraction in Food Analysis (Review), *J. Chromatogr. A*, 880, 35–62 (2000).
- KEPNER, R. E., VAN STRATEN, S., WEURMAN, C., Freeze Concentration of Volatile Components in Dilute Aqueous Solutions, *J. Agr. Food Chem.*, 17, 1123–1127 (1969).
- KEURENTJEZ, J. T. F., NABUURS, L. J. W. M., VEGTER, E. A., Liquid Membrane Technology for the Separation of Racemic Mixtures, *J. Membrane Sci.*, 113, 351–360 (1996).
- KIRIMER, N., ARSLANDERE, Ö., BAŞER, K. H. C., Yağaltı Sularının Kimyasal Bileşimi, XIV. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (XIV. BİHAT), Eskişehir, 29–31 Mayıs (2002).
- KIRIMER, N., BOYDAĞ, İ., SARGIN, N., ARSLANDERE, Ö., Ticareti Yapılan *Origanum* Türlerinin Doğadaki Durumu, Proje No: TBAG-DPT.Ç.Sek/10 (101T012), Eskişehir, Ağustos (2003).

KOBAYASHI, S., LEE, G. F., Freeze Concentration of Dilute Aqueous Solutions, Anal. Chem., 36, 2197-2198 (1964)

KOEDAM, A., The Influence of Some Distillation Conditions On Essential Oil Composition in Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects (eds. Margaris, N., Koedam, A., Vokou, D.), Proceedings of an International Symposium on Aromatic Plants, organized by the Laboratory of Ecology, pp. 229-236, University of Thessaloniki, Yunanistan, 14-19 Eylül (1981).

KORTING, H. C., SCHAFER-KORTING, M., HART, H., LAUX, P., SCHMID, M., Anti-inflammatory Activity of *Hammamelis* Distillate Applied Topically to the Skin. Influence of Vehicle and Dose, Eur. J. Clin. Pharmacol., 44, 315-318 (1993).

KOVAČEVIČ, M., KĂC, M., Solid-Phase Microextraction of Hop Volatiles, Potential Use for Determination and Verification of Hop Varieties, J. Chromatogr. A, 918, 159-167 (2001).

KOZHIN, S., FLEISHER, A., SMIRNOV, A., A Method for Recovery of Essential Oils from Distillation Waters, Patent #136790/28-13 from October 6 (1969): Otkrytija, Isobretenija, 6, 212-213 (1972a).

KOZHIN, S., FLEISHER, A., SMIRNOV, A., A Method for Recovery of Essential Oils from Distillation Waters, Maslo-zhirovaja Promishlennost, 3, 43-44 (1972b).

KOZHIN, S., FLEISHER, A., SMIRNOV, A., Recovery of Essential Oils under Field Conditions, Rastitielnie Resursi, 8, 279-282 (1972c).

KOZIEL, J., JIA, M., KHALED, A., NOAH, J., PAWLISZYN, J., Field Air Analysis with SPME Device, Anal. Chim. Acta, 400, 153-162 (1999).

KRINGS, U., KELCH, M., BERGER, R. G., Adsorbents for the Recovery of Aroma Compounds in Fermentation Processes, J. Chem. Technol. Biot., 58, 293-299 (1993).

KRÜGER, H., ZEIGER, B., Evaluation of a Fennel Collection by Classical Extraction and Solid-Phase Microextraction Headspace Analysis, pp. 160-163, Franz, Ch., Mathe, A., Buchbauer (eds.), Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils, Viyana (1996).

KU, Y., LEE, K. C., Removal of Phenols from Aqueous Solution by XAD-4 Resin, *J. Hazard. Mater.*, B80, 59-68 (2000).

KUBECZKA, K.-H., New Approaches in Essential Oil Analysis using Polymer-Coated Silica Fibers, *Essential oils: Basic and Applied Research*, pp. 139-146, Franz, Ch., Mathe, A., Buchbauer (edits.), *Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils*, Viyana (1996).

KUBECZKA, K.-H., PROTZEN, J. -A., Investigations of Tea Infusions and Distillation Waters Using Solid-Phase Microextraction (SPME) Technique, *Essential Oils: Basic and Applied Research*, pp. 157-159, *Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils*, Ch. Franz, Á. Máthé, G. Buchbauer(edits.), Viyana, Avusturya, 8-11 Eylül (1996).

KUNKAR, A. BAŞER, K. H. C., TANRIVERDİ, H., Narenciye Ürünleri Teknolojileri-I, *TAB Bülteni*, 7-8, 19-26 (1993a).

KUNKAR, A. KUNKAR, C., BAŞER, K. H. C., TANRIVERDİ, H., Narenciye Ürünleri Teknolojileri-II, *TAB Bülteni*, 9, 39-42 (1993b).

KUNKAR, A. KUNKAR, C., BAŞER, K. H. C., TANRIVERDİ, H., Narenciye Ürünleri Teknolojileri-III, *TAB Bülteni*, 10, 31-39 (1994).

KUNZ, W., BENHABILES, A., BEN-AÏM, R., Osmotic Evaporation through Macroporous Hydrophobic Membranes: A survey of Current Research and Applications, *J. Membrane Sci.*, 121, 25-36 (1996).

LAGANÀ, F., BARBIERI, G., DRIOLI, E., Direct Contact Membrane Distillation:Modelling and Concentration Experiments, *J. Membrane Sci.*, 166, 1-11 (2000).

LAMER, T., SPINNLER, H. E., SOUCHON, I., VOILLEY, A., Extraction of Benzaldehyde from Fermentation Broth by Pervaporation, *Process Biochem.*, 31, 533-542 (1996).

LAWRENCE, B. M., REYNOLDS, R. J., The Botanical and Chemical Aspects of Oregano, *Perf. & Flav.*, 9, 41-44 (1984).

- LAWRENCE, B. M., The Isolation of Aromatic Materials from Natural Plant Products, K.Tuley de Silva (ed.) A Manual on The Essential Oil Industry, Eskişehir, (1995).
- LAWSON, K. W., LLOYD, D. R., Membrane Distillation (Review), J. Membrane Sci., 124, 1-25 (1997).
- LEÓN-GONZÁLEZ, M. E., PÉREZ-ARRIBAS, L. V., Chemically Modified Polymeric Sorbents for Sample Preconcentration (Review), J. Chromatogr. A, 902, 3-16 (2000).
- LEPANE, V., Comparison of XAD Resins for the Isolation of Humic Substances from Seawater, J. Chromatogr. A, 845, 329-335 (1999).
- LIPNIZKI, F., FIELD, R. W., TEN, P.-K., Pervaporation-Based Hybrid Process: A Review of Process Design, Applications and Economics, J. Membrane Sci., 153, 183-210 (1999).
- LIS-BALCHIN, M., STEYRL, H., KRENN, E., The Comparative Effect of Novel *Pelargonium* Essential Oils and Their Corresponding Hydrosols as Antimicrobial Agents in a Model Food System, Phytother. Res., 17, 60-65 (2003).
- LIŠKA, I., Fifty Years of Solid-Phase Extraction in Water Analysis-Historical Development and Overview (Review), J. Chromatogr. A, 885, 3-16 (2000).
- LIU, J., HARA, K., KASHIMURA, S., KASHIWAGI, M., HAMANAKA, T., MIYOSHI, A., Kageura, M., Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Screening for Volatile Hydrocarbons in Blood, J. Chromatogr. B, 748, 401–406 (2000).
- LORD, H. L., PAWLISZYN, J., Recent Advances in Solid-Phase Microextraction, LC GC-Mag. Sep. Sci., 11, 776-785 (1998).
- LORD, H., PAWLISZYN, J., Evolution of Solid-Phase Microextraction Technology (Review), J. Chromatogr. A, 885, 153-193 (2000a).
- LORD, H., PAWLISZYN, J., Microextraction of Drugs (Review), J. Chromatogr. A, 902, 17-63 (2000b).

LUQUE DE CASTRO, M. D., JIMÉNEZ-CARMONA, M. M., FERNÁNDEZ-PERÉZ, V., Towards More Rational Techniques for the Isolation of Valuable Essential Oils from Plants, Trends Anal. Chem., 18, 708-716 (1999).

LUQUE DE CASTRO, M. D., PAPAEFSTATHIOU, I., Analytical Pervaporation: A New Separation Technique, Trends Anal. Chem., 17, 41-49 (1998).

MACHALE, K. W., NIRANJAN, K., PANGARKAR, V. G., Recovery of Dissolved Essential Oils from Condensate Waters of Basil and *Mentha arvensis* Distillation, J. Chem. Tech. Biotechnol., 69, 362-366 (1997)

MAHINDRU, S. N., Indian Plant Perfumes, Metropolitan Book Co., Nirula Printers, Yeni Delhi (1992).

MAIGNIAL, L., PIBAROT, P., BONETTI, G., CHAINTREAU, MARION, J. P., Simultaneous Distillation-Extraction Under Static Vacuum: An Isolation of Volatile Compounds at Room Temperature, J. Chromatogr. A, 606, 87-94 (1992).

MANSOURI, J, FANE, A. G., Osmotic Distillation of Oily Feeds, J. Membrane Sci., 153, 103-120 (1999).

MARTÍNEZ-DÍEZ, L., VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, M. I., Temperature and Concentration Polarization in Membrane Distillation of Aqueous Salt Solutions, J. Membrane Sci., 156, 265-273 (1999).

MATHYS, R. G., HEINZELMANN, WITHOLT, B., Separation of Higher Molecular Weight Organic Compounds by Pervaporation, Chem. Eng. J., 67, 191-197 (1997).

MAUZ, M., KIMMERLE, K., HÜLSER, D. F., Concentration of Native Etheric Oil Aroma Components by Pervaporation, J. Membrane Sci., 118, 145-150 (1996).

MILLER, M. E., STUART, J. D., Comparison of Gas-Sampled and SPME-Sampled Static Headspace for the Determination of Volatile Flavor Components, Anal. Chem., 71, 23-27 (1999).

- MILLS, G. A., WALKER, V., Headspace Solid-Phase Microextraction Procedures for Gas Chromatographic Analysis of Biological Fluids and Materials (Review), *J. Chromatogr. A*, 902, 267-287 (2000).
- MOLINA, C., STEINCHEN, CHARBIT, G., CHARBIT, F., Model for Pervaporation: Application to Ethanolic Solutions of Aroma, *J. Membrane Sci.*, 132, 119-129 (1997).
- MOOKHERJEE, B. D., PATEL, S. M., TRENKLE, R. W., WILSON, R. A., A Novel Technology to Study the Emission of Fragrance from the Skin, *Perf. & Flav.*, 23, 1-11 (1998).
- MOYLER, D. A., STEPHENS, M. A., Counter Current Deterpenation of Cold Pressed Sweet Orange Peel Oil, *Perf. & Flav.*, 17, 37-38 (1992).
- MULLER, J. G., Freeze Concentration of Food Liquids: Theory, Practice, and Economics, *Food Technol.*, 21, 49-61 (1967).
- MÜLLER, P. M., LAMPARSKY, D., *Perfumes, Art, Science and Technology*, Elsevier Applied Science, London (1991).
- NAMIEŚNIK, J., ZYGMUNT, B., ANNA JASTRZĘBSKA, Application of Solid-Phase Microextraction for Determination of Organic Vapours in Gaseous Matrices, *J. Chromatogr. A*, 885, 405-418 (2000).
- NILSSON, U. J., Solid Phase Extraction for Combinatorial Libraries (Review), *J. Chromatogr. A*, 885, 305-319 (2000).
- NÚÑEZ, A. J., BEMELMANS, J. M. H., Recoveries from an Aqueous Model System Using a Semi-Micro Steam Distillation-Solvent Extraction Procedure, *J. Chromatogr.*, 294, 361-365 (1984).
- OTTE, S., Essential Oils-Rediscovered Remedies, Dragoco Report, Flavoring Information Service, 3, 91-110 (1994).
- OZEL, M. Z., GOGUS, F., LEWIS, A. C., Subcritical Water Extraction of Essential Oils from *Thymbra spicata*, *Food Chem.*, 82, 381-386 (2003).
- PAWLISZYN, J., *Solid Phase Microextraction, Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York (1997).

PETROTOS, K. B., LAZARIDES, H. N., Osmotic Concentration of Liquid Foods, *J. Food Eng.*, 49, 201-206 (2001).

POLLIEN, P., OTT, A., FAY, L. B., MAIGNIAL, L., CHAINTREAU, A., Simultaneous distillation-extraction: Preparative Recovery of Volatiles under Mild Conditions in Batch or Continuous Operations, *Flavour and Fragr. J.*, 13, 413-423 (1998).

POOLE, C. F., GUNATILLEKA, A. D., SETHURAMAN, R., Contributions of Theory to Method Development in Solid-Phase Extraction (Review), *J. Chromatogr. A*, 885, 17-39 (2000).

POOLE, C. F., SCHUETTE, S. A., Contemporary Practice of Chromatography, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1984).

PORTER, M. C., Membrane Filtration. In: Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers, Third Edition, Schweitzer, P. A. (ed.), pp. 3-101, McGraw-Hill, New York (1997).

PROSEN, H., ZUPANČIČ-KRALJ, L., Solid-Phase Microextraction, *Trends Anal. Chem.*, 18, 272-282 (1999).

RADULESCU, V., CHILIMENT, S., OPREA, E., Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Volatile and Semi-Volatile Compounds of *Salvia officinalis*, *J. Chromatogr. A*, 1027, 121-126 (2004).

RAJESWARA RAO, B. R., KAUL, P. N., SYAMASUNDAR, K. V., RAMESH S., Comparative Composition of Decanted and Recovered Essential Oils of *Eucalyptus citriodora* Hook, *Flavour Fragr. J.*, 18, 133-135 (2003).

RAJESWARA RAO, B. R., KAUL, P. N., SYAMASUNDAR, K. V., RAMESH, S., Water Soluble Fractions of Rose Scented Geranium (*Pelargonium* species) essential oil, *Bioresource Technol.*, 84, 243-246 (2002).

RAMTEKE, R. S., SINGH, N. I., REKHA, M. N., EIPESON, W. E., Methods for Concentration of Fruit Juices: A Critical Evaluation, *J. Food Sci. Technol.*, 30, 391-402 (1993).

RENNBERG, L., Determination of Volatile Halogenated Hydrocarbons in Water with XAD-4 Resin, *Anal. Chem.*, 50, 1836-1838 (1978).

- REVERCHON, E., Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Essential Oils and Related Products, *J. Supercrit. Fluid.*, 10, 1-37 (1997).
- REXWINKEL, G. HEESINK, B. B. M., VAN SWAAIJ, W. P. M., Adsorption of Halogenated Hydrocarbons from Aqueous Solutions by Wetted and Nonwetted Hydrophobic and Hydrophilic Sorbents: Equilibria, *J. Chem. Eng. Data*, 44, 1139-1145 (1999).
- ROCHAT, D., RAMIREZ-LUCAS, P., MALOSSE, C., ALDANA, R., KAKUL, T., MORIN, J.-P., Role of Solid-Phase Microextraction in the Identification of Highly Volatile Pheromones of Two Rhinoceros Beetles *Scapanes australis* and *Strategus aloeus* (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae), *J. Chromatogr. A*, 885, 433-444 (2000).
- ROLLET, M., CUISINAUD, G., MONGHAL, M. A., Contribution to the Study of Aromatic Distilled Rose Water. II. Isolation and Characterization of Pentane Extracts, *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 25, 713-716 (1967).
- ROLLET, M., MONGHAL, M. A., Contribution to the Study of Aromatic Distilled Rose Water. I. General Quantitative Results by Gas Chromatography of Their Pentane Extracts, *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 25, 705-712 (1967).
- ROSBURG, R., Ultrafiltration (New Technology), A Viable Cost-Saving Pretreatment for Reverse Osmosis and Nanofiltration- A New Approach to Reduce Costs, *Desalination*, 10, 107-114 (1997).
- ROSSUM, P. V., WEBB, R. G., Isolation of Organic Water Pollutants by XAD Resins and Carbon, *J. Chromatogr.*, 150, 381-392 (1978).
- ROVIO, S., HARTONEN, K., HOLM, Y., HILTUNEN, R., RIEKKOLA, M. L., Extraction of Clove Using Pressurized Hot Water, *Flavour Fragr. J.*, 14, 399-404 (1999).
- RYAN, J. P., FRITZ, J. S., Determination of Trace Organic Impurities in Water Using Thermal Desorption from XAD-4 Resin, *J. Chromatogr. Sci.*, Vol. 16, 488-492 (1978).
- SAĞDIÇ, O., ÖZCAN, M., Antibacterial Activity of Turkish Spice Hydrosols, *Food Control*, 14, 141-143 (2003).

SAĞDIÇ, O., Sensitivity of Four Pathogenic Bacteria to Turkish Tyme and Oregano Hydrosols, *Lebensm.-Wiss. U. -Technol.*, 36, 467-473 (2003).

SANDRA, P., BİCCHİ, C., Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis, Dr. Alfred Huethig Verlag, Heidelberg Basel, New York (1987).

SCHÄFER, T., BENGTSON, G., PINGEL, H., BÖDDEKER, K. W., CRESPO, J. P. S. G., Recovery of Aroma Compounds from a Wine-Must Fermentation by Organophilic Pervaporation, *Biotechnol. Bioeng.*, 62, 412-421 (1999).

SCHULTZ, T. H., FLATH, R. A., MON, T. R., EGGLING, S. B., TERANISHI, R., Isolation of Volatile Components from a Model System, *J. Agric. Food Chem.*, 25, 446-449 (1977).

SCOTT, K., Handbook of Industrial Membranes, Elsevier Science Publishers Ltd., U.K. (1995).

SCOTT, K., Industrial Membrane Separation Technology, Hughes, R., Blackie Academic & Professional, An Imprint of Chapman & Hall, Londra (1996).

SCRAMIN, S., SAITO, M. L., POTT, A., MARQUES, M. O. M., Volatile Constituents of *Hyptis crenata* Pohl (Labiatae) Native in Brazilian pantanal, *J. Essent. Oil Res.*, 12, 99-101 (2000).

SHABAN, H. I., Pervaporation Separation of Water from Organic Mixtures, *Separ. Purif. Technol.*, 11, 119-126 (1997).

SHABAN, H. I., RIAZI, M. R., SAHAR, R., Pervaporation of Alcohols from Hydrocarbon Mixtures, *Separ. Purif. Technol.*, 11, 113-118 (1997).

SHAPIRO, J., Concentration of Volatile Substances in Aqueous Solution and Production of Water Free of Organics by Freezing Out, *Anal. Chem.*, 39, 280 (1967).

SIEGMUND, B., LEITNER, E., MAYER, I., FARKAS, P., SADECKA, J., PFANNHAUSER, W., KOVAC, M., Investigations of the Extraction of Aroma Compounds using the Simultaneous Distillation-Extraction according to Likens-Nickerson, *Deut. Lebensm.-Rundsch.*, 92, 286-290 (1996).

SIMÁNDI, B., OSZAGYÁN, M., LEMBERKOVICZ, E., KÉRY, A., KASZÁCS, J., THYRION, F., MÁTYÁS, T., Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Fractionation of Oregano Oleoresin, *Food Res. Int.*, 31, 723-728 (1998).

SKELLAND, A. H. P., MENG, X. (M.), Non-Newtonian Conversion Solves Problems of Stability, Permeability, and Swelling in Emulsion Liquid Membranes, *J. Membrane Sci.*, 158, 1-15 (1999).

SMITH, G. H., TASKER, M. P., Freeze Concentration of Dilute Solutions, *Anal. Chim. Acta*, 33, 559-560 (1965).

SMITH, R. M., Before the Injection-Modern Methods of Sample Preparation for Separation Techniques (Review), *J. Chromatogr. A*, 1000, 3-27 (2003).

SMITH, R. M., Extractions with Superheated Water (Review), *J. Chromatogr. A*, 975, 31-46 (2002).

SMYRL, T. G., LEMAGUER, M., Solubilities of Terpenic Essential Oil Components in Aqueous Solutions, *J. Chem. Eng. Data*, 25, 150-152 (1980).

SNOW, N. H., Solid-Phase Microextraction of Drugs from Biological Matrices (Review), *J. Chromatogr. A*, 885, 445-455 (2000).

SOUCHON, I., ROJAS, J. A., VOILLEY, A., GREVILLOT, G., Trapping of Aromatic Compounds by Adsorption on Hydrophobic Sorbents, *Separ. Sci. Technol.*, 31 (18), 2473-2491 (1996).

SPENCER, J. S., Distillation Water Composition from the Field Distillation of Peppermint and Spearmint; A Time Study, 12 th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils, Viyana, Avusturya, 4-8 Ekim (1992).

STAERK, U., KULPMANN, W.R., High-Temperature Solid-Phase Microextraction Procedure for the Detection of Drugs by Gas Chromatography–Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 745, 399–411 (2000).

STEFFEN, A., PAWLISZYN, J., Analysis of Flavor Volatiles Using Headspace Solid-Phase Microextraction, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2187-2193 (1996).

STENZEL, M. H., Remove Organics by Activated Carbon Adsorption, *Chem. Eng. Prog.*, 36-43 (1993).

STRATHMANN, H., MCDONOGH, R. M., The Use of Pervaporation in Biotechnology. In: Membranes in Bioprocessing, J. A. Howell, V. Sanchez and R. W. Field (eds.), Chapman&Hall, Cambridge (1993).

TABATA, M., HONDA, G., SEZİK, E., A Report on Traditional Medicine and Medicinal Plants in Turkey (1986), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Mart (1988).

TAKAYANAGI, H., FUKUDA, J., MIYATA, E., Non-Ionic Adsorbents in Separation Processes. In: Downstream Processing of Natural Product, A Practical Handbook, Michael Verrall (ed.), John Wiley and Sons, Chichester (1996).

TANG, C. S., JENNINGS, W. G., Volatile Components of Apricot, J. Agr. Food Chem., 15, 24-28 (1967).

TARASEVICH, Y. I., Porous Structure and Adsorption properties of Natural Porous Coal, Colloid. Surface. A, 176, 267-272 (2001).

TATEDA, A., FRITZ, J. S., Mini-Column Procedure for Concentrating Organic Contaminants from Water, J. Chromatogr., 152, 329-340 (1978).

THAPA, B. B., Extraction of Essential Oil, National Workshop On Chemical Investigation and Processing of Aromatic Plants (Adhikary, S. R., Amatya, K. R., Thapa, B. B. eds.), pp. 71-81, Nepal, 11-18 Eylül, (1989).

THEODORIDIS, G., KOSTER, E. H. M., DE JONG, G. J., Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Biological Samples (Review), J. Chromatogr. B, 745, 49-82 (2000).

THURMAN, E. M., MILLS, M. S., Solid Phase Extraction, Principles and Practice, John Wiley&Sons, New York (1998).

TÜMEN, G., BAŞER, K. H. C., KIRIMER, N., The Essential Oils of Origanum Species: A Treatise, 13th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils, 200-210, AREP Publ, İstanbul, 15-19 Ekim (1995).

UDRIOT, H., ARAQUE, A., VON STOCKAR, U., Azeotropic Mixtures may be Broken by Membrane Distillation, Chem. Eng. J., 54, 87-93 (1994).

ULRICH, S., Solid-Phase Microextraction in Biomedical Analysis (Review), J. Chromatogr. A, 902, 167-194 (2000).

VARSHNEY, S. C., Efficiency of Steam Distillation System for Herbs, *Indian Perfumer*, 37, 63-67 (1993).

VERA-AVILA, L. E., GALLEGOS-PEREZ, J. L., CAMACHO-FRIAS, E., Frontal Analysis of Aqueous Phenol Solutions in Amberlite XAD-4 Columns, Implications on the Operation and Design of Solid Phase Extraction Systems, *Talanta*, 50, 509-526 (1999).

VERGHESE, J., On Essential Oils, Synthite Industrial Chemicals Private Ltd., Synthite Valley, S. T. Redd.& Sons, Hindistan (1986).

VON RECHENBERG, J., Theorie der Gewinnung und Trennung der ätherischen Öle durch Destillation, pp. 418-441, Selbstverlag von Schimmel & Co., Miltitz bei Leipzig (1910).

VON SCHANTZ, M., JUVONEN, S., Gaschromatographische Untersuchungen von aromatischen Wässern, *Arch. Pharm.*, 302. Bd., 775-787 (1969).

WANG, R.-C., KUO, C.-C., SHYU, C.-C., Adsorption of Phenols onto Granular Activated Carbon in a Liquid-Solid Fluidized Bed, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 68, 187-194 (1997).

WEIDENHAMER, J. D., MACIAS, F. A., FISCHER, N. H., WILLIAMSON, G. B., Just How Insoluble are Monoterpenes?, *J. Chem. Ecol.*, 19, 1799-1807 (1993).

WEURMAN, C., Isolation and Concentration of Volatiles in Food Odor Research, *J. Agr. Food Chem.*, 17, 370-384 (1969).

WIJESEKERA, R. O. B., Practical Manual On: The Essential Oil Industry, Agrotechnology, Processing, Quality Assessment, Thailand Institute of Scientific and Technological Research Press, Viyana, Avusturya (1992).

WILKINSON, J. M., HIPWELL, M., RYAN, T., CAVANAGH, H. M. A., Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and Antifungal Activity, *J. Agr. Food Chem.* 51, 76-81 (2003).

YALÇINDAĞ, O. N., Eczacılıkta Ekstraksiyon Metodları ve Bunlarla Hazırlanan Farmasötik Preparatlar, Berksoy Matbaası, İstanbul (1965).

YANG, X., PEPPARD, T., Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis, *J. Agr. Food Chem.*, 42, 1925-1930 (1994).

YENİEL, Ö., KIRIMER, N., KÜRKÇÜOĞLU, M., BAŞER, K. H. C., The Chemical Composition of Essential Oil and Distillation Waters (Hydrosols) of Some Lamiaceae Plants, 5th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (5th SCNC), Taşkent, Özbekistan, 20-23 Mayıs (2003).

ZABARAS, D., WYLLIE, S. G., Quantitative Analysis of Terpenoids in the Gas Phase Using Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME), *Flavour Fragr. J.*, 16, 411-416 (2001).

ZHANG, S. Q., MATSUURA, T., Recovery and Concentration of Flavor Compounds in Apple Essence by Pervaporation, *J. Food Process Eng.*, 14, 291-296 (1991).

ZHANG, S., DRIOLI, E., Pervaporation Membranes (Review), *Separ. Sci. Technol.*, 30, 1-31 (1995).

ZHANG, Z., PAWLISZYN, J., Head space Solid-Phase Microextraction, *Anal. Chem.*, 65, 1843-1852 (1993).

ZUKOV, D., ANDREEVICK, E., CHIPIGA, A., Technology and Equipment for Essential Oil Industry, Food Industry, Moskova (1979).