

T.C. ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU

**İşlenmiş Türk Çaylarında İşleme Yöntemi, Çay Sınıfı ve Sürgün
Döneminin Fenolik Madde Dağılımı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**

Prof. Dr. Sedat VELİOĞLU

Proje Numarası:

Başlama Tarihi:

Bitiş Tarihi:

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara-"2005"

İÇİNDEKİLER

SİMGELER DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
1. PROJENİN TÜRKÇE VE İNGİLİZCE ADI ve ÖZETLERİ.....	
2. AMAÇ VE KAPSAM.....	
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	
3.1. Materyal.....	
3.2. Yöntem.....	
3.2.1. Örnek Hazırlama (polifenol ekstraksiyonu).....	
3.2.2. Toplam Polifenol Tayini	
3.2.3. DPPH radikal assay yöntemiyle antioksidan aktivite tayini.....	
3.2.4. İndirgeme gücü yöntemiyle antioksidan aktivite tayini.....	
3.2.5. Antibakteriyel aktivite tayini.....	
3.2.6. İstatistik Analiz.....	
4. ANALİZ ve BULGULAR.....	
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	
5.1. Çay örneklerinin toplam polifenol miktarı.....	
5.2. Çay örneklerinin antioksidan aktivitesi.....	
5.2.1. İndirgeme gücü.....	
5.2.2. Radikal tutma kapasitesi.....	
5.3. Çay örneklerinin antibakteriyel aktivitesi.....	
6. KAYNAKLAR.....	

ii
SİMGELER DİZİNİ

Q3G	Kuarsetin-3-glukosid
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
K3RG	Kamferol-3-rutinosid
C	(+)-Kateşin
EC	(-)- Epikateşin
GC	(-)- Gallokateşin
EGC	(-)- Epigallokateşin
EGCG	(-)- Epigallokateşin gallat
EGC	(-)- Epikateşin gallat
Q3RG	Rutin
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
TF	Teaflavin
TF-f	Serbest Teaflavin
TF-3-G	Teaflavin-3-gallat
TF-3'-G	Teaflavin-3'-gallat
TF-3,3'-DG	Teaflavin-3,3'-digallat
Ka	Kuru ağırlık
Dw	Dry weight

ŞEKİLLER DİZİNİ

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1.

1. PROJENİN TÜRKÇE VE İNGİLİZCE ADI ve ÖZETLERİ

İşlenmiş Türk Çaylarında İşleme Yöntemi, Çay Sınıfı ve Sürgün Döneminin Fenolik Madde Dağılımı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

ÖZET

Bu çalışmada 3 farklı hasat döneminde (Mayıs, Temmuz ve Eylül) toplanan ve 2 ayrı işleme yöntemine göre (Ortodoks ve Çay-Kur) işlenen 7 sınıf çayın fenolik madde ve alkaloid yapısı tarafımızdan geliştirilen bir HPLC metodu ile belirlenmiş ve incelenen parametrelerin bu bileşiklerin miktar ve dağılımı, dolayısıyla çay kalitesi üzerine, etkisi ortaya konulmuştur. İncelenen örneklerde, başlıca alkaloid olarak kafein (17.51-26.26 mg/g ka) ve teobromin (0.14-0.21 mg /g ka) saptanmıştır. Fenolik bileşiklerden ise iki kateşin: epigallokateşin gallat (0.25-3.16 mg/g ka) and epikateşin gallat (0.16-2.54 mg/ g ka); bir flavonol glikozid: rutin (0.96-1.98 mg/g ka) ve dört teaflavin bileşiği: serbest teaflavin (1.21-4.34 mg/g ka), teaflavin-3-gallat (2.49-6.10 mg/g ka), teaflavin-3'-gallat (1.56-3.64 mg/g ka) ve teaflavin-3,3'-gallat (4.19-6.12 mg/g ka) saptanmıştır. Çayların alkaloid ve fenolik madde içerikleri kıvrırma prosesi, hasat dönemi ve çay sınıfından önemli ölçüde etkilenmiştir. Hasat dönemi ele alındığında en yüksek alkaloid ve fenolik madde içeriği Mayıs dönemi çaylarında belirlenmiştir, bunu sırasıyla Temmuz ve Eylül dönemi çayları izlemiştir. İşleme yöntemine göre ise Çay-Kur yöntemi ile üretilmiş çay örneklerinin içeriği Ortodoks yöntemine göre işlenenlerden daha yüksek bulunmuştur. Genel olarak, 1. ve 2. sınıf çayların alkaloid ve fenolik içerikleri daha yüksek bulunmuş olup 7. sınıf çaylar da bunlara yakın sonuç vermiştir. Çay örneklerinde sınıfların toplam fenolik madde miktarı (47.05-83.40 mg GAE/g ka) üzerine etkisi de yukarıdaki gibidir. Ulaşılan bulgular, siyah çay üretiminde kıvrırma prosesi, hasat dönemi ve çay sınıfının çayın alkaloid ve fenolik madde miktarını dolayısıyla kalitesini belirlemede çok önemli faktörler olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler : Siyah çay, alkaloid, fenolik madde, HPLC, kıvrırma, hasat, sınıf

Determination of the effects of processing methods, tea grade and flushing periods on phenolic composition of Turkish black teas.

ABSTRACT

According to rolling process (Orthodox and Çay-Kur) and harvesting period (May, July and September), alkaloids and phenolic compounds of black tea comprising seven grades were determined using a new HPLC method developed in this study. Total phenolics of teas were determined spectrophotometrically. A good separation for compounds analysed was achieved with the HPLC method developed. Caffeine (17.51-26.26 mg/ g dw) and theobromine (0.14-0.21 mg /g dw) were detected as the major alkaloids in tea samples. With respect to individual phenolic compounds: two catechins, epigallocatechin gallate (0.25-3.16mg/g dw) and epicatechin gallate(0.16-2.54mg/ g dw); one flavonol glycoside: rutin(0.96-1.98mg/g dw) and four theaflavin compounds: free theaflavin (1.21-4.34 mg/g dw), theaflavin-3-gallate (2.49-6.10 mg/g dw), theaflavin-3'-gallate (1.56-3.64 mg/g dw) and theaflavin-3,3'-gallate (4.19-6.12 mg/g dw) were found in the samples. The content of alkaloids and phenolics was affected significantly by the rolling process, harvesting period and tea grade. The highest level of each compound was found for tea samples manufactured by Çay-Kur rolling in harvesting period of May followed by July and September, respectively. In general, 1st. and 2nd grade teas had higher alkaloids and phenolics, followed by 7. grade ones. Similar trends were also observed for total phenolic content of teas (47.05-83.40mg GAE/g dw).The results obtained from this study suggested that in manufacturing black tea rolling process, harvesting period and tea grade were very important factors determining alkaloid and phenolics content of tea,so tea quality.

Keywords: Black tea, alkaloid, phenolics, HPLC, rolling, harvesting, grades

2- AMAÇ VE KAPSAM

Çay, dünyada en fazla tüketilen içecektir ve önemli bir tarım ürünüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda çayın sağlık üzerine olan pek çok olumlu etkisi ortaya konulmuştur. Bu etki çayın yapısında bulunan polifenollerden kaynaklanmaktadır (Manzocco et al. 1998). Siyah çayda bulunan polifenollerin büyük kısmını yeşil çaydaki kateşinlerin kompleks oksidasyon ürünü olan teaflavinler ve tearubijinler oluşturur (Pelillo et al. 2002). Çayda bulunan polifenollerin kuru çayın ağırlıkça %20-35'ini oluşturması (Sharma et al. 2005) çayın en önemli bileşenleri olduğunun da göstergesidir. Fenolik bileşiklerin çayın başlıca kalite parametrelerinden biri olduğu bilinmektedir (Yao et al. 2004, Borse et al. 2002). Klorojenik asit, kateşinler ve bunların türevleri çayın tadı (acılık ve burukluk gibi) üzerine etkili olup (Goto et al. 1996), teaflavinler çayın renginden önemli ölçüde sorumludur (Obanda et al. 2001, Wang et al. 2000) ve çayın pazar değerini belirlemede kriter olarak kullanılır (Wright et al. 2002). Polifenollerin son ürün olarak işlenmiş çaydaki miktarı başlıca yaprakların hasat edildiği sezona ve işleme yöntemine göre değişmektedir (Aherne ve O'Brien 2002, Zuo et al. 2002).

Son zamanlarda çay polifenollerinin sağlık üzerine etkilerinin ortaya konması ile birlikte çay fonksiyonel bir içecek özelliği kazanmıştır. Bu konuda yapılan çok sayıda araştırma ile çay polifenollerinin antioksidan (Luximon-Ramma et al. 2005, Mello et al. 2004), antimutajenik (Halder et al. 2005), antikarsinojenik (Han 1997) ve antibakteriyel (An et al. 2004) aktivite gibi çok sayıda farmakolojik özelliklerinin olduğu ortaya konmuştur. Yapılan bir çalışmada siyah çaydaki teaflavinlerin antioksidan aktivitesinin yeşil çaydaki kateşinlere eşit olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu sonuca göre, siyah çay üretiminde fermentasyon sırasında kateşinlerin teaflavinlere dönüşümünün bunların serbest radikal tutma yeteneğini değiştirmediği düşünülmektedir (Leung et al. 2001). 7 farklı marka İngiliz siyah çayının fenolik bileşenlerinin ve antioksidan aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada, siyah çayların İngiliz halkının günlük beslenmesi için tükettiği birçok besin maddesinden daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve mükemmel bir polifenol kaynağı olduğu gösterilmiştir (Rechner et al. 2002). Siyah çaydaki başlıca polifenolik bileşikler olan teaflavinler ve bunların gallat esterlerinin hidrofilik ve lipofilik fazlardaki antioksidan aktivitesi konusunda yapılan bir çalışmada teaflavin-3,3'-digallatin en fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu bunu sırasıyla teaflavin-3'-gallat, teaflavin-3-gallat ve teaflavinin izlediği tespit edilmiştir (Miller et al. 1996).

Çayın doğrudan tüketiminin yanı sıra son yıllarda, özellikle yeşil çaydan alkol ekstraksiyonu ile elde edilen ticari yeşil çay ekstraktlarının çeşitli fiziksel formlarda gıda antioksidanı, besin desteği, kozmetik katkı maddesi ve hatta ilaç olarak kullanılmaktadır (Wang et al. 2000). Çay polifenollerinin ekstraksiyonu amacıyla kaynar su (Liang et al. 2003; Obanda et al. 2001) ile metanol ve aseton gibi çeşitli organik solventler (Wang ve Helliwel 2001) kullanılmaktadır.

Günlük hayatımızda önemli bir yer tutan çay bitkisi, Doğu Karadeniz Bölgesinde Araklı'dan başlayıp Gürcistan sınırına kadar uzanan bölgede yetiştirilmektedir. Yıllık yeşil çay yaprağı üretimimiz ortalama 850.000-950.000 ton arasında olup, siyah çay üretimimiz 100.000-150.000 ton dolayındadır. Üretim 77.000 hektarlık bir arazide gerçekleştirilmekte ve yaklaşık 225.000 aile çay tarımı ile uğraşmaktadır. Dünya çay üretiminde üst sıralarda yer alan Türkiye'nin ihracatına bakıldığı zaman iyi bir konumda olmadığı görülebilir. Ortalama 100-150 bin ton siyah çay üreten ülkemizin siyah çay ihracatı ne yazık ki 5.000 ton/yıl' ı geçmemektedir. Rakamlar arasındaki bu tezat durum ülkemizin ciddi bir çay politikasına sahip olmadığını ve konu üzerinde gerekli araştırmaların bugüne kadar yapılmadığını göstermektedir.

Çay bitkisinin yapısında bulunan polifenoller içerdikleri doğal antioksidanlar sayesinde son on yılda üzerinde en çok çalışılan konu haline gelmişlerdir. Ancak ülkemizde henüz bu konu üzerinde yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu araştırma ile ülkemiz çayının polifenol profili ortaya çıkarılacak ve çay hasat döneminin, işleme yönteminin ve çay sınıfının (1-7. sınıflar) çay kalitesi üzerinde en önemli parametrelerden biri olan fenolik madde dağılımı üzerindeki etkisi ortaya konulacaktır. Elde edilecek sonuçlar uluslararası dergilerde yayımlatılarak, Türk çayının bu yolla dünyaya tanıtımı da sağlanmış olacaktır.

Bu proje kapsamında 3 farklı hasat döneminde, farklı kıvrırma prosesleriyle işlenmiş 7 farklı sınıfa ait çay örneklerinin polifenolik bileşikleri kolorimetrik yöntemle toplam fenolik bileşikler şeklinde belirlenmiştir. HPLC yöntemiyle ise bireysel fenolik bileşikler ve alkaloidler tanımlanarak miktarları tespit edilmiş ve çaydaki bu bileşenler üzerine hasat dönemi, sınıf farklılıkları ve kıvrırma yöntemlerinin etkisi belirlenmiştir. Gerçekleştirilen araştırma ile iç tüketime yönelik üretilen çayımızın en önemli kalite parametrelerine ilişkin veriler ortaya konularak, bu konudaki eksikliğimiz tamamlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Proje materyali olarak Doğu Karadeniz bölgesindeki farklı kıvrırma yöntemleriyle çay işleyen Melyat (Ortodoks yöntemi) ve Zihni Derin (Çay-Kur yöntemi) işletmelerinden sağlanan siyah çay örnekleri kullanılmıştır. Örnekler, farklı sürgün dönemlerinde (Mayıs-Temmuz-Eylül) toplanarak bu iki işletmede işlenmiş ve işletmelerde üretimde kullanılan Middleton elek sistemiyle 7 farklı sınıf (1-2-3-4-5-6-7) oluşturacak şekilde gruplara ayrılmıştır. Bu çaylardan 3 tekerrürlü olarak temin edilmiştir. Buna göre örnek sayısı 2 teknik x 3 sezon x 7 çay sınıfı x 3 tekerrür olmak üzere 126'dır. 1, 2 ve 3 numara çaylar "imalat kırığı çay" olarak adlandırılır. Bunlar kurutmadan çıkıp tasnife gelen ve herhangi bir kırma işlemine tabi tutulmadan elenen çaylardır. İmalat kırığı dışında kalan çayların mekanik olarak kırılıp, tekrar elenmesi sonucu elde edilen 4, 5 ve 6 numara çaylara "kırık (kırmadan geçen) çaylar" denir. Ayrıca hem imalat kırığı hem de kırmadan geçen çayların tasnif eleğinin altında kalan 7 numara çaya da "toz çay" denir. "Çay-KUR üretim No 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7" belirli oranlarda harmanlanarak ticari isimlerle piyasaya arz edilmektedir. Yukarıda sözü edilen bu çay örneklerinin yanı sıra proje kapsamında olmamakla birlikte siyah çaylarla aradaki farkı ortaya koyabilmek ve ileride yapılması planlanan çalışmalara ışık tutabilmek amacıyla 3 örnek daha incelenmiştir. Bunlarda ikisi taze Rize Çay Araştırma Enstitüsünce sağlanan taze çay filizleri, diğeri ise piyasaya yeni verilmiş bulunan Çay-Kur poşet yeşil çaydır.

Polifenol ekstraksiyonu için kullanılan metanol (HPLC saflığında) Riedel-de Haën'den satın alınmıştır. Spektrofotometrik toplam polifenol analizinde kullanılan Folin-Cioacaltea's reagent, Na₂CO₃ E. MERCK Co. (Darmstadt, Germany)'den satın alınmıştır. HPLC ile alkaloid ve polifenol analizlerinde kullanılan Kateşin (C), Epikateşin (EC), Gallokateşin (GC), Epigallokateşin (EGC), Epigallokateşingallat (EGCG), Epigallokateşin (EGC) ve çay ekstraktı (tea ekstrakt) Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)'den, kafein (1,3,7-trimetilksantin), teobromin (3,7-dimetilksantin) ve Kuersetin glukozit (Q3G) Fluka'dan (Biochemica-Fluka Cheme- Switzland), rutin (Kuersetin 3-ramnoglukozit, Q3RG) Wako Chem. Co.'den, HPLC saflıkta fosforik asit ve asetonitril Riedel-de Haën' den satın alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan RP-HPLC kolon (5µm Tracer Extrasil –0052 (250x4.6 mm) (TEKNOKROMA Barcelona, Spain), 0.45 µm'lik membran filtreler (MACHEREY-NAGEL PTFE, Germany)'den satın alınmıştır. Çalışmalarda mekanik çalkalayıcı (Şimşek

Laboratuvar), derin dondurucu (-28 °C) (PHILCO), buzdolabı (+4 °C) (ARÇELİK), HPLC degasser (SHIMADZU, DGU-14A), spektrofotometre (SHIMADZU, UV-UIS 1601), santrifüj (SIGMA 2-16) kullanılmıştır.

3. 2. Yöntem

3. 2. 1. Örnek Hazırlama

Üç tekerrürlü olarak temin edilen çay örnekleri, laboratuvar tipi diskli değirmende öğütüldükten sonra gözenek aralığı 0,422 mm ve 0,177 mm olan eleklerden geçirilmiş ve analizlerde boyutları bu aralıkta olan örnekler kullanılmıştır. Örnekler kullanılıncaya kadar -24⁰C’de muhafaza edilmiştir. Polifenollerin ekstraksiyonu için, kapakları contalı sızdırmaz nitelikli santrifüj tüplerine 0,2 g çay örneği tartılmış ve 10 ml % 80’lik metanol (v/v) ile mekanik çalkalayıcıda 14 saat süresince, karanlıkta oda sıcaklığında ekstrakte edilmiştir. Sürenin bitiminde karışım 13000 d/d ‘da 10 dk santrifüj edilerek, sıvı ve katı kısımlar birbirlerinden ayrılıp, sıvı kısım vidalı kapaklı kahverengi tüplere alınmıştır. Tüpe alınan ekstraktlar analiz anına kadar -24 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. HPLC ile Alkaloid ve Fenolik Madde Analizi

Santrifüj edilmiş ekstraktlar, ekstrakttaki metanol oranını % 20’nin altına düşürmek için saf su ile seyreltilmiş ve 0,45 µm’lik membran filtreden süzülmüştür. Filtre edilmiş ekstraktın 20 µl’ si kolona injekte edilmiştir. Tekerrür sayısı 3 olduğu için bu analizlerde ayrıca paralelli çalışılmamıştır. HPLC analizlerinde uygulanan koşullar aşağıda verilmiştir.

HPLC çalışma koşulları		Gradient elusyon programı		
		süre (dak)	A (%)	B (%)
Model	: Shimadzu			
Kolon	: Teknokroma Extrasil ODS2 (250x4.6 mm; 10 µm; C ₁₈)	0	8	92
Kolon Fırını	: CTO – 10A SVp	10	8	92
System Kontroler	: SCL-10 Avp	57	18	82
Dedektor	: Photodiode Array (PDA)	78	24	76
Basınç	: 250 Kgf	80	26	74
Pompa	: LC-10 AOVp	92	28	72
Mobil Faz	: A = Asetonitril B = Su + %0,1 fosforik asit (w/v)	98	80	20
Dedeksiyon	: 270 ve 355 nm	108	8	92
Akış Hızı	: 1 ml/dk.			
Kolon Sıcaklığı	: 40 °C			
Enjeksiyon Miktarı	: 20 µl			

Alkaloid ve polifenolik bileşiklerin analizi için kullanılan standart maddeler Tablo 1’ de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Ara stok çözeltilerin her birinin 0.25-250 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda çalışılması ile elde edilen kalibrasyon eğrileri linear olup, korelasyon katsayıları 0.9987-1.000 olarak bulunmuştur. Siyah çay örneklerinin alkaloid ve polifenol bileşiklerinin kantitatif olarak tayini HPLC kromatogramlarından elde edilmiş olan integre alanlar kullanılmak suretiyle kalibrasyon eğrilerinden elde edilen değerler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan Extrasil ODS2 kolon (250 x 4,6 mm; 5 µm) ile elde edilen çay kromatogramlarındaki bileşiklerin kalitatif olarak analizi bu bileşiklere ait standart maddelerin çay ekstraktına ilave edilmesiyle ve söz konusu bileşiklerin UV-spektrumları ile ilgili standart maddenin spektrumunun karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşiklere ait tüm piklerin tanımlanması ve miktarlarının hesaplanması bileşiğin maksimum absorbans değeri verdiği 270 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Ancak flavonol glikozitleri tanımlanması, bunların iki farklı dalga boyunda maksimum absorbans vermeleri nedeniyle 270 ve 355 nm’de yapılmıştır.

Tablo 1. Kullanılan standart maddeler ve hazırlanması

Standart Madde	Kullanılan Çözgen	Stok Çözelti Konsantrasyonu (ppm)	Çalışma Çözeltisi Konsantrasyonu (ppm)
(+)-(C)	% 80 metanol (v/v)	1000	5- 50
(-)-(EC)	% 80 metanol (v/v)	1000	5- 50
(-)-(GC)	% 80 metanol (v/v)	500	0.5- 5
(-)-(EGC)	% 80 metanol (v/v)	500	25- 200
(-)-(EGCG)	% 80 metanol (v/v)	1000	1- 50
(-)-(ECG)	% 80 metanol (v/v)	1000	0.5- 50
(-)-(CG)	% 80 metanol (v/v)	500	0.25- 5
Rutin	% 80 metanol (v/v)	1000	5- 40
Teobromin	su	1000	0.25- 5
Kafein	% 80 metanol (v/v)	1000	25- 250
Gallik asit	% 80 metanol (v/v)	1000	2- 8
TF-f	% 80 metanol (v/v)	1000	2.99- 26.52
TF-3-G	% 80 metanol (v/v)	1000	6.31- 51.11
TF-3'-G	% 80 metanol (v/v)	1000	5.04- 39.74
TF-3,3'-DG	% 80 metanol (v/v)	1000	10.65- 82.6

3.2.3. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik tayini Folin-Ciocalteu spektrofotometrik yöntemi kullanılarak (Obanda ve Owuor 1997) 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Toplam fenolik madde analizi için gerekli çözeltilerin hazırlanması aşağıda verilmiştir:

- 1- Folin–Ciocalteu reagent çözeltisi; 1:3 oranında saf su ile seyreltilmiştir.
- 2- Doygun sodyum karbonat (% 35) çözeltisi; 87.5 g sodyum karbonat saf suda çözündürülüp 250 ml' ye tamamlanmıştır. Bir gece bekletilerek, filtre edilmiştir.
- 3- Gallik asit stok çözeltisinin (500 µg/ml) hazırlanması; 100 ml saf suda 50 mg gallik asit çözündürülerek taze olarak hazırlanmıştır.

- 4- Gallik asit çalışma çözeltilerinin hazırlanması; 500 µg/ml gallik asit stok çözeltisinden her biri 5'er ml'lik ölçü balonlarına konsantrasyonu 0-55 µg/ml arasında değişen 9 ayrı çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi:

Farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çalışma çözeltilerinin (9 adet) her birinden 0.5 ml alınarak 0.5 ml Folin-Ciocalteu reagent ile karıştırılmıştır. Karışıma 5 dk sonra 1 ml sodyum karbonat ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 1 ml su ile 3 ml'ye seyreltilmiştir. Elde edilen karışım 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra oluşan mavi rengin spektrofotometrede 700 nm' de absorbansı okunmuştur. Gallik asidin bu farklı konsantrasyonlarına karşı okunan absorbansların grafiğe geçirilmesi ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir ($R^2 = 0,996$).

Siyah Çay Örneğinde Toplam Fenolik Madde Tayini:

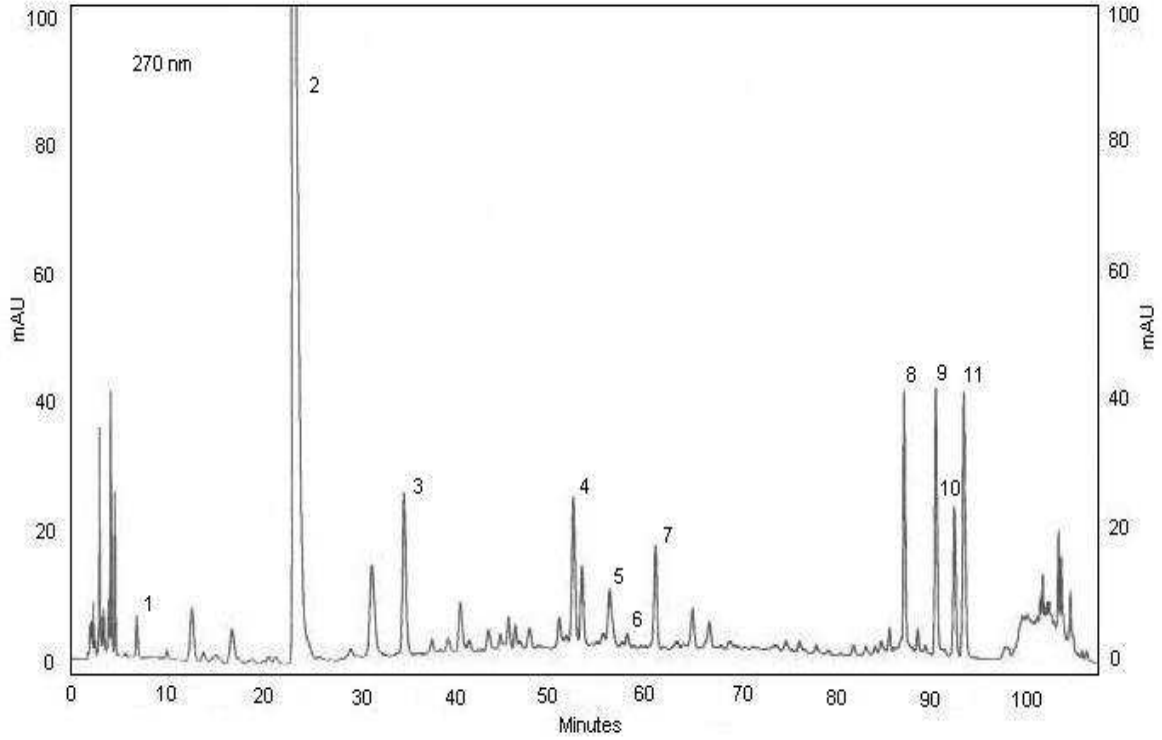
Örneklerde toplam fenolik madde analizi için çayların % 80 metanol ekstraktları uygun absorbans değerleri elde etmek için 50 kez seyreltilmiştir. Elde edilen seyreltilmiş ekstraktların toplam fenolik madde içeriği yukarıda belirtildiği gibi saptanmıştır. Burada farklı olarak, standart gallik asit çözeltisi yerine çay ekstraktı kullanılmıştır.

3. 2. 4. İstatistik Analiz

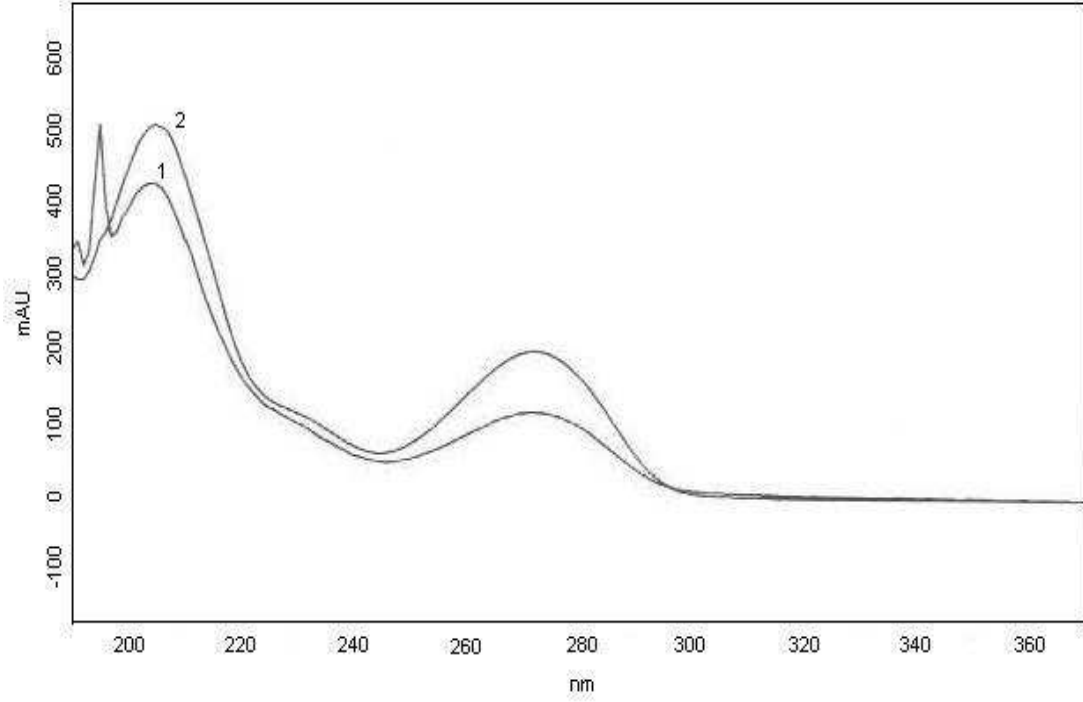
İstatistik analizler SPSS programı (10.1 versiyonu) ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama-standart sapma olarak gösterilmiştir. Varyans analizleri tek yönlü ve iki yönlü olarak yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırmalı testi ile belirlenmiştir. Farklılıkların $p < 0.05$ seviyesinde önemli olduğu düşünülmüştür.

4. ANALİZ VE BULGULAR

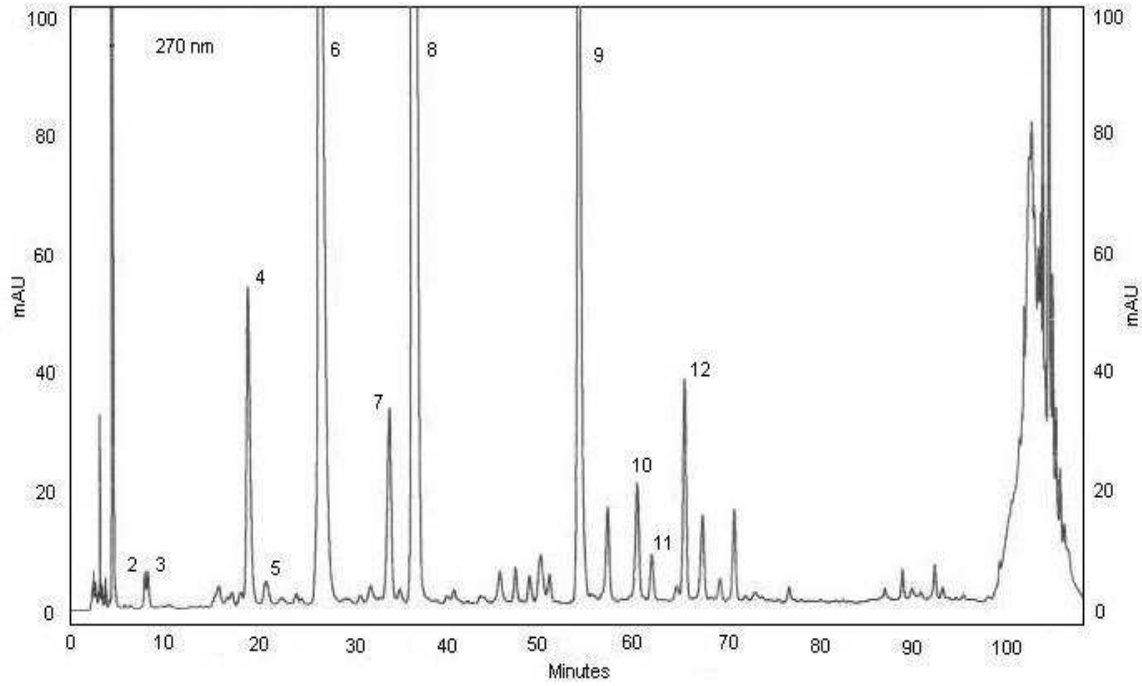
Araştırma kapsamında 3 farklı döneme (Mayıs-Temmuz-Eylül) ait 7 farklı sınıf çayda kromatografik olarak alkaloid ve fenolik bileşik analizleri ile spektrofotometrik olarak toplam fenolik madde tayini gerçekleştirilmiştir. HPLC ile yapılan alkaloid ve fenolik madde analizine ilişkin örnek bir kromatogram Şekil 1’de, tanımlanan bileşiklere ait PDA (fotodiyotarray dedektör) UV/VIS spektrumları Şekil 2, Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6’da gösterilmiştir. Kalitatif ve kantitatif analizlerin yapılmasında yararlanmak üzere taze çay yaprağı ve yeşil çayda da analiz yapılmış olup örnek bir kromatogram Şekil 3’te gösterilmiştir. Kromatogramın değerlendirilmesi ise Tablo 2’de verilmiştir.



Şekil 1. Çay-Kur yöntemine göre işlenmiş Mayıs dönemi 5. sınıf siyah çay örneğine ait tipik bir HPLC kromatogramı. Pikler: (1) teobromin, (2) kafein, (3) EGCG, (4) ECG, (5) Q3RG, (6) Q3G, (7) K3RG, (8) TF-f, (9) TF-3-G, (10) TF-3'-G, (11) TF-3,3'-DG,



Şekil 2. Teobromin ve kafeinin PDA UV spektrumu (1) Teobromin, (2) Kafein



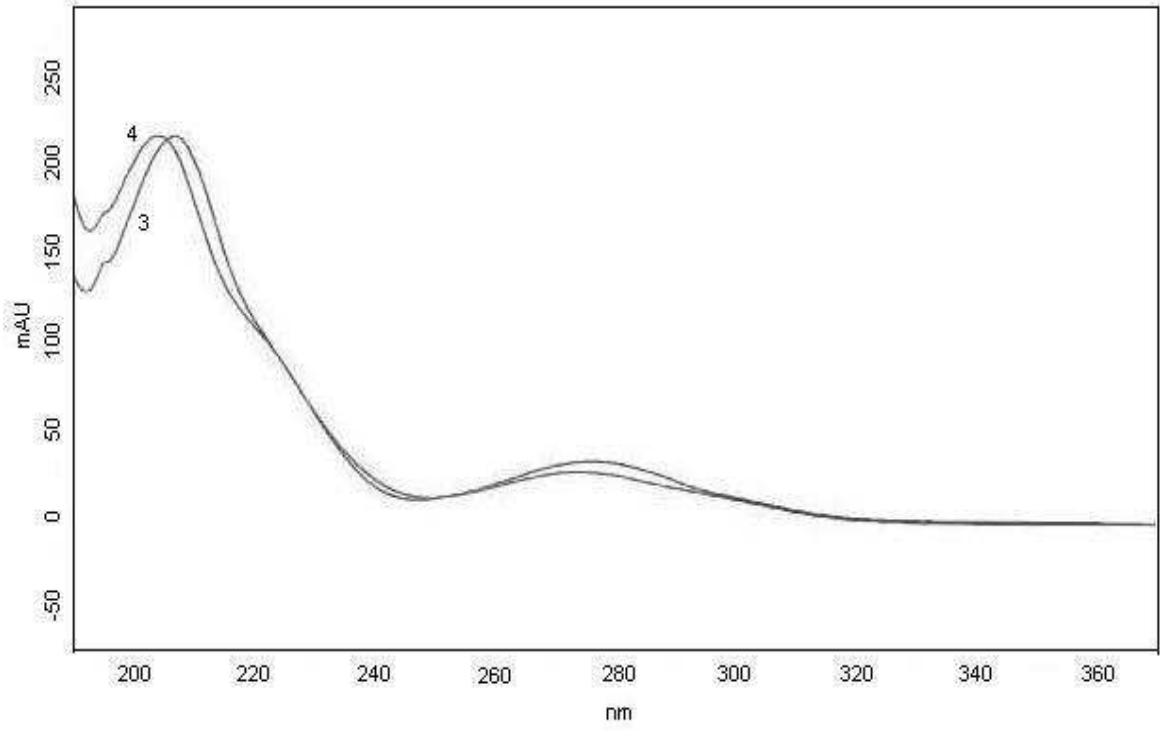
Şekil 3. Taze çay yaprağına (Muradiye klonu) ait HPLC kromatogramı

Pikler: (1) GA, (2) GC, (3) teobromin, (4) EGC, (5) C, (6) kafein, (7) EC, (8) EGCG, (9) ECG, (10) Q3RG, (11) Q3G, (12) K3RG

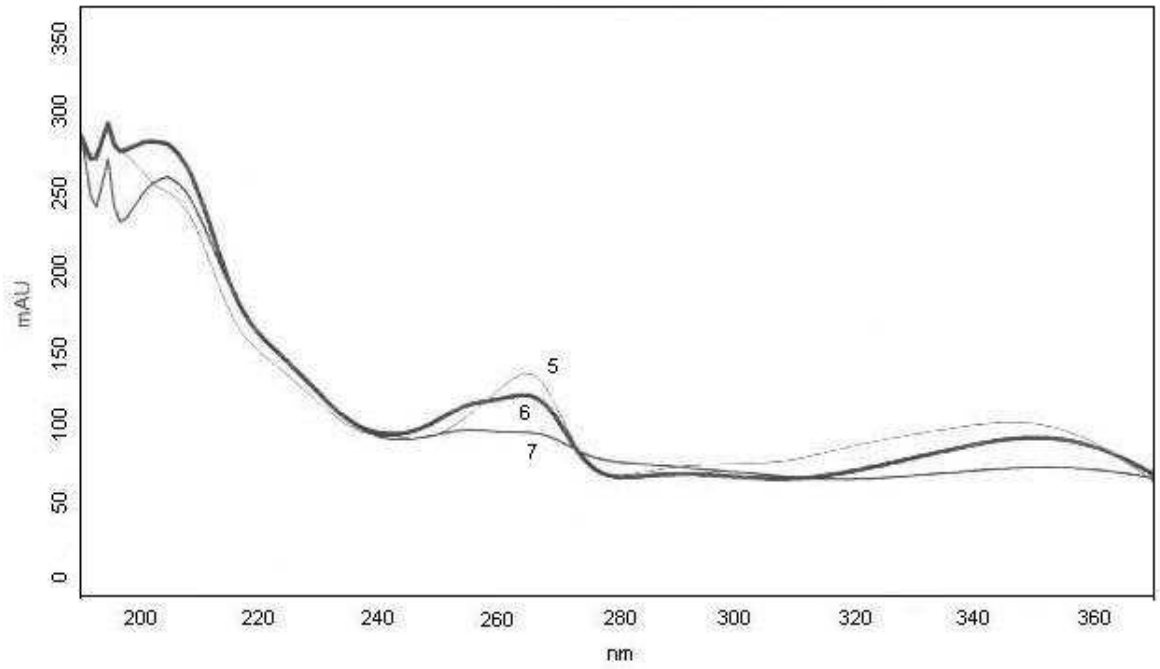
Tablo 2. Taze ay yaprağı (Muradiye ve Fener) ve yeşil çayın (ay-Kur) alkaloid ve fenolik madde miktarları (mg/g ka)

Bileşenler	Taze ay yaprağı (Muradiye)	Taze ay yaprağı (Fener)	Yeşil ay
GC	0.74	0.22	0.72
Teobromin	0.20	0.11	0.17
EGC	47.11	29.62	28.82
C	2.58	1.64	0.60
Kafein	29.12	37.40	20.54
EC	16.01	14.68	8.52
EGCG	130.46	87.69	61.06
ECG	21.60	16.82	10.86
Rutin	3.21	4.42	1.81
GA	5.93	5.32	1.24
CG	--	--	0.09

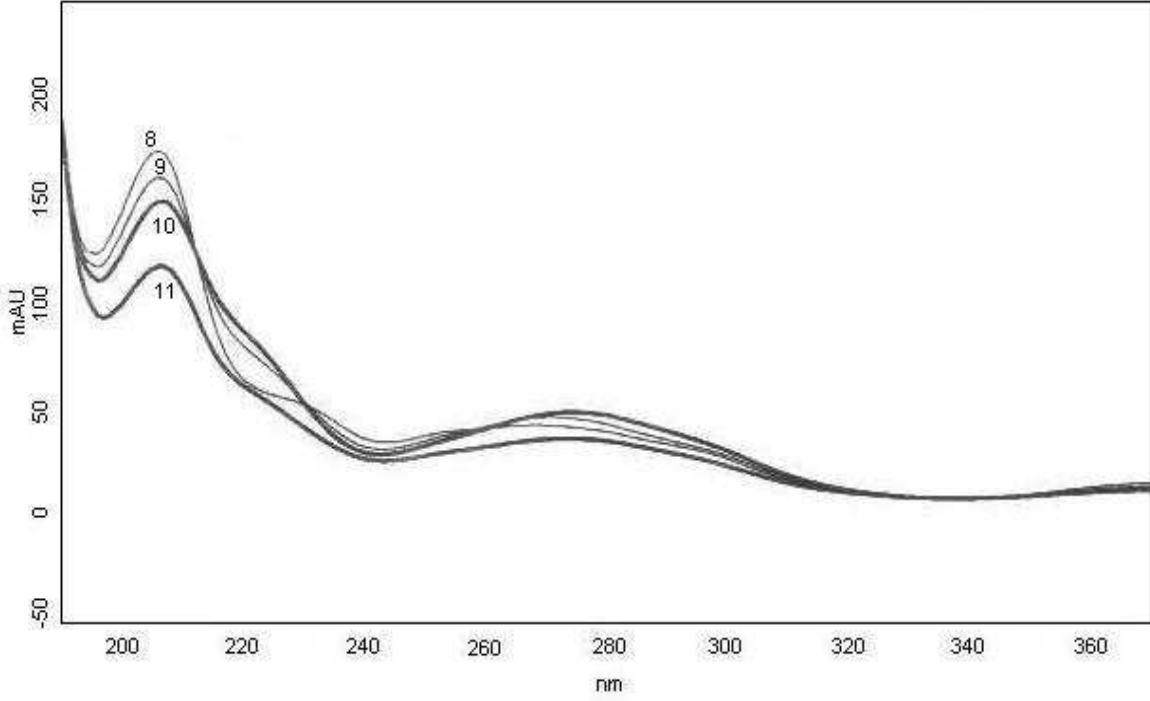
-- :Tespit edilemedi



Şekil 4. EGCG ve ECG'nin PDA UV spektrumu (3) EGCG, (4) ECG



Şekil 5. Q3RG, Q3G ve K3RG'nin PDA UV spektrumu (5) Q3RG, (6) Q3G, (7) K3RG



Şekil 6. TF bileşiklerinin PDA UV spektrumu

(8) TF-3,3'-DG, (9)TF-3-G, (10) TF-f, (11) TF-3'-G.

İncelenen çay örneklerinde hesaplanmış alkaloid değerleri Tablo 3'de, alkaloid miktarlarına ilişkin iki yönlü varyans analizi sonucu Tablo 4'te gösterilmiştir. EGCG, ECG ve Rutin miktarları ve iki yönlü varyans analizi sonucu sırasıyla Tablo 5 ve Tablo 6'da verilmiştir. Teaflavin (TF-f, TF-3-G, TF-3'-G ve TF-3,3'-DG) miktarları ise Tablo 7'de gösterilmiş olup bunlara ilişkin varyans analizi sonuçları Tablo 8' de sunulmuştur.

Tablo 3. Alkaloidlerin çay sınıfı, kıvrırma yöntemi ve hasat dönemine göre değişimi (mg/g ka)

Yöntem	Çay sınıfı	Teobromin			Kafein		
		Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül
Ortodoks	1	0.20±0.01 ^{aA}	0.19±0.01 ^{bA}	0.17±0.01 ^{cA}	25.72±0.64 ^{abB}	24.40±0.15 ^{eB}	20.27±0.66 ^{dA}
	2	0.20±0.02 ^{aA}	0.18±0.01 ^{abA}	0.17±0.00 ^{cA}	25.86±1.28 ^{bC}	23.11±0.12 ^{cdB}	20.10±0.47 ^{cdA}
	3	0.18±0.01 ^{aA}	0.16±0.01 ^{abA}	0.16±0.00 ^{bA}	23.78±0.65 ^{abB}	23.81±0.40 ^{deB}	19.33±0.41 ^{bcdA}
	4	0.16±0.00 ^{aAB}	0.17±0.01 ^{abB}	0.14±0.00 ^{aA}	23.28±0.40 ^{abB}	22.47±0.22 ^{bcb}	18.38±0.58 ^{abA}
	5	0.20±0.02 ^{aA}	0.17±0.00 ^{abA}	0.14±0.00 ^{aA}	23.79±0.90 ^{abB}	21.74±0.49 ^{abB}	17.84±0.28 ^{abA}
	6	0.18±0.01 ^{ab}	0.16±0.01 ^{aAB}	0.15±0.00 ^{abA}	24.19±0.82 ^{abC}	21.52±0.36 ^{ab}	17.51±0.53 ^{aA}
	7	0.18±0.01 ^{ab}	0.17±0.00 ^{abB}	0.14±0.00 ^{aA}	23.12±0.61 ^{ab}	22.81±0.03 ^{cb}	18.74±0.11 ^{abcA}
Çay-Kur	1	0.20±0.02 ^{ab}	0.21±0.01 ^{ab}	0.15±0.00 ^{abA}	25.97±0.53 ^{cb}	25.03±0.69 ^{eB}	20.85±0.66 ^{bcA}
	2	0.19±0.01 ^{aA}	0.20±0.01 ^{aA}	0.15±0.00 ^{abA}	24.14±0.41 ^{abB}	23.68±0.11 ^{cdB}	20.39±0.69 ^{abcA}
	3	0.19±0.01 ^{ab}	0.19±0.01 ^{ab}	0.14±0.01 ^{aA}	24.65±0.33 ^{bC}	22.63±0.28 ^{bcb}	19.16±0.33 ^{aA}
	4	0.18±0.01 ^{ab}	0.18±0.01 ^{ab}	0.14±0.00 ^{aA}	24.08±0.17 ^{abC}	22.76±0.38 ^{bcb}	19.54±0.35 ^{abA}
	5	0.18±0.01 ^{ab}	0.17±0.01 ^{aAB}	0.14±0.00 ^{aA}	23.16±0.33 ^{ab}	22.13±0.31 ^{abB}	19.00±0.40 ^{ab}
	6	0.18±0.01 ^{aA}	0.17±0.01 ^{aA}	0.16±0.00 ^{bA}	23.03±0.41 ^{aC}	21.37±0.25 ^{ab}	19.33±0.26 ^{aA}
	7	0.20±0.01 ^{ab}	0.18±0.00 ^{aA}	0.16±0.00 ^{bA}	26.26±0.06 ^{cC}	24.10±0.33 ^{deB}	21.05±0.11 ^{cA}

* : Aynı sütundaki farklı harfler(a,b,c...) ve aynı satırdaki farklı harfler(A,B,C...) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Tablo 4. Alkaloidlerin çay sınıfı, kıvrırma yöntemi ve hasat dönemine göre değişimine ait iki yönlü varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Teobromin			Kafein		
	SD [†]	KO [†]	F [†]	SD	KO	F
Dönem	2	0.014	48.423*	2	276.064	390.928*
Yöntem	1	0.001	3.091	1	7.950	11.258*
Sınıf	6	0.001	4.393*	6	15.320	21.694*
Dönem x Yöntem	2	0.000	1.688	2	2.136	3.024
Dönem x Sınıf	12	0.000	0.517	12	0.382	0.541
Yöntem x Sınıf	6	0.000	0.957	6	3.227	4.570*
Dönem x Yöntem x Sınıf	12	0.000	0.826	12	1.349	1.910

* : p<0.05 düzeyinde önemli

† : SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: F (Fisher) değeri

Tablo 5. EGCG, ECG ve Rutin'in çay sınıfı, kavrıma yöntemi ve hasat dönemine göre değişimi (mg/g ka)

Yöntem	Çay sınıfı	EGCG			ECG			Rutin		
		Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül
Ortodoks	1	0.34±0.01 ^{aAB}	0.26±0.02 ^{aA}	0.36±0.04 ^{bcB}	0.26±0.04 ^{aA}	0.17±0.01 ^{aA}	0.23±0.04 ^{bcA}	1.69±0.13 ^{ab}	1.12±0.06 ^{bA}	1.09±0.21 ^{aA}
	2	0.38±0.07 ^{abA}	0.38±0.01 ^{cA}	0.39±0.07 ^{cA}	0.34±0.01 ^{abB}	0.20±0.02 ^{abA}	0.17±0.02 ^{abA}	1.66±0.15 ^{ab}	1.08±0.02 ^{bA}	1.21±0.05 ^{aA}
	3	0.42±0.01 ^{abB}	0.37±0.03 ^{cbB}	0.26±0.00 ^{aA}	0.52±0.02 ^{bb}	0.22±0.01 ^{abA}	0.19±0.02 ^{abcA}	1.50±0.08 ^{ab}	1.14±0.01 ^{bA}	0.98±0.05 ^{aA}
	4	0.49±0.07 ^{abB}	0.34±0.02 ^{cbA}	0.27±0.01 ^{abA}	0.55±0.04 ^{bb}	0.23±0.02 ^{abA}	0.25±0.02 ^{cA}	1.61±0.10 ^{ab}	1.08±0.04 ^{bA}	0.98±0.06 ^{aA}
	5	0.69±0.03 ^{bb}	0.32±0.032 ^{abcA}	0.40±0.03 ^{cA}	0.56±0.04 ^{bb}	0.21±0.01 ^{abA}	0.18±0.01 ^{abcA}	1.63±0.22 ^{ab}	1.03±0.06 ^{abA}	0.96±0.10 ^{aA}
	6	0.37±0.07 ^{aAB}	0.46±0.02 ^{dB}	0.27±0.02 ^{abA}	0.42±0.10 ^{abB}	0.26±0.04 ^{bAB}	0.16±0.01 ^{aA}	1.49±0.13 ^{ab}	0.93±0.03 ^{aA}	1.00±0.06 ^{aA}
	7	0.61±0.22 ^{abA}	0.31±0.01 ^{abA}	0.25±0.01 ^{aA}	0.53±0.14 ^{bb}	0.21±0.01 ^{abA}	0.16±0.01 ^{aA}	1.46±0.20 ^{aA}	1.07±0.01 ^{bA}	1.20±0.11 ^{aA}
Çay-Kur	1	1.18±0.04 ^{ab}	0.70±0.14 ^{aA}	0.77±0.11 ^{aA}	0.94±0.07 ^{abB}	0.40±0.01 ^{aA}	0.35±0.06 ^{aA}	1.85±0.08 ^{abB}	1.21±0.02 ^{cA}	1.08±0.10 ^{aA}
	2	1.57±0.27 ^{abB}	0.78±0.13 ^{aA}	0.90±0.15 ^{abAB}	1.26±0.13 ^{bcB}	0.52±0.06 ^{abA}	0.42±0.03 ^{abA}	1.92±0.09 ^{bb}	1.14±0.03 ^{bcA}	1.10±0.13 ^{aA}
	3	2.05±0.20 ^{bcB}	0.89±0.16 ^{abA}	0.85±0.16 ^{abA}	1.47±0.14 ^{cdB}	0.53±0.12 ^{abA}	0.45±0.06 ^{abcA}	1.98±0.06 ^{bb}	1.04±0.04 ^{abA}	1.00±0.11 ^{aA}
	4	2.38±0.22 ^{cdB}	1.06±0.15 ^{abA}	0.80±0.04 ^{abA}	1.90±0.09 ^{deB}	0.61±0.10 ^{abA}	0.43±0.04 ^{abA}	1.82±0.06 ^{abB}	1.07±0.03 ^{abA}	0.96±0.12 ^{aA}
	5	3.00±0.30 ^{cb}	1.14±0.22 ^{abA}	1.06±0.12 ^{abA}	2.18±0.24 ^{cfB}	0.79±0.13 ^{bA}	0.52±0.07 ^{bcA}	1.58±0.15 ^{ab}	1.06±0.06 ^{abA}	1.03±0.14 ^{aA}
	6	3.16±0.40 ^{cb}	1.38±0.21 ^{bA}	1.15±0.04 ^{bA}	2.54±0.22 ^{fb}	0.74±0.14 ^{bA}	0.59±0.03 ^{cA}	1.72±0.11 ^{abB}	0.97±0.01 ^{aA}	1.17±0.12 ^{aA}
	7	1.06±0.12 ^{ab}	0.69±0.01 ^{aA}	0.71±0.02 ^{aA}	0.73±0.07 ^{ab}	0.37±0.01 ^{aA}	0.34±0.01 ^{aA}	1.86±0.11 ^{abB}	1.09±0.06 ^{abA}	1.06±0.05 ^{aA}

* : Aynı sütundaki farklı harfle r(a,b,c..) ve aynı satırdaki farklı harfler(A,B,C...) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Tablo 6. EGCG, ECG ve Rutin'in çay sınıfı, kıvrırma yöntemi ve hasat dönemine göre değişimine ait iki yönlü varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	(-)-EGCG			(-)-ECG			Rutin		
	SD [‡]	KO [‡]	F [‡]	SD	KO	F	SD	KO	F
Dönem	2	5.776	105.499*	2	6.165	307.661*	2	5.576	202.372*
Yöntem	1	26.697	487.602*	1	10.421	520.026*	1	0.227	8.223*
Sınıf	6	0.840	15.345	6	0.469	23.384*	6	0.055	2.016
Dönem x Yöntem	2	3.479	63.551*	2	2.377	118.615*	2	0.193	7.002*
Dönem x Sınıf	12	0.246	4.499*	12	0.175	8.742*	12	0.012	0.683
Yöntem x Sınıf	6	692	12.636*	6	0.367	18.315*	6	0.009	0.322
Dönem x Yöntem x Sınıf	12	0.217	3.956*	12	0.143	7.154*	12	0.028	1.022

* : p<0.05 düzeyinde önemli

‡ : SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: F (Fisher) değeri

Tablo 7. Teaflavinlerin çay sınıfı, kıvrıma yöntemi ve hasat dönemine göre değişimi (mg /g ka)

Yöntem	Çay sınıfı	TF-f			TF-3-G		
		Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül
Ortodoks	1	2.23±0.22 ^{ab}	1.59±0.16 ^{abA}	1.58±0.04 ^{cA}	4.09±0.10 ^{bcB}	3.53±0.27 ^{cAB}	3.07±0.07 ^{cA}
	2	2.16±0.05 ^{ab}	1.81±0.09 ^{ba}	1.54±0.11 ^{cA}	4.34±0.31 ^{cb}	3.49±0.09 ^{bcA}	3.01±0.02 ^{cA}
	3	2.19±0.24 ^{ab}	1.75±0.09 ^{baB}	1.37±0.01 ^{abA}	3.74±0.16 ^{abcB}	3.49±0.09 ^{bcB}	2.87±0.05 ^{bcA}
	4	2.05±0.11 ^{ab}	1.40±0.10 ^{aA}	1.30±0.01 ^{abA}	3.66±0.01 ^{abcB}	2.93±0.16 ^{abA}	2.74±0.08 ^{ba}
	5	1.64±0.23 ^{aA}	1.35±0.12 ^{aA}	1.30±0.06 ^{abA}	3.12±0.17 ^{ab}	2.84±0.22 ^{aAB}	2.49±0.08 ^{aA}
	6	1.78±0.26 ^{ab}	1.38±0.06 ^{aAB}	1.21±0.00 ^{aA}	3.37±0.39 ^{abA}	2.89±0.24 ^{aA}	2.49±0.05 ^{aA}
	7	1.97±0.15 ^{ab}	1.56±0.06 ^{abA}	1.46±0.04 ^{bcA}	3.44±0.49 ^{abcA}	3.06±0.01 ^{abcA}	2.93±0.10 ^{bcA}
Çay-Kur	1	3.87±0.24 ^{bcB}	2.36±0.20 ^{cA}	1.95±0.15 ^{cA}	5.49±0.10 ^{dB}	3.88±0.28 ^{cA}	3.25±0.13 ^{cA}
	2	3.89±0.31 ^{bcB}	2.18±0.09 ^{bcA}	1.78±0.09 ^{abcA}	5.27±0.10 ^{cdC}	3.54±0.13 ^{abcB}	3.19±0.04 ^{bcA}
	3	3.68±0.29 ^{abcB}	1.99±0.05 ^{abA}	1.78±0.12 ^{abcA}	5.10±0.15 ^{cb}	3.22±0.13 ^{abA}	2.94±0.09 ^{abA}
	4	3.28±0.23 ^{abB}	1.96±0.06 ^{abA}	1.55±0.05 ^{abA}	4.72±0.05 ^{bc}	3.30±0.20 ^{abB}	2.72±0.06 ^{aA}
	5	2.98±0.17 ^{ab}	1.81±0.07 ^{aA}	1.64±0.12 ^{abcA}	4.23±0.09 ^{aC}	3.07±0.12 ^{abB}	2.69±0.10 ^{aA}
	6	2.97±0.21 ^{ab}	1.83±0.15 ^{aA}	1.48±0.06 ^{aA}	4.19±0.09 ^{ab}	2.98±0.16 ^{aA}	2.75±0.11 ^{aA}
	7	4.34±0.25 ^{cb}	2.21±0.03 ^{bcA}	1.80±0.03 ^{bcA}	6.10±0.21 ^{eb}	3.61±0.08 ^{bcA}	3.17±0.02 ^{bcA}

Tablo 7.'nin devamı

Yöntem	Çay sınıfı	TF-3 -G			TF-3-3 -DG		
		Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül
Ortodoks	1	2.25±0.13 ^{ba*}	2.30±0.20 ^{aA}	2.15±0.07 ^{ca}	4.96±0.14 ^{aA}	5.34±0.30 ^{abA}	5.29±0.19 ^{ba}
	2	2.18±0.15 ^{ba}	2.03±0.22 ^{aA}	1.97±0.17 ^{bcA}	5.34±0.60 ^{aA}	5.45±0.17 ^{abA}	5.19±0.33 ^{abA}
	3	1.93±0.20 ^{abA}	2.24±0.20 ^{aA}	1.88±0.03 ^{abcA}	4.58±0.15 ^{aA}	5.81±0.23 ^{bb}	5.01±0.15 ^{abA}
	4	1.93±0.05 ^{abA}	1.89±0.11 ^{aA}	1.77±0.09 ^{abA}	4.55±0.05 ^{aA}	5.14±0.17 ^{abB}	4.70±0.21 ^{abAB}
	5	1.56±0.11 ^{aA}	1.89±0.13 ^{aA}	1.72±0.08 ^{abA}	4.31±0.15 ^{aA}	5.01±0.28 ^{aA}	4.56±0.21 ^{aA}
	6	1.70±0.23 ^{abA}	1.91±0.09 ^{aA}	1.66±0.04 ^{aA}	4.19±0.40 ^{aA}	5.13±0.26 ^{abA}	4.53±0.14 ^{aA}
	7	1.86±0.20 ^{abA}	2.07±0.02 ^{aA}	1.99±0.01 ^{bcA}	4.24±0.50 ^{aA}	5.33±0.01 ^{abB}	4.98±0.03 ^{abAB}
Çay-Kur	1	3.38±0.10 ^{deB}	2.84±0.19 ^{caB}	2.36±0.18 ^{ba}	5.84±0.01 ^{ba}	6.12±0.39 ^{aA}	5.60±0.37 ^{aA}
	2	3.09±0.12 ^{cdB}	2.53±0.11 ^{bcA}	2.19±0.18 ^{abA}	5.79±0.03 ^{ba}	5.99±0.26 ^{aA}	5.50±0.46 ^{aA}
	3	2.90±0.12 ^{bcB}	2.23±0.06 ^{abA}	2.07±0.15 ^{abA}	5.76±0.11 ^{ba}	5.59±0.19 ^{aA}	5.27±0.37 ^{aA}
	4	2.56±0.09 ^{abB}	2.28±0.08 ^{abB}	1.94±0.12 ^{abA}	5.12±0.13 ^{aA}	5.54±0.25 ^{aA}	5.21±0.32 ^{aA}
	5	2.31±0.05 ^{ab}	2.08±0.06 ^{aAB}	1.87±0.09 ^{aA}	4.74±0.16 ^{aA}	5.29±0.19 ^{aA}	5.09±0.37 ^{aA}
	6	2.33±0.06 ^{ab}	2.09±0.11 ^{aAB}	1.84±0.09 ^{aA}	4.69±0.22 ^{aA}	5.31±0.28 ^{aA}	5.06±0.38 ^{aA}
	7	3.64±0.24 ^{eb}	2.55±0.14 ^{bcA}	2.24±0.03 ^{abA}	5.87±0.20 ^{ba}	5.84±0.18 ^{aA}	5.51±0.04 ^{aA}

* : Aynı sütundaki farklı harfler(a,b,c...) ve aynı satırdaki farklı harfler(A,B,C...) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Tablo 8. Teaflavinlerin çay sınıfı, kıvrırma yöntemi ve hasat dönemine göre değişimine ait iki yönlü varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	TF-f			TF-3-G			TF-3'-G			TF-3,3'-DG		
	SD [†]	KO [†]	F [†]	SD	KO	F	SD	KO	F	SD	KO	F
Dönem	2	17.948	269.588*	2	24.197	288.227*	2	1.917	36.561*	2	2.807	13.239*
Yöntem	1	19.965	299.875*	1	9.991	119.010*	1	7.791	148.625*	1	8.797	41.497*
Sınıf	6	0.823	12360*	6	1.952	23.253*	6	1.073	20.463*	6	1.662	7841*
Dönem x Yöntem	2	4.808	72.222*	2	4.671	55.639*	2	1.825	34.809*	2	0.629	2.967
Dönem x Sınıf	12	0.091	1.364	12	0.132	1.577	12	0.062	1.207	12	0.088	0.417
Yöntem x Sınıf	6	0.132	1.981	6	0.340	4.046*	6	0.154	2.932	6	0.151	0.714
Dönem x Yöntem x Sınıf	12	0.085	1.271	12	0.181	2.155	12	0.078	1.496	12	0.167	0.787

* : p<0.05 düzeyinde önemli

† : SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: F (Fisher) değeri

İncelenen örneklerde spektrofotometrik yöntemle belirlenmiş olan toplam fenolik madde miktarları Tablo 9’da gösterilmiş olup, iki yönlü varyans analiz sonuçları Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 9. Toplam fenoliklerin çay sınıfı, kıvrırma yöntemi ve hasat dönemine göre değişimi

Yöntem	Çay sınıfı	Toplam fenolik madde (mg GAE/g ka)		
		Mayıs	Temmuz	Eylül
Ortodoks	1	66.48±0.42 ^{dB*}	62.87±2.28 ^{cAB}	57.75±1.39 ^{cA}
	2	67.74±0.91 ^{dC}	61.61±0.93 ^{cB}	57.83±1.00 ^{cA}
	3	61.61±0.57 ^{cB}	59.17±0.80 ^{bcB}	55.47±0.75 ^{cA}
	4	59.56±0.14 ^{abcC}	52.87±1.37 ^{abB}	47.05±0.76 ^{aA}
	5	56.26±0.71 ^{abB}	53.19±1.47 ^{abB}	48.15±0.57 ^{bA}
	6	56.81±1.38 ^{abC}	52.83±1.04 ^{abB}	49.02±0.47 ^{abA}
	7	60.66±2.71 ^{bcB}	56.49±0.59 ^{abAB}	52.01±0.70 ^{bA}
Çay-Kur	1	83.40±1.6 ^{cC}	70.73±2.88 ^{cB}	61.14±1.64 ^{bA}
	2	76.00±0.75 ^{cC}	67.19±2.12 ^{bcB}	57.99±1.72 ^{abA}
	3	75.45±0.39 ^{bcB}	65.54±3.76 ^{abcA}	56.81±2.57 ^{abA}
	4	72.86±0.63 ^{abC}	61.14±1.78 ^{abB}	53.50±0.34 ^{aA}
	5	71.84±0.49 ^{aC}	60.90±0.87 ^{abB}	53.03±1.86 ^{aA}
	6	73.96±0.59 ^{abcC}	58.54±1.02 ^{abB}	53.90±0.47 ^{aA}
	7	79.94±1.23 ^{dB}	61.92±0.36 ^{abA}	59.17±0.70 ^{bA}

* : Aynı sütündeki farklı harfler(a,b,c...) ve aynı satırdaki farklı harfler(A,B,C...) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Tablo 10. Toplam fenoliklerin çay sınıfı, kıvrırma yöntemi ve hasat dönemine göre değişimine ait iki yönlü varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Toplam Fenolik Madde		
	SD [‡]	KO [‡]	F [‡]
Dönem	2	2160.011	356.197*
Yöntem	1	2301.370	379.508*
Sınıf	6	267.337	44.085*
Dönem x Yöntem	2	336.826	55.544*
Dönem x Sınıf	12	6.304	1.040
Yöntem x Sınıf	6	17.795	2.935*
Dönem x Yöntem x Sınıf	12	6.731	1.110

* : $p < 0.05$ düzeyinde önemli

‡ : SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: F (Fisher) değeri

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5. 1. Siyah Çayda Alkaloid ve Fenolik Bileşiklerin Tanımlanması

Kromatografik analizler sonucunda çayda alkaloidlerden teobromin ve kafein, flavanol bileşiklerinden EGCG ve ECG, flavanol glikozitlerden Q3RG ve kompleks polifenollerden TF-f, TF-3-G, TF-3'-G ve TF-3,3'-DG kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Diğer fenolik bileşiklerden, flavanol grubunda yer alan EGC, C, EC ve CG siyah çaylarda beklendiği üzere belirlenememiştir, zira bu bileşikler siyah çaya işleme sırasında okside olarak teaflavin ve tearubijinleri oluşturmaktadır. Flavanol glikozitlerden ise Q3G ve K3RG kalitatif olarak belirlenmiş ancak ilgili standartlar piyasada bulunamadığından kantitatif olarak belirlenememiştir.

Şekil 1'de çay ekstraktına ait tipik bir kromatogram gösterilmektedir. Çayda bulunan bileşiklerin tanımlanması; (1) çay örneği ekstraktına internal standart madde ilavesi (2) bileşiklerin PDA UV/VIS spektrumları ve (3) alıkonma sürelerinin söz konusu bileşiklere ait standart maddelerinki ile kıyaslanması ile yapılmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada 3 farklı şekilde doğrulama yapılmış olmaktadır.

Siyah çaydaki başlıca alkaloid bileşikler, pürin türevleri olan kafein (2) ve teobromindir (1). 1 ve 2 numaralı piklerin PDA UV spektrumu (Şekil 2.) sırasıyla standart teobromin ve kafein bileşiklerinininki ile benzer olduğundan 1 no'lu pik teobromin, 2 no'lu pik ise kafein olarak tanımlanmıştır.

Siyah çayın fenolik bileşiklerinden olan flavanolları oluşturan bileşiklerin başlıcaları C, EGC, EC, EGCG ve ECG'dir (Peterson et al. 2005). Araştırmamızda incelenen çay örneklerinde flavanol bileşiklerden sadece EGCG ve ECG tespit edilebilmiştir. Diğer flavanol bileşiklerden EGC, C ve EC ise hiçbir örnekte saptanamamıştır. Diğer bir deyişle, sadece esterleşmiş formdaki kateşinler tespit edilebilmiştir. Siyah çay üretiminde kateşinlerden EGC ve EC oksidasyon sırasında TF'lere dönüşürken, C bu reaksiyonlarda yer almaz (Bonnely et al. 2003, Wright et al. 2002). TF'lerin oluşumunda kateşinlerden EGC ve EGCG daha hızlı oranda okside olmaktadır. Wang et al. (2000) Çin'de üretilen Keemun siyah çayında kateşinlerden GCG, C ve EC'i tespit edememişlerdir. Benzer şekilde, Obanda (2001) çay yapraklarına 20° ve 30 °C fermentasyon sıcaklıklarında 60-150 dk süre ile uygulanan

fermentasyon sonucunda, siyah çayda EGC'yi hiçbir durumda tespit edememiş, C'yi ise ancak 20 °C'de 60-90 dk sonrasında az miktarda tespit etmişlerdir. Model çay fermentasyon sistemi üzerine yapılan bir çalışmada ise TF oluşumuna katılan kateşinler arasında öncelikle EGC ve EGCG'nin, EC ve ECG'e göre daha kolay oksidasyona uğradığı ve çalışılan tüm kateşin kombinasyonlarının oksidasyonu sonucunda hiçbir durumda EGC ve EGCG'e rastlanmadığı belirtilmiştir (Sanderson et al. 1972). Bu araştırmada ele alınan siyah çaylarda da EGC'nin tespit edilememesi bu sonuçları doğrulamıştır.

Diğer taraftan, incelenen siyah çaylarının üretiminde hammadde olarak kullanılan taze çay yapraklarından Mayıs dönemi sürgünü Muradiye (Şekil 3.) ve Fener ile yeşil çayda yapılan HPLC analizi sonucunda tespit edilmiş olan kateşinlerin miktar açısından sıralaması aşağıdaki gibidir:

EGCG>EGC>EC>C (Tablo 2)

Bu sıralama, taze çay klonlarında ve yeşil çaylarda kateşinlerin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalar (Lin et al. 1996, Zuo et al. 2002, Nishitani ve Sagesaka 2004) ile uyum içindedir. Kateşin miktarlarındaki farklılık kateşinlerin henüz hiç oksidasyona uğramamış ya da çok az uğramış (yeşil çayda) olmasından kaynaklanmaktadır.

Tablo 2' de görüldüğü gibi, TF oluşumunda rolü olan EC ile, bu oluşum reaksiyonlarında yer almayan C siyah çayın hammaddesi olan taze çay yapraklarında ve ayrıca yeşil çayda diğer kateşinlere göre daha az miktarda bulunmaktadır. Siyah çay örneklerinde bu kateşinlerin bulunmaması, henüz siyah çaya dönüşmemiş taze yapraklarda dahi bunların miktarının az olmasından da kaynaklanmış olabilmektedir. Diğer taraftan kateşinlerin pH, ısı ve oksijen gibi çevresel faktörlere karşı gösterdikleri stabilite arasında farklılıklar söz konusudur. Bu farklılıklar da EGC, EC ve C'in tespit edilememiş olmasında bir faktör olarak düşünülmektedir.

Şekil 1'de görülen örnek kromatogramda 3 ve 4 numaralı pikler, sırasıyla EGCG ve ECG olarak tanımlanmıştır. Bu piklerin Şekil 4.'de görülen spektrumları, bu bileşiklere ait standartların spektrumları ile benzer bulunmuştur.

Çay örneklerinde flavonol glikozitlerden Q3RG (pik no 5), Q3G (pik no 6) ve K3RG (pik no 7) tanımlanarak çayda buldukları kesin olarak tespit edilmiştir. Bunların Şekil 1 ve Şekil

4'te spektrumları gösterilmektedir. K3RG'in tanımlanması literatürde belirtilen polarite sıralaması ve spektruma benzerliğinden yararlanılarak yapılmıştır. Bu 3 flavonol glikozitten ancak rutin standardının bulunabilmesi nedeniyle ancak buna ait kantitatif analiz yapılabilmektedir.

Kateşinlerin oksidasyon ürünü olan TF'ler polaritelerinin düşük olması nedeniyle alıkonma süreleri en uzun olan, kolondan en son yıkanan bileşikler olmuştur. Kromatogramda no 8-11 olarak numaralandırılmış pikler TF olarak tanımlanmıştır. Bu bileşiklere ait piklerin spektrumu da Şekil 5.'de gösterilmiştir.

5. 2. Çay Örneklerinin HPLC ile Belirlenmiş Alkaloid İçerikleri

Tablo 3'de görüldüğü gibi Ortodoks ve Çay-Kur yöntemleriyle işlenmiş çay örneklerinde genel olarak teobromin miktarları sınıf ve dönem farkı olmaksızın 0.14-0.21 mg/g ka olarak belirlenmiştir (Tablo 3). Çayların teobromin içerikleri üzerine yapılmış çok sınırlı sayıda araştırmaya rastlanmıştır. Sharma et al. (2005)'in yaptığı bir çalışmada, siyah çaylarda bu araştırmada belirlenen düzeylerden daha yüksek düzeylerde (1.06-2.5 mg/g ka) teobromin tespit edilmiştir. Yapılan iki yönlü varyans analizi sonucunda yöntemlerin teobromin seviyeleri üzerine etkisi olmadığı ancak hasat dönemi ve sınıf farklılıklarının çayların teobromin içeriğini önemli düzeyde etkilediği görülmüştür (Tablo 4.).

Tablo 3'e göre 1. ve 2. sınıf çayların teobromin içeriğinin genellikle diğer sınıflara göre daha fazla olduğu söylenebilir. 3 ayrı hasat dönemi dikkate alındığında en az teobromin içeriği Eylül dönemi hasat edilen çaylarda, en fazla teobromin ise Mayıs dönemi hasat edilen çaylarda tespit edilmiştir. Her 2 yöntemle işlenen 3 farklı dönemde hasat edilen çayların kafein içeriği 17.51-26.26 mg/g olarak tespit edilmiştir (Tablo 3). Khokhar ve Magnusdottir (2002) 12 farklı siyah çayda kafein içeriğini 25-28 mg/g, Sharma et al. (2005) Ortodoks ve CTC tipi siyah çayda sırasıyla 17.9-17.5 mg/g kuru ağırlık, Obanda et al. (2001) ise farklı sıcaklık ve sürede fermentasyona uğratarak elde ettikleri siyah çaylarda 14.25-16.95 mg/g km kafein tespit etmişlerdir. Bu araştırma kapsamındaki çaylarda bulunan kafein içerikleri literatürde belirtilen bu değerlerle uyum sağlamıştır. Ding et al. (1992) 15 farklı siyah çayda yaptıkları çalışmada çayların kafein içeriğini 19.9-35.2 mg/g olarak belirlemişlerdir ki bu düzeyler genel olarak tarafımızdan belirlenen düzeylerden daha yüksektir. Kafein, çayın tadı üzerine etkili olan en önemli metilksantin bileşimidir ve genellikle yüksek kaliteli çaylarda

kafein miktarının daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Çaylar arasında kafein açısından görülen farklılıkların çayların işleme yöntemi, hasat dönemi bölgesel farklılıklar ve analiz yöntemlerindeki farklılıklar gibi faktörlerden kaynaklanabileceği birçok araştırmacı tarafından da belirtilmektedir.

Araştırma çay örneklerinin 2 yönlü varyans analizi sonucunda kafein miktarları arasında işleme yöntemi, sınıf farklılıkları ve hasat edildiği dönem açısından önemli farklılıklar bulunmuştur (Tablo 4). Çay-Kur yöntemine göre çayların kafein içeriği (19.00-26.26 mg/g ka), Ortodoks yöntemiyle işlenen çayların kafein içeriğinden (17.51-25.86 mg/g ka) daha fazla bulunmuştur.

Genel olarak 1., 2. ve 7. sınıf çaylarda kafein miktarı daha fazla tespit edilmiştir. Yöntem farkı olmaksızın hasat dönemi açısından en fazla kafein içeriği Mayıs dönemine ait çaylarda bulunmuştur. Bunu sırasıyla Temmuz ve Eylül dönemi çaylar izlemiştir. Bu eğilim teobromin için alınan sonuçla benzerlik göstermiştir.

5. 3 . Çay Örneklerinin EGCG, ECG ve Rutin İçerikleri

Çay örneklerinde EGCG miktarları Ortodoks yöntemiyle işlenen çaylarda 0.25-0.69 mg/g ka, Çay-Kur yöntemi ile işlenen çaylarda ise 0.69-3.16 mg/g ka olarak belirlenmiştir (Tablo 5). Bu miktarların aynı araştırma kapsamında taze çay yapraklarında tespit edilen 130.46 mg/g ka (Muradiye) ile 8.69 mg/g ka (Fener) düzeyindeki EGCG miktarları ile kıyaslandığında, başlangıçtaki EGCG'nin çok büyük kısmının işleme sırasında TF ve TR'lere dönüşmüş olduğu görülmektedir (Tablo 2).

Çay örneklerinde bulunan EGCG miktarlarının, Liang et al. (2003) tarafından su ile ekstrakte edilen 17 farklı tipte siyah çayın 16'sında buldukları 0.72-3.53 mg/g ka EGCG miktarları ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Aynı araştırmacılar, yeşil çayda buldukları % 8.4 oranındaki EGCG'nin çayın fermentasyonu sırasında çok büyük oranda okside olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırma kapsamında incelenen Çay-Kur yeşil çayında tespit edilen % 6.11 (Tablo 11) oranındaki EGCG miktarına karşılık siyah çay örneklerindeki düşük (0.25-3.16 mg/g ka) miktarlar tespit edilmesi de araştırmacıların buldukları sonuçlarla uyum sağlamaktadır. Benzer şekilde CTC çayında % 70'lik metanol ekstraktında belirlenmiş 0.5 mg/g ka düzeyindeki (Sharma et al. 2005) ve 30 °C'de 60 dk fermentasyon uygulamasıyla üretilen siyah çayda

saptanmış 2.95 mg/g ka düzeyindeki (Obanda et al. 2001) EGCG miktarları tarafımızdan belirlenen EGCG miktarları ile uyum içindedir. Diğer taraftan Khokhar ve Magnusdottir (2002), 12 farklı çeşit siyah çayda ve Lee ve Ong (2000) su ile ekstrakte edilmiş Seylan tipi siyah çay ekstraktında bu araştırma verilerine göre daha yüksek miktarda, sırasıyla 2.7-25.2 mg/g ka ve 5.52 mg/g ka düzeyinde EGCG tespit etmişlerdir. Sonuçlar arasındaki bu farklılık, kateşin miktarlarının çayda bulunma düzeylerini belirleyen faktörlerin başında gelen çay yaprağının kalitesi ve çay üretim yöntemindeki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. EGCG miktarları üzerine sınıf farklılıklarının etkisi önemli bulunmazken kıvırma yöntemleri ve hasat dönemlerinin etkisi önemli bulunmuştur (Tablo 6). Çay-Kur yöntemiyle işlenen çay örneklerinde EGCG miktarı Ortodoks yöntemiyle işlenen çaylardan daha fazla tespit edilmiştir. Hasat dönemi dikkate alındığında, Mayıs dönemi toplanarak işlenmiş çay örneklerinin en fazla EGCG içerdiği, Temmuz ve Eylül dönemi toplanmış çayların EGCG miktarlarının ise birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir.

Siyah çayın polifenol miktarı ve dağılımı üzerine, hasat edilen sürgün dönemlerinin etkisi ülkeye göre bölgesel farklılıklar taşımaktadır. Caffin et al. (2004) Avustralya siyah çaylarının üretiminde hasat döneminin etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada, bu araştırma sonuçlarından farklı olarak, Ocak (yaz) dönemine ait siyah çay örneklerinde (16.23 mg/g ka), Ekim (sonbahar) ve Haziran (bahar) dönemi çaylarından daha fazla (sırasıyla 5.19 ile 3.62 mg/g ka) EGCG tespit etmişlerdir. Bu durum siyah çayın EGCG içeriğinin yüksek olduğu döneme ait taze yapraklarda da EGCG'nin diğer dönemlerden daha yüksek olması ile ilişkili olabilir. Robertson (1983) taze çay yapraklarının kateşin konsantrasyonlarının bitkinin yavaş ve hızlı geliştiği dönemlere göre değiştiğini tespit etmiştir. EGCG'nin çayın önemli kalite kriterlerinden biri olarak kabul edilmesi ve sağlık etkisi açısından en yüksek antioksidan aktiviteye sahip kateşin olması (Dufresne ve Farnworth 2001) nedeniyle Mayıs dönemi hasat edilen Çay-Kur yöntemiyle işlenmiş çayların kalitesinin daha yüksek olduğu söylenebilmektedir.

Çay örneklerinde EGCG'nin yanı sıra tespit edilmiş olan iki kateşinden diğeri ECG olup Ortodoks yöntemiyle işlenmiş çaylarda 0.16-0.52 mg/g ka, Çay-Kur yöntemiyle işlenmiş çaylarda ise 0.34-2.54 mg/g ka düzeyinde bulunmuştur (Tablo 5). Bu miktarların taze çay yaprakları (16.82 ve 21.60 mg/g ka) ve yeşil çayda (10.86 mg/g ka) bulunan ECG miktarlarından çok düşük olduğu görülmektedir. EGCG'de olduğu gibi ECG'nin de büyük kısmı siyah çay üretimi sırasında oksidasyona uğramıştır. Siyah çay üretiminde,

fermentasyonun kateşinlerin oksidasyonu üzerine etkisinin model sistemde araştırıldığı bir çalışmada galledanmış kateşinlerin, galledanmamış kateşinlerden daha hızlı okside olduğu ve yüksek miktardaki EGCG ve ECG'nin siyah çayda TF-3,3'-DG'ın daha fazla olmasına yol açacağı belirtilmiştir (Bonnely et al. 2003).

Çay örneklerinde belirlenen ECG miktarlarının (0.16-2.54 mg/g ka), Sharma et al. (2005)'in % 70 metanol ekstraksiyonu ile Ortodox ve CTC siyah çaylarında (sırasıyla 1.0 ve 1.5 mg/g ka) ve Liang et al. (2003)'in 17 farklı tipte siyah çayda buldukları (0.61-13.55 mg/g ka) değerler arasında olduğu görülmüştür. Zuo et al. (2002), % 80 metanol ekstraksiyonu ile Fujian siyah çayında daha yüksek düzeylerde (4.45 mg/g ka) ECG saptamışlardır.

Çay örneklerinin ECG miktarları çay sınıfı, kıvrırma yöntemi ve hasat dönemine göre önemli farklılıklar göstermiştir (Tablo 6). Genellikle Ortodoks yöntemi ile işlenen 4. sınıf çayların ve Çay-Kur yöntemi ile işlenen 5. ve 6. sınıf çayların ECG düzeylerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. 4., 5. ve 6. sınıf çayların, sınıflandırma sırasında darbe görmemiş ve kırıcıdan geçirilmemiş olan 1., 2. ve 3. sınıf çaylardan daha fazla ECG içermesi ilginç bir sonuç olmuştur. Çay-Kur yöntemiyle işlenen çayların ECG miktarları, Ortodoks yöntemiyle işlenenlere göre daha yüksek bulunmuştur. Mayıs döneminde hasat edilerek işlenmiş yapraklar en fazla miktarda ECG içermiş ve bunu Temmuz ve Eylül dönemi çayları izlemiştir. Siyah çaylardaki kateşin düzeylerinde mevsimsel farklılık olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da tespit edilmiştir.

Çay örneklerinde flavonol glikozit olarak 3 bileşik (Q3RG, Q3G ve K3RG) belirlenmiş olup standardının mevcut olmaması nedeniyle bunlardan yalnızca rutin için kantitatif analiz yapılmıştır. Çay örneklerinin rutin içerikleri Ortodoks yöntemine göre işlenmiş çaylarda 0.96-1.69mg/g ka, Çay-Kur yöntemine göre işlenmiş çaylarda ise 0.96-1.98 mg/g ka düzeyinde belirlenmiştir. Rutin siyah çaylarda en fazla bulunan flavonol glikozitlerin başında gelmektedir (Mc Dowell et al. 1990). Price et al. (1998)'in çeşitli siyah çaylarda flavonol glikozit içeriğine ilişkin yaptıkları çalışmada, çayların 15g/L'lik hazırlanan su ekstraktında rutin içeriği 0-24.1mg/L (0-1.6mg/g) olarak saptanmıştır. Tarafımızdan incelenen çay örneklerinin rutin miktarları, yukarıda adları verilen araştırmacıların buldukları değerlerle uyum sağlamıştır.

Çay sınıfının çayların rutin içeriği üzerine etkisi önemli bulunmamıştır ($p>0.05$) ancak kavrma yöntemi ve hasat dönemine göre rutin miktarları önemli farklılıklar göstermiştir.

Diğer iki fenolik bileşik, EGCG ve ECG, için gözlenen durum rutin için de geçerli olup Çay-Kur kavrma yöntemi ile işlenen çaylarda Ortodoks yöntemine göre daha fazla rutin tespit edilmiştir. Her 2 yöntem için de geçerli olmak üzere Mayıs dönemi çaylarının rutin içerikleri daha yüksek ($p<0.05$) bulunmuştur. Temmuz ve Eylül dönemi çaylarının rutin miktarları ise birbirine yakın olup, aralarında önemli bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Flavonol glikozitler içinde en fazla antioksidan aktiviteye kuersetin bileşiklerinin sahip olması nedeniyle rutin çayın önemli bileşenlerinden biridir. Bu nedenle en fazla rutin içerdiği tespit edilen Mayıs dönemi çaylarının daha iyi kalitede olduğu söylenebilmektedir.

5. 4. Çay Örneklerinin HPLC ile Belirlenmiş Teaflavin İçerikleri

Çayda bulunan fenolik bileşiklerden kateşinlerin oksidasyon ürünü olan ve daha kompleks yapıdaki TF'ler, siyah çayın en önemli bileşenleridir. Tablo 7'de görüldüğü üzere araştırma dahilindeki siyah çayların TF içerikleri aşağıdaki gibidir:

TF-f: 1.21-4.34 mg /g ka;

TF-3-G: 2.49-6.10 mg /g ka;

TF-3'-G: 1.56-3.64 mg /g ka;

TF-3,3'-DG: 4.19-6.12 mg /g ka

Çay örneklerinde, TF bileşiklerinden en fazla TF-3,3'-DG tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla TF-3 -G, TF-f ve TF-3'-G bileşikleri izlemiştir. Toplam TF olarak örneklerde ortalama 8-20 mg/g ka düzeyinde TF bulunmuştur. Liang et al. (2003) su ile ekstrakte edilmiş 17 çay örneğinde ortalama değerler olarak en fazla TF-3'-G(2.98 mg /g) ve bunu takiben sırasıyla TF-f (2.35 mg/g), TF-3,3'-DG (2.33 mg/g) ve TF-3-G (0.89 mg/g) tespit etmişlerdir. İncelenen çay örnekleri ile kıyaslandığında, çaylarda hem baskın olan TF bileşiği farklı, hem de bireysel TF'lerin miktarları daha düşüktür. Çay polifenollerinin analizinde, kullanılan ekstraksiyon solventi bu bileşiklerin saptanan düzeylerinde çok önemli rol oynamaktadır (Turkmen et al. 2005, Perva-Uzunalic et al. 2005). Steinhaus ve Engelhardt (1988) farklı tipte siyah çayların su ekstraktında 1.35-5.27 mg/g TF-f, 0.94-4.96 mg /g TF-3,3'-DG, 1.10-4.13 mg/ g TF-3'-G ve 0.92-2.60 mg/g TF-3-G saptamışlardır. Siyah çayda, kateşin ve TF'lerin

çayın tadı üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada su ekstraktlarının çok düşük seviyelerde TF içerdiği ve çaylara göre değişmek üzere TF bileşiklerinden birinin çayda daha baskın olduğu belirtilmiştir (Ding et al. 1992). Farklı çalışmalarda bulunan TF miktarlarındaki düşüklüğün olası sebepleri olarak yetersiz ekstraksiyon, ticari çaylar için uzun süre depolanmışlık ve Ortodoks yönteminin kullanılmış olması gösterilmektedir. Araştırma çay örneklerinde TF bileşiklerinden en fazla TF-3,3'-DG bulunmasına karşılık daha önce yapılmış çalışmalarda genellikle birbirinden farklı TF bileşiklerinin çayda daha baskın olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın oluşmasında bölgesel, genetik, agronomik ve işleme yöntemi gibi faktörlerin rol oynadığı belirtilmektedir. TF bileşiklerinin siyah çayın duyuşal özelliklerini belirlemede çok önemli rolü vardır. Owuor et al. (2005), burukluk olarak TF monogallatların ve digallatın TF-f' den sırasıyla 2.22 ve 6.4 kat daha fazla burukluğa sahip olduğunu belirtmişler ve TFDG eşdeğerinin Kenya siyah çaylarının kalitesinin belirlenmesinde çok önemli bir parametre olduğunu tespit etmişlerdir. Buna karşılık siyah çaydaki TF-f ve TF-3'-G ile çayın toplam kalitesi arasında yüksek bir korelasyon saptanmıştır (Liang et al. 2003).

Çay örneklerinin TF bileşiklerinin miktarı hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve sınıf farklılıklarına göre önemli değişiklik göstermiştir (Tablo 8).

Ortodoks yöntemine göre işlenmiş çaylarda tespit edilmiş TF bileşiklerinin miktarı aşağıda belirtildiği gibidir:

TF-f:	1.21-2.23 mg/g ka;
TF-3-G:	2.49-4.34 mg/g ka;
TF-3'-G:	1.56-2.25 mg/g ka;
TF-3,3'-DG:	4.19-5.81 mg/g ka

Çay-Kur yöntemine göre işlenmiş çay örneklerinde ise daha yüksek TF bileşikleri saptanmış olup, düzeyleri aşağıdaki gibidir:

TF-f:	1.48-4.34 mg/g ka
TF-3-G:	2.69-6.10 mg/g ka
TF-3'-G:	1.84-3.64 mg/g ka
TF-3,3'-DG:	4.69-6.12 mg/g ka

Çay-Kur yönteminde, yaprakların fermentasyon öncesi daha iyi parçalanması ve daha fazla hücre öz suyunun dışarı çıkarılabilmesi nedeniyle, fermentasyon sırasında polifenoller daha

iyi oksidasyona uğrar. Ortodoks yönteminde ise rotorvan kullanılmadığından yaprak hücreleri daha az zarar görmekte ve polifenol oksidaz (PPO) enzimi ile fenolik madde teması yeterince gerçekleşmemektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda da Ortodoks yöntemiyle işlenen çayların TF miktarlarının daha düşük olduğu belirtilmiştir.

TF bileşiklerinin çay sınıfına göre değişimi düzenli bir eğilim göstermemekle birlikte 1. sınıf çayların TF düzeyleri, diğer sınıflara göre daha farklı ($p < 0.05$) ve daha fazla bulunmuştur. 2. ve 7. sınıf çayların TF miktarlarının ise 1. sınıf çaylarınkine yakın olduğu gözlenmiştir. 1. ve 2. sınıf çaylar, sınıflandırma sırasında darbe görmemiş ve kırıcıdan geçirilmemiş çaylardır. Bu nedenle, polifenollerinin zarar görmemiş olması bu çayların TF içeriklerinin yüksekliğinin sebeplerinden sayılabilir. Bu çayların, daha küçük çay yapraklarından oluşması ve dolayısıyla daha iyi oksidasyona uğramaları da diğer olası sebeplerdendir. 7. sınıf ise kırıcıdan geçen ve geçmeyen çayların elenmesi sırasında elek altında kalan en ince çaylardır. Bunların TF içeriklerinin yüksekliği ise, kırıcıdan geçmeyen çaylara ait elek altı kısmını daha fazla oranda içermelerinden kaynaklanabilmektedir.

Bu çalışmada, Mayıs dönemi çayları TF-f, TF-3-G ve TF-3'-G açısından önemli ($p < 0.05$) farklılık göstermiştir. Mayıs dönemini Temmuz ve Eylül dönemleri takip etmiştir. TF oluşumundan sorumlu PPO enzimi ile kateşinler arasındaki etkileşim oldukça komplekstir. Buna karşın, daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi taze çay yaprağındaki kateşin miktarlarının mevsimlere bağımlılığı nedeniyle Mayıs dönemi işlenen taze yaprakların kateşin seviyelerinin yüksekliği bu sonuca yol açabilmektedir. Siyah çaydaki TF seviyesi, taze yapraklardaki kateşin içeriğinin yanı sıra yaprakların PPO aktivitesine de bağlıdır. Mayıs dönemi taze çay yapraklarının PPO aktivitesi Temmuz ve Eylül dönemine göre daha yüksek bulunmuştur (Ravichandran ve Parthiban 1998). Bunlara ilave olarak, hasat mevsimine bağlı olarak hava sıcaklığı ve nemdeki değişiklik çayın işleme aşamalarını dolayısıyla TF miktarlarını etkilemektedir. Sud ve Baru (2000) siyah çayın TF bileşiklerinin ve organoleptik özelliklerinin, mevsime bağlı olarak, nisbi nem, yağış düzeyi, sıcaklık ve evaporasyon gibi meteorolojik koşullardaki farklılık nedeniyle, değişiklik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar serin ve nemli dönemlerde TF miktarının azaldığını belirlemişlerdir. Ele alınan çay örneklerinin TF-3,3'-DG miktarı, diğer 3 TF bileşiğinden farklı olarak en fazla Temmuz döneminde bulunmuş olup bunu sırasıyla Eylül ve Mayıs ayları izlemiştir. TF-3,3'-DG'nin oluşumunda esterleşmemiş formdaki kateşinler (EGCG ve ECG) yer alır. Kateşin konsantrasyonlarının PPO aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği model fermentasyon

sisteminde EGC ve EC konsantrasyonundaki artış TF oluşumunu artırmış ancak EGCG ve ECG'deki artış belli bir noktadan sonra enzim inhibisyonu nedeniyle TF miktarında azalmaya yol açmıştır (Robertson 1983). Araştırma kapsamındaki Mayıs dönemi örneklerinde daha fazla TF-f, TF-3-G ve TF-3'-G tespit edilmesi, Mayıs dönemi taze yapraklardaki daha fazla kateşinden kaynaklandığından, kateşinlerden EGCG ve ECG fazlalığı da TF-3,3'-DG miktarını sınırlandırabileceği söylenebilir. TF bileşiklerinin siyah çayın kalitesini belirleyen en önemli parametrelerden biri olması nedeniyle Temmuz dönemi çaylarının kalitesinin daha yüksek olduğu söylenebilmektedir. Diğer taraftan TF-f, TF-3-G ve TF-3'-G bileşikleri açısından da Mayıs dönemi çayları için aynı değerlendirme yapılabilmektedir. Bu konuda kesin bir sonuca varabilmek için hangi TF bileşiğinin çayın duyu kalitesi ile ilişkili olduğunun belirlenmesine gereksinim duyulmaktadır. Ülkelere hatta aynı ülke içinde farklı bölgelere göre değişmek üzere TFDG veya TFDGE (Owuor et al. 2005), TF-3'-G (Wright et al. 2002) veya TF-f ve TF-3'-G'nin birlikte (Liang et al. 2003) çayın duyu kalite özellikleriyle yüksek korelasyon göstermiştir.

5. 5. Çay Örneklerinin Toplam Fenolik Madde İçerikleri

Çay örneklerinde Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik madde analizi sonucunda Ortodoks yöntemine göre işlenen çaylarda 47.05-67.74 mg GAE/g ka, Çay-Kur yöntemine göre işlenen çaylarda ise 53.03-83.40 mg GAE/g ka toplam fenolik tespit edilmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalarda farklı piyasa siyah çay örneklerinde demir tartarat yöntemiyle 50.2-131 mg /g ka (Liang et al. 2003), Folin-Ciocalteu yöntemiyle de 4 farklı markaya ait siyah çayda 80.5-134.9mg GAE/g km (Khokhar ve Magnusdottir 2002) düzeyinde toplam fenolik madde tespit edilmiştir. Tarafımızdan yapılan çalışmada incelenen çay örneklerinin toplam fenolik madde düzeyleri yukarıda belirtilen bu değerler arasında yer almıştır. Diğer taraftan Caffin et al. (2004) siyah çay üretiminin farklı aşamalarında demir tartarat yöntemiyle yaptıkları toplam fenolik madde analizi sonucunda siyah çayda 94.15-170.19mg/g km toplam fenolik madde belirlemişlerdir. Caffin et al. (2004)'ın ulaştığı sonuçların bu araştırmanın bulgularından ve önceki çalışmalardan daha yüksek değerlerin bulunması çayların çeşit, işleme yöntemi ve analiz öncesinde depolanma sürelerindeki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Örneğin, botanik orijini Sri Lanka olan iki farklı yeşil çayın toplam polifenol içeriği (%26 ve 34), orijini Çin olan üç farklı yeşil çayın polifenol içeriğinden (% 21, 21 ve 23) daha fazla bulunmuştur (Yao et al. 2005).

Bu çalışmada, çay örneklerinin toplam fenolik miktarı üzerine kıvrırma yöntemi, çay sınıfı ve hasat döneminin etkisi önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. HPLC ile belirlenen fenolik bileşik miktarlarında görüldüğü gibi , toplam fenolik madde açısından Çay-Kur yöntemiyle işlenmiş çaylarda daha yüksek değerler elde edilmiştir.7 farklı sınıf çay örneklerinin toplam fenolik düzeyleri karşılaştırıldığında 4., 5. ve 6. sınıf çaylar daha düşük düzeyde toplam fenolik madde içermiştir. 7. sınıf çaylar ise en yüksek toplam fenolik madde içeren 1.,2. ve 3. sınıf çayları takip etmiştir. Bu eğilim,çay örneklerinin çay polifenollerinin en büyük kısmını oluşturan TF bileşikleri açısından göstermiş olduğu eğilimle uyum sağlamıştır. Hasat dönemi dikkate alındığında Mayıs dönemine ait çaylarda Temmuz ve Eylül dönemine göre daha fazla toplam fenolik madde (56.26-83.40 mgGAE/g ka) tbulunmuştur. Bu farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Tablo 10). En az toplam fenolik madde miktarı (48.15-61.14 mg GAE/g ka) Eylül dönemi çaylarda saptanmıştır. Bu sonuç siyah çay örneklerinde HPLC ile belirlenmiş olan alkaloid ve fenolik bileşiklerin hasat dönemlerine göre değişimi ile benzerlik göstermiştir.

Bu araştırma sonucuna göre; gerek bireysel fenolik bileşiklerin, gerekse toplam fenolik madde miktarının ay-Kur yöntemiyle işlenen örneklerde daha fazla olması nedeniyle bu yöntemin yaygınlaştırılması önerilebilir. Bu yöntemle Mayıs döneminde üretilen çaylar ise kalitesi en yüksek çaylar olarak değerlendirilebilir. ayların hasat dönemi ve farklı çay sınıflarının fenolik madde ve alkaloid içeriği dikkate alınarak çay harmanları yeniden düzenlenebilir. Ayrıca, bu faktörlerin dikkate alınması durumunda, aylarımızın ihraç edilme potansiyeli artabilecektir. Ülkemizde daha yüksek kaliteli çay üretilmesi açısından daha kaliteli çay veren aylıkların oluşturulması ve hasatta yalnızca 2.5 yapraklık sürgünlerin hasadına dikkat edilmesi büyük önem taşımaktadır..

6. KAYNAKLAR

1. Aherne, S.A. and O'Brian, N.M., 2002. Dietary flavonols: Chemistry, food content and metabolism. *Nutrition*, 18, 75-81.
2. An, B., Kwak, J., Son, J., Park, J., Lee, Jo., C. and Byun, M., 2004. Biological and anti-microbial activity of irradiated green tea polyphenols. *Food Chemistry*, 88, 549-555.
3. Bonnely, S., Davis, A.L., Lewis, J.R. and Astill, C., 2003. A model oxidation system to study oxidised phenolic compounds present in black tea. *Food Chemistry*, 83, 485-492.
4. Borse, B.B., Rao, L.J.M., Nagalakshmi, S. and Krishnamurthy, N., 2002. Fingerprint of black teas from India: identification of the regio-specific characteristics. *Food Chemistry*, 79, 419-424.
5. Caffin, N., D'Arcy, B., Yao, L., and Rintoul, G., 2004. Developing an index of quality for Australian tea. RIRDC Publ. No. 04/033. Queensland-Australia: Australian Government Rural Industries Research and Development Corporation.
6. Ding, Z., Kuhr, S. and Engelhardt, U.H., 1992. Influence of catechins and theaflavins on the astringent taste of black tea brews. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 195, 108-111.
7. Dufresne, C. J., and Farnworth, E. R., 2001. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 404-421.
8. Goto, T., Yoshida, Y., Kiso, M. and Nagashima, H., 1996. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *Journal of Chromatography A*, 749, 295-299.
9. Halder et al., B., Pramanick, S., Mukhopadhyoy, S. and Giri, A.K., 2005. Inhibition of benzo[a]pyrene induced mutagenicity and genotoxicity multiple test systems. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 591-597.
10. Han, C., 1997. Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols. *Cancer Letters*, 114, 153-158.
11. Khokhar, S. and Magnusdottir, S. G. M., 2002. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 565-570.
12. Lee, B. L., and Ong, C. N., 2000. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881, 439-447.

13. Leung, L.K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., Huang, Y. and Chen, Z., 2001. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *American Society for Nutritional Sciences*, 2248-2251.
14. Liang, Y. Lu, J., Zhang, L., Wu, S., and Wu, Y., 2003. Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions. *Food Chemistry*, 80, 283-290.
15. Lin, Y., Juan, I., Chen, Y., Liang, Y., and Lin, J., 1996. Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1387-1394.
16. Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K.P., Dexter, D.T. and Aruoma, O.I., 2005. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Research International*, 38, 357-367.
17. McDowell, I., Bailey, R.G. and Howard, G., 1990. Flavonol glycosides in black tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53, 411-414.
18. Mello, L. D., Alves, A. A., Macedo, D. V., and Kubota, L. T., 2004. Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea. *Food Chemistry*, (Basimda).
19. Miller, N.J., Castelluccio, C., Tijburg, L. and Rice-Evans, C., 1996. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators? *FEBS Letters*, 392, 40-44.
20. Nishitani, E. and Sagesaka, Y.M., 2004. Simultaneous determination of catechins caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17 (5), 675-685.
21. Obanda, M., and Owuor, P. O., 1997. Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 209-215.
22. Obanda, M., Owuor, P. O., and Mang'oka, R., 2001. Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation time and temperature. *Food Chemistry*, 75, 395-404.
23. Owuor, P.O., Obanda, M., Nyirenda, H.E., Mphangwe, N.I.K., Wright, L.P., and Apostolides, Z., 2005. The relationship between some chemical parameters and sensory evaluations for plain black tea (*Camellia sinensis*) produced in Kenya and

comparison with similar teas from Malawi and South Africa. Food Chemistry. Basımda.

24. Pelillo, M., Biguzzi, B., Bendini, A., Toschi, T.G., Vanzini, M. and Lercker, G., 2002. Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins. Food Chemistry, 78, 369-374
25. Perva-Uzunalic, A., Skerget, M., Knez, Z., Weinreich, B., Otto, F. and Grüner, S., 2005. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*) : Extraction efficiency of major catechins and caffeine. Food Chemistry. Basımda.
26. Peterson, J., Dwyer, J., Bhagwat, S., Haytowitz, D., Holden, J., Eldridge, A.L., et al., 2005. Major flavonoids in dry tea. Journal of Food Composition and Analysis, 18, 487-501.
27. Price, K. R., Rhodes, M. J. C. and Barnes, K. A. 1998. Flavonol glycoside content and composition of tea infusions made from commercially available teas and tea products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 2517-2522.
28. Ravichandran, R. and Parthiban, R., 1998. Changes in enzyme activities (polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase) with type of tea leaf and during black tea manufacture and the effect of enzyme supplementation of dhoool on black tea quality. Food Chemistry, 62, 277-281.
29. Rechner, A.R., Wagner, E., VanBuren, L., VanDePut, F., Wiseman, S. and Rice-Evans, C.A., 2002. Black tea represents a major source of dietary phenolics among regular tea drinkers. Free Radical Research, 36 (10), 1127-1135.
30. Robertson, A., 1983. Effects of catechin concentration on the formation of black tea polyphenols during in vitro oxidation. Phytochemistry, 22(4), 897-903.
31. Sanderson, G.W., Berkowitz, J.E., Co, H. and Graham, H.N., 1972. Biochemistry of tea fermentation: Products of the oxidation of tea flavanols in a model tea fermentation system. Journal of Food Science, 37, 399-404.
32. Sharma, V., Gulati, A., Ravindranath, S.D. and Kumar, V., 2005. A simple and convenient method for analysis of tea biogeochemicals by reverse phase HPLC. Journal of Food Composition and Analysis, 18, 583-594.
33. Steinhaus, B. and Engelhardt, U.H., 1989. Theaflavins in black tea. Comparison of the flavonoid and HPLC analysis-preliminary in results. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 188, 509-511.

34. Sud, R.G. and Baru, A.,2000.Seasonal variations in theaflavins, thearubigins, total colour and brightness of Kangra orthodox tea (*Camellia sinensis* (L) O Kuntze)in Himachal Pradesh. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1291-1299.
35. Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y.S., 2005. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*(Basımda).
36. Wang, H., and Helliwell, K., 2001. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Research International*, 34, 223-227.
37. Wang, H., Provan, G.J., and Helliwell, K., 2000. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 152-160.
38. Wright, L.P., Mphangwe, N.I.K., Nyirenda, H.E. and Apostolides, Z., 2002. Analysis of the theaflavin composition in black tea (*Camellia sinensis*) for predicting the quality of tea produced in Central and Southern Africa. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 517-525.
39. Yao, L.H., Jiang, Y.M., Caffin, N., D'Arcy, B., Datta, N., Liu, X., Singanusong, R., and Xu, Y., 2005.Phenolic compounds in tea from Australian supermarkets. *Food Chemistry*.Basımda.
40. Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., et al., 2004. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chemistry*, 84, 253-263.
41. Zuo, Y., Chen, H., and Deng, Y., 2002. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57, 307-316.

7. EKLER

a) Mali Bilanço ve Açıklamalar

Projenin toplam bütçesi :22.000.000.000. TL

Demirbaş Alımı: Ultrasonik banyo, pipet seti ve kesintisiz güç kaynağı: 5.240.860.000 TL

Sarf Malzemesi Alımı (kimyasal madde ve cam malzeme): 16.193.400.000 TL

Kullanılmayan (artan) Ödenek : 565,740,000 TL

b) Makine ve teçhizat durumu: Bu malzemeler demirbaş malzemeler olmakla birlikte gerçekte sınırlı ömrü olan malzemelerdir ve halen her üçü de laboratuvarımızda kullanılmaktadır.

c)Yok

d)Yok

e)Yok