

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**YAŞ ÇAY VE SİYAH ÇAY ATIKLARINDAN MİKRODALGA YÖNTEMİ İLE
KAFEİN VE KATEŞİNLERİN EKSTRAKSİYONU**

DOKTORA TEZİ

Gönül SERDAR

**OCAK 2015
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**YAŞ ÇAY VE SİYAH ÇAY ATIKLARINDAN MİKRODALGA YÖNTEMİ İLE
KAFEİN VE KATEŞİNLERİN EKSTRAKSİYONU**

Gönül SERDAR

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (KİMYA)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 12.01.2015

Tezin Savunma Tarihi : 30.01.2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Münevver SÖKMEN

Trabzon 2015

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Gönül SERDAR Tarafından Hazırlanan

**YAŞ ÇAY VE SİYAH ÇAY ATIKLARINDAN MİKRODALGA YÖNTEMİ İLE
KAFEİN VE KATEŞİNLERİN EKSTRAKSİYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 13/01/2015 gün ve 1585 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınav sonunda**

DOKTORA TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Hasan Basri ŞENTÜRK

Üye : Prof. Dr. Münevver SÖKMEN

Üye : Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU

Üye : Prof. Dr. Durişehvar ÜNAL

Üye : Prof. Dr. Miraç OCAK

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Yaş Çay ve Siyah Çay Atıklarından Mikrodalga Yöntemi ile Kafein ve Kateşinlerin Ekstraksiyonu” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Doktora boyunca burslu olarak çalıştığım 00932.STZ.2011-1 SAN-TEZ projesi ekibine ve çay fabrikası ortakları Rize Ticaret Borsası Başkanı Sn. Mehmet ERDOĞAN (ORÇAY), Sn. Ali BAYRAMOĞLU (FİLİZ ÇAY), Sürmene Belediye Başkanı Sn. Rahmi ÜSTÜN (SÜRÇAYSAN) ve Sn. Murat ÜSTÜN’e (SÜRÇAYSAN) teşekkürü bir borç bilirim. Projenin fikir babası ÇAYKUR Eski Genel Müdürü Merhum Tuncer ERGÜVEN’e saygılarımı sunarım. Proje işlerinde yardımlarını esirgemeyen Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı uzman yardımcısı Sn. Haydar Ali BAŞ’a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenen, çalışmalarımın başlangıcından bitimine kadar çok değerli bilgi birikimlerini, destek ve yardımlarını esirgemeyen, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu sonsuz hoşgörü ve sabrından dolayı çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Münevver SÖKMEN’e, yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Ezgi DEMİR, Serhat BAYRAK, Melek KOÇ, Cansu ALBAY ve İlknur ALTIN’a, Murat ÖZTÜRK’e tezim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Temel Tıp Bilimleri Farmakoloji Bölümü akademik personelleri başta Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU olmak üzere Prof. Dr. Ersin YARIŞ, Doç. Dr. Mine DUMAN, Uzman Dr. İlknur ERKÖSEOĞLU, Arş. Gör. Duygun ALTINTAŞ ve Gamze KAPUCU’ya, hayatımın her aşamasında beni destekleyen, büyük emeği olan ve her zaman sevgisini gösteren sevgili babam Hasan Basri HATİPOĞLU’na, canım annem Fatma HATİPOĞLU’na ve sevgili kardeşlerime, doktora çalışmam boyunca tecrübesini, sabrını ve sevgisini esirgemeyen sevgili eşim Prof. Dr. Bedri SERDAR’a ve canım kızım Elif Alya SERDAR’a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Gönül SERDAR
Trabzon 2015

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum ‘‘Yaş ay ve Siyah ay Atıklarından Mikrodalga Yöntemi ile Kafein ve Kateşinlerin Ekstraksiyonu’’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Münevver SÖKMEN’in sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

09/01/2015

Gönül SERDAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XIV
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.1.1. Çay Tipleri	3
1.1.1.1. Yeşil Çay.....	4
1.1.1.2. Siyah Çay	5
1.1.1.3. Oolong Çay	8
1.1.2. Çayın Bileşimi	9
1.1.2.1. Çayın Genel Bileşimi	9
1.1.2.2. Çayın Fenolik Madde Bileşimi	10
1.1.2.2.1. Flavonol Bileşikler.....	11
1.1.2.2.2. Flavan-3-ollar	12
1.1.2.2.3. Kateşinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	15
1.1.2.3. Çayda Bulunan Alkaloid Bileşikler	16
1.1.3. Çaydan Kafein ve Kateşinlerin Geleneksel Yöntemlerle Ekstraksiyonu.....	18
1.1.4. Mikrodalga Yardımlı Ekstraksiyon (ME).....	21
1.1.4.1. Mikrodalga Ekstraksiyonun Önemli Parametreleri	24
1.1.4.1.1. Çözücü Seçimi ve Oranı	24
1.1.4.1.2. Ekstraksiyon Zamanı	25
1.1.4.1.3. Mikrodalga Gücü ve Ekstraksiyon Sıcaklığı	26
1.1.4.1.4. Yüzey Alanı ve Su Miktarı	26
1.1.4.2. Çay Örneklerinin Mikrodalga Ekstraksiyonu	28
1.1.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE).....	29

1.1.5.1.	Süperkritik Akışkanlar ve Özellikleri	29
1.1.5.2.	Çay Örneklerinin Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu.....	33
1.1.6.	Çay Fenoliklerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler	34
1.1.6.1.	Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	345
1.1.7.	Dünyadaki Pazarı	366
1.1.8.	Çalışmanın Amacı.....	38
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	41
2.1.	Kullanılan Kimyasallar	41
2.2.	Kullanılan Cihazlar	41
2.3.	Çay Örnekleri	42
2.4.	Çay Örneklerinin Toplanması ve Tanımlanması	43
2.5.	Kafein ve Kateşinlerin İzolasyonu İçin Kullanılan Ekstraksiyon Yöntemleri	44
2.5.1.	Mikrodalga Ekstraksiyonu	45
2.5.2.	Mikrodalga Ekstraksiyonu Sonrası Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	46
2.5.2.1.	SFE Optimizasyonu	46
2.5.2.2.	SFE ile Kafein ve Kateşinlerin Ayrılması.....	47
2.6.	Kromatografik Analizler	48
2.6.1.	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Analizleri	48
2.6.2.	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) Analizleri	49
3.	BULGULAR.....	50
3.1.	Mikrodalga Ekstraksiyonu	50
3.1.1.	2013 Yılı Bulguları	50
3.1.1.1.	Ekstrakt Verimleri.....	50
3.1.1.2.	TLC Analizleri	55
3.1.1.3.	HPLC Yönteminin Validasyonu	57
3.1.1.4.	2013 Yılı Örneklerinin HPLC Kromatogramları	59
3.1.1.5.	Kateşin Ekstraktlarının İçerikleri	74
3.1.2.	2014 Yılı Bulguları	83
3.1.2.1.	Ekstakt Verimleri	83
3.1.2.2.	Kateşin Ekstraktlarının İçerikleri	87
3.2.	SFE Ekstraksiyonu Bulguları.....	96
3.2.1.	SFE ile Yeşil Çaydan Kafein ve Kateşinlerin Ayrımı	96
3.2.2.	SFE ile Atık ve Kafein Tozundan Kafein ve Kateşinlerin Ayrımı	99
3.2.3.	SFE Ekstraktlarının HPLC Analizleri ve Kateşin İçerikleri	100

3.2.4.	SFE Genel Değerlendirme	102
4.	TARTIŞMA	104
4.1.	Mikrodalga Ekstraksiyon Yönteminin Seçilmesi	104
4.2.	Kromatografik Analizler	104
4.3.	Çay Örneklerinin Yıllara ve Sürümlere Göre Mikrodalga Ekstraksiyon Verilerinin Değerlendirilmesi	105
4.4.	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE) Yönteminin Optimizasyonu	111
5.	SONUÇLAR	1154
6.	KAYNAKLAR	1155
	ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

YAŞ ÇAY VE SİYAH ÇAY ATIKLARINDAN MİKRODALGA YÖNTEMİ İLE
KAFEİN VE KATEŞİNLERİN EKSTRAKSİYONU

Gönül SERDAR

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Münevver SÖKMEN
2015, 125 Sayfa

Bu çalışma kapsamında 2013-2014 yıllarında farklı çay örneklerinin (yaş çay, siyah çay atığı ve kafein tozu), farklı hasat dönemlerinde (I., II. ve III. sürüm) içerdikleri kafein ve kateşinlerin mikrodalga yöntemiyle ekstraksiyonu incelenmiştir. Yaş çay örnekleri yaş, kuru ve dondurulmuş olarak işlenerek örnek doğası da araştırıldı. Örnekler su, sitrik asit-su ve etanol-su olmak üzere üç farklı çözücü sistemi ile 600 W gücünde çalıştırılan kapalı bir mikrodalga sisteminde ekstre edildi. Ekstrakt verimleri açısından etkin çözücü sistemleri belirlendi. 2013-2014 yıllarında yapılan örneklemelerde örneklerin standart bir kateşin ve kafein içeriğinin olmadığı yıllara ve yaşanan mevsim şartlarına göre önemli farklılıklar gösterdiği belirlendi. Ayrıca sürümler arasında da net bir eğilimi gözlenmedi. Ekstrakt veriminin yüksek olması kateşinlerin seçici olarak ekstre edildiği anlamını taşımamaktadır. HPLC analizleri göstermiştir ki bazı durumlarda daha düşük ekstrakt verimi elde edilmesine karşın ekstraktın kateşin içeriği çok daha yüksek olabilmektedir. Kurutulmuş çay ve çay atıklarından mikrodalga ekstraksiyonu sonrası kafein ve kateşinlerin ayrılması için yeni bir süperkritik ekstraksiyon (SFE) yöntemi kullanıldı. Kateşinler yönünden zengin (I.sürüm yaş, kuru, dondurulmuş çay) bir örnek ve kafein yönünden zengin (I.sürüm atık çay ve kafein tozu) bir örnek önce mikrodalga yöntemiyle ekstre edildi. Bu ekstraktan organik çözücü kullanılmaksızın 250 bar, 60 °C ve 3 saatlik CO₂-SFE ile kafeinin tamamı ekstre edildi. Aynı SFE şartları altında modifiyer olarak 0,5 mL/dk etanolün kullanılmasıyla örnekten kateşinlerde ayrıldı.

Anahtar Kelimeler: Yaş Çay, Siyah Çay Atığı, Kafein Tozu, Kateşin, Kafein, ME, SFE

PhD. Thesis

SUMMARY

Gönül SERDAR

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Programme
Supervisor: Prof. Dr. Münevver SÖKMEN
2015, 125 Pages

CAFFEINE AND CATECHINS EXTRACTION FROM FRESH TEA AND BLACK TEA WASTES USING MICROWAVE METHOD

In this study, microwave extraction of caffeine and catechin from different tea samples (Fresh tea, black tea waste and caffeine dust) collected in different harvesting periods in 2012-2014 years (I., II. and III. collection) and their constituents in the extracts have been investigated. The nature of samples was also studied processing the fresh tea samples as fresh, dry or frozen. Samples were extracted employing three different solvent system namely water, citric acid-water and ethanol-water in a close system microwave extractor at 600 W power. The most effective solvent system was determined from extract yields. It was determined that samples collected in 2013-2014 sampling period have not expressed a standard catechin and caffeine content and they exposed important variation related to year and seasonal conditions. High extraction yield doesn't mean catechins are selectively extracted. HPLC analyses showed that an extract with a lower extract yield might have higher catechin content. A new supercritical fluid extraction (SFE) method was used for the separation of caffeine and catechines from the extract obtained with microwave extraction of dried green tea and tea waste. Initially, a catechin rich sample (fresh, dried, frozen green tea samples collected in I. collection) and a caffeine rich sample (tea waste and caffeine dust collected in I. collection) were extracted with microwave method. All caffeine was separated with an organic solvent free CO₂-SFE at 250 bar, 60 °C for 3 hours. Catechins were separated from the sample using 0.5 mL/min. ethanol as modifier under the same SFE conditions.

Key Words: Fresh Tea, Black Tea Waste, Caffeine Dust, Catechin, Caffeine, ME, SFE

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Yeşil çay üretimi.....	4
Şekil 1.2. Oolong çay üretim basamakları.....	9
Şekil 1.3. Flavonolların yapısı	11
Şekil 1.4. Flavonol glikozidlerin yapısı	12
Şekil 1.5. Kateşin türevleri.....	12
Şekil 1.6. Kateşinlerin çay bitkisindeki sentezi	13
Şekil 1.7. Çay teaflavinlerinin kimyasal yapıları.....	14
Şekil 1.8. Alkaloidlerin kimyasal yapısı	17
Şekil 1.9. Çay ekstraktlarını hazırlama yolları.....	19
Şekil 1.10. Geleneksel ve mikrodalga ısıtmada ısı dağılımı modelleri.....	23
Şekil 1.11. Saf bir madde için sıcaklık-basınç diyagramı.....	30
Şekil 1.12. İki faz bölgesindeki CO ₂ 'in artan basınç ve sıcaklıkla süperkritik hale geçişi.....	30
Şekil 1.13. HPLC cihazının genel görüntüsü.....	35
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan örnekler	43
Şekil 2.2. Mikrodalga ekstraksiyon cihazının görünümü	45
Şekil 2.3. SFE'de izlenen ekstraksiyon basamakları	48
Şekil 3.1. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların farklı çözücülerdeki % kafein verimleri	51
Şekil 3.2. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm çay atıklarının farklı çözücülerdeki % kafein verimleri.....	52
Şekil 3.3. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kafein tozlarının farklı çözücülerdeki % kafein verimleri.....	52
Şekil 3.4. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların farklı çözücülerdeki % kateşin verimleri.....	53
Şekil 3.5. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm çay atıklarının % kateşin miktarları.....	54
Şekil 3.6. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kafein tozlarındaki % kateşin miktarları.....	54
Şekil 3.7. Kateşin standartlarının ve 2013 yılı birinci sürüm yaş çay örneklerinin, su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının TLC analizleri (1SY: Birinci sürüm yaş, 1SK: Birinci sürüm kuru, 1SD: Birinci sürüm dondurulmuş)	55

Şekil 3.8.	2013 Yılı ikinci sürüm yaş çay örneklerinin, su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının TLC analizleri (2SY: İkinci sürüm yaş, 2SK: İkinci sürüm kuru, 2SD: İkinci sürüm dondurulmuş).....	56
Şekil 3.9.	2013 Yılı üçüncü sürüm yaş çay örneklerinin, su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının TLC analizleri (3SY: Üçüncü sürüm yaş, 3SK: Üçüncü sürüm kuru, 3SD: Üçüncü sürüm dondurulmuş).....	56
Şekil 3.10.	2013 Yılı birinci, ikinci, üçüncü sürüm siyah çay atıklarının su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının TLC analizleri (1SA: Birinci sürüm atık, 2SA: İkinci sürüm atık, 3SA: Üçüncü sürüm atık).....	57
Şekil 3.11.	2013 yılı birinci, ikinci, üçüncü sürüm kafein tozlarının, su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının TLC analizleri (1KT: Birinci sürüm kafein tozu 2KT: İkinci sürüm kafein tozu 3KT: Üçüncü sürüm kafein tozu)	57
Şekil 3.12.	Standartların HPLC kromatogramı ($\lambda=278$ nm) GA: Gallik asit, EGC: Epigallokateşin, C: Kateşin, EC: Epikateşin, EGCG:Epigallokateşingallat.....	58
Şekil 3.13.	GA, Kafein, EGC, C, EC ve EGCG standartlarının DAD spektrumları.....	59
Şekil 3.14.	2013 Yılı birinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	60
Şekil 3.15.	2013 Yılı birinci sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çayların sitrik asit-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	61
Şekil 3.16.	2013 Yılı birinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların etil alkol-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	62
Şekil 3.17.	2013 Yılı birinci sürüm atığın su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerindeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	63
Şekil 3.18.	2013 Yılı birinci sürüm kafein tozunun su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerindeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	64
Şekil 3.19.	2013 Yılı ikinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	65
Şekil 3.20.	2013 Yılı ikinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların sitrik asit-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	66
Şekil 3.21.	2013 Yılı ikinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların etil alkol-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	67
Şekil 3.22.	İkinci sürüm atığın su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	68
Şekil 3.23.	2013 Yılı ikinci sürüm kafein tozunun su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	69
Şekil 3.24.	2013 Yılı üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların, su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	70

Şekil 3.25. 2013 Yılı üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların sitrik asit-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	71
Şekil 3.26. Üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların etil alkol-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	72
Şekil 3.27. 2013 Yılı üçüncü sürüm atığın su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerindeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	73
Şekil 3.28. 2013 Yılı üçüncü sürüm kafein tozunun su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerindeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları	74
Şekil 3.29. 2013 Yılı birinci sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin farklı çözücülerle 1 g örnekten ekstre edilen kateşin miktarları.....	75
Şekil 3.30. 2013 Yılı birinci sürümde farklı çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları	76
Şekil 3.31. 2013 Yılı birinci sürümde farklı çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları	76
Şekil 3.32. 2013 Yılı ikinci sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin farklı çözücülerle 1 g örnekten ekstre edilen kateşin miktarları.....	77
Şekil 3.33. 2013 Yılı ikinci sürümde farklı çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları	78
Şekil 3.34. 2013 Yılı ikinci sürümde farklı çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları	78
Şekil 3.35. 2013 Yılı üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin farklı çözücülerle 1 g örnekten ekstre edilen kateşin miktarları.....	79
Şekil 3.36. 2013 Yılı üçüncü sürümde farklı çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları	80
Şekil 3.37. 2013 Yılı üçüncü sürümde farklı çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları	80
Şekil 3.38. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların farklı çözücülerdeki % kafein verimleri	84
Şekil 3.39. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm çay atıklarının farklı çözücülerdeki % kafein verimleri.....	85
Şekil 3.40. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kafein tozlarının farklı çözücülerdeki % kafein verimleri.....	85
Şekil 3.41. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların farklı çözücülerdeki % kateşin verimleri.....	86
Şekil 3.42. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm siyah çay atıklarının farklı çözücülerdeki % kateşin verimleri.....	87
Şekil 3.43. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kafein tozlarının farklı çözücülerdeki % kateşin verimleri.....	87
Şekil 3.44. 2014 Yılı birinci sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin farklı çözücüler ile 1 g örnekten ekstre edilen kateşin miktarları.....	88

Şekil 3.45. 2014 Yılı birinci sürümde çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları	89
Şekil 3.46 2014 Yılı birinci sürümde farklı çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları	89
Şekil 3. 47. 2014 Yılı ikinci sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin farklı çözücülerle 1 g örnekten ekstre edilen kateşin miktarları.....	90
Şekil 3.48. 2014 Yılı ikinci sürümde farklı çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları	91
Şekil 3.49. 2014 Yılı ikinci sürümde çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları	91
Şekil 3.50. 2014 Yılı üçüncü sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çayların farklı çözücülerle 1 gram örnekten ekstre edilen kateşin miktarları	92
Şekil 3.51. 2014 Yılı üçüncü sürümde farklı çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları	93
Şekil 3. 52. 2014 Yılı üçüncü sürümde farklı çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları	93
Şekil 3.53. 2014 Yılı birinci sürüm kuru, yaş ve dondurulmuş yaş çay örneklerinin etil alkol-su ile ME sonrası SFE ile elde edilen ekstrakt verimleri	97
Şekil 3.54. 2014 Yılı birinci sürüm örneklerinin ME sonrası sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve ME sonrası SFE ile elde edilen kafein verimleri	98
Şekil 3. 55. 2014 Yılı birinci sürüm örneklerinin ME sonrası sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve ME sonrası SFE ile elde edilen kateşin verimleri.....	98
Şekil 3.56. 2014 Yılı birinci sürüm siyah çay atığı ve kafein tozu örneklerinin ME sonrası SFE ile elde edilen ekstrakt verimleri	99
Şekil 3.57. 2014 Yılı birinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin SFE ile ayrılan kateşin ekstraktının HPLC kromatogramları.....	100
Şekil 3.58. 2014 yılı I. Sürüm atık ve kafein tozu örneklerinin SFE ile ayrılan kateşin ekstraktının HPLC kromatogramları	101
Şekil 3.59. 2014 Yılı birinci sürüm yaş çay örneklerinin SFE ile kateşin bileşenlerin miktarları.....	101
Şekil 3.60. 2014 Yılı birinci sürüm atık ve kafein tozu örneklerinin SFE ile kateşin bileşenlerin miktarları.....	102
Şekil 4.1. 2013 Yılı örneklerinin farklı çözücülerdeki mikrodalga ekstraksiyonu kafein verimleri.....	106
Şekil 4.2. 2014 Yılı örneklerinin farklı çözücülerdeki mikrodalga ekstraksiyonu kafein verimleri.....	107
Şekil 4.3. 2013 Yılı örneklerinin farklı çözücülerdeki mikrodalga ekstraksiyon kateşin verimleri	109
Şekil 4.4. 2014 Yılı örneklerinin farklı çözücülerdeki mikrodalga ekstraksiyon kateşin verimleri	110

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Çay-Kur tarafından işlenen siyah çayın sınıflandırılması	8
Tablo 1.2. Kateşinlerin önemli fiziksel özellikleri.....	16
Tablo 1.3. Kafein, kateşin ve theanin arasındaki fiziksel ve kimyasal farklar	16
Tablo 1.4. Yeşil çaydaki ana bileşiklerin bileşimi.....	20
Tablo 1.5. Yoğunluk, viskozite ve difüzyon hızları değerlerinin değişimi.....	31
Tablo 1.6. Süperkritik akışkanların fiziksel özellikleri.....	32
Tablo 1.7. Bazı ticari kateşin ürünleri ve fiyatları	37
Tablo 2.1. Kullanılan kimyasallar, kullanım amaçları ve markaları.....	41
Tablo 2.2. Kullanılan cihazlar, malzemeler ve markaları	42
Tablo 3.1. Optimize edilen HPLC yönteminin parametreleri.....	58
Tablo 3.2. 2013 Yılı yeşil çay ekstraktlarının içerikleri	81
Tablo 3.3. 2013 Yılı çay atığı ekstraktlarının içerikleri.....	82
Tablo 3.4. 2013 yılı kafein tozu ekstraktlarının içerikleri.....	83
Tablo 3.5. 2014 Yılı yeşil çay ekstraktlarının içerikleri	94
Tablo 3.6. 2014 Yılı çay atığı ekstraktlarının içerikleri.....	95
Tablo 3.7. 2014 Yılı kafein tozu ekstraktlarının içerikleri.....	95
Tablo 3.8. 2014 yılı örneklerinin SFE ile elde edilen ekstraktların içerikleri.....	102

SEMBOLLER DİZİNİ

C	: Kateşin
C18	: Oktadesil
CG	: Kateşin Gallat
CO ₂	: Karbondioksit
CoA	: Koenzim-A
CTC	: Cut-Tear-Curl
DAD	: Diyot Serili Dedektör
DMF	: N,N-Dimetilformamid
EC	: Epikateşin
ECG	: Epikateşin gallat
EGC	: Epigallo kateşin
EGCG	: Epigallo kateşin gallat
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç İdaresi
GA	: Gallik Asit
GC	: Gallo Kateşin
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HP-TLC	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
KİK	: Kamu İhale Kanunu
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MeOH	: Metanol
MPa	: Mega Paskal
PA	: Poliamid
POD	: Peroksidaz
PPO	: Polifenol oksidaz
SAN-TEZ	: Sanayi Bakanlığı Projesi
SFE	: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
SÜRÇAYSAN	: Sürmene Çay Fabrikası
TF	: Teaflavin
TF-3,3'-DG	: Teaflavin-3,3'-Digallat

TF-3'-G	: Teaflavin-3'-Gallat
TF-f	: Basit Teaflavin
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
TR	: Tearubigin
UV	: Ultraviyole

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Çay (*Camellia sinensis*) Doğu Asya bölgesine özgü, nemli iklimlerde yetişen, yaprak ve tomurcukları içecek maddesi üretmekte kullanılan “*Theaceae*” familyasının “*Thea*” cinsinden “*sinensis*” türünde genellikle çalı formunda olan bir bitkidir (*Thea sinensis*). Botanikçiler tarafından “*Camellia sinensis*” adıyla da anılan bu bitkinin bilinen 3 çeşidi vardır (Altan, 2003). Bunlardan ilki başlıca Çin ve Japonya’da yetiştirilen (Eski Sovyetler Birliği, Türkiye, İran ve daha kuzey ülkelerinde ve Hindistan’ın deniz seviyesinden yüksek bölgelerinde) soğuğa dayanıklı olan Çin çeşidi (*Thea sinensis var. sinensis*)’dir. İkincisi Sri Lanka, Hindistan, Bangladeş ve Endonezya gibi tropik iklim bölgelerinde yetişen Assam çeşidi (*Thea sinensis var. assamica*) ve üçüncü olarak da var. *irrawadiensis* çeşididir (*Camellia sinensis var. irrawadiensis*) (Spille, 1997). Türkiye’de yetiştirilen çaylar genellikle saf olmayıp karışık melezler halindedir. Sovyetler Birliği’nden getirilerek ülkemizde tarımı yapılan çay bitkileri *Thea sinensis var. assamica X Thea sinensis var. sinensis* melezidir (Demir, 2002).

İlk belgelerde, çayın tadının belirgin şekilde acı olduğu bildirilmiştir. O zamanlarda çaya ‘acı çay’ da denilmesi, bu ifadeyi desteklemektedir. Çayın popülaritesi gün geçtikçe artmış ve tıbbi çay, tonik çay’a dönüşmüştür. İkisi arasındaki fark ise; tıbbi çay tedavi edici olarak kabul görülürken, tonik çay insan sağlığı ve ileride oluşabilecek rahatsızlıklara karşı korumak amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Zaten Çin halk tıbbının dayandığı ve benimsediği temellerden biri de sağlığı kaybetmeden korumak olduğundan, çayın bu kullanımı dikkat çekici olmuştur. O günden sonra, çay hem içecek hem de bazı durumlarda ilaç olarak kabul görmüş bir bitki olarak günlük hayattaki yerini almıştır (Ağca, 2006; Fisunoğlu ve Besler, 2008).

Çay, Çin de 4. yy’da ilk kez kayıt altına alınmıştır (Hang 1985). Çin’ de keşfedilmiş ilk tıbbi içecek olduğu söylenir ve dünya çapında tüketimi suyun ardından ikinci sıradadır. Yüzyıllar boyunca fazlaca korunarak sadece Çin’de yetiştirilen çay bitkisinin tohumları, 1840 yılında İskoç botanikçi Robert Fortune tarafından kaçırılmış ve böylece bitkinin kültür çalışmaları da dünyada yayılmıştır (Nabors, 2004). Günümüzde, ana çay üreticileri ekvatorial bölgelerde yoğunlaşmıştır (Quan, 2005). Dünya üzerinde çay bitkisi, kuzey

yarım kürede yaklaşık 42 enlem derecesinden, güney yarım kürede 27 enlem derecesine kadar olan kuşak üzerinde yetiştirilmektedir. Yağışın bol ve iklimin sıcak olduğu bölgelerde yetiştirilmesine rağmen dünyada çay üretiminin ekonomik olarak yapıldığı yerler sınırlıdır. Hindistan, Çin, Sri Lanka, Endonezya, Kenya ve Japonya çay bitkisinin yaygın olarak yetiştirildiği ve çay üretiminin yoğun olarak yapıldığı ülkelerdir. Bu ülkeler ve Türkiye ile birlikte 30'a yakın ülkede ekonomik düzeyde çay üretimi gerçekleştirilmektedir (Çaykur, Çay Sektörü Raporu 2009).

Türkiye'de çay bitkisi Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, Gürcistan sınırından başlayan ve batıda Fatsa'ya kadar uzanan alan içerisinde yetiştirilmektedir. Bu bölge içerisinde başta Rize olmak üzere Ordu, Giresun, Trabzon ve Artvin illerinde çay yetiştiriciliği yapılmaktadır. Sahilden yer yer 30 km içerilere kadar giren, ortalama 8 km derinliğinde olan Araklı-Karadere sınırına kadar uzanan alan, çay yetiştiriciliği için en elverişli bölge olması nedeniyle birinci sınıf çay bölgesi olarak kabul edilmektedir. Bahsedilen bölge içerisinde çaycılık, sahilden 400-500 m yüksekliğe kadar birbirine eklenerek yer yer bir çay denizi oluşturmakta ve kimi yerlerde 1000 metre yükseklikte dahi görülmektedir. Araklı-Karadere'den başlayarak Fatsa ilçesine kadar uzana bölge çay yetiştiriciliği yönünden göreceli olarak daha az ekonomik bulunan bölge, ikinci sınıf çay bölgesi olarak tanımlanmaktadır (Demir, 2002). Çay Doğu Karadeniz Bölgesinde yaşayan halkın en önemli gelir kaynaklarından birisini teşkil etmektedir.

Çay yetişmesine etki yapan en önemli etken iklim ve topraktır. Yıllık sıcaklık ortalamasının 14 °C'nin altına düşmemesi, toplam yıllık yağışın 2000 mm'den az olmaması ve aylara göre dağılımının düzenli olması, bağıl nem oranının ise en az %70 olması, çay bitkisinin normal gelişimi için gerekli olan koşullardır. Çay bitkisi kumdan kile değin değişen yapıdaki asit tepkimeli topraklarda yetişebilmektedir (Çaykur, Çay Sektörü Raporu 2009).

Dünya'da çay ithalatı, hem çay üreticisi olan ülkeler, hem de çay üreticisi olmayan ülkeler tarafından yapılmaktadır. FAO'nun (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) 2014 yılı verilerine göre, toplam çay ithalatı yıllık 1.582.222 ton'dur. İthalatta en büyük paya sahip ülkeler arasında sırasıyla Avrupa Birliği Ülkeleri, Rusya, Pakistan, ABD, Japonya, Mısır ve Kanada yer almaktadır (FAO Raporu, 2014).

Dünya'da toplam ihracat miktarı ise 2014 yılı verilerine göre, yıllık 1.854.318 ton'dur. İhracatta en büyük paya sahip ülkeler arasında Kenya, Sri Lanka, Çin, Hindistan, Vietnam, Avrupa Birliği Ülkeleri, Endonezya ve Arjantin gibi ülkeler ilk sıraları

almaktadır (FAO Raporu, 2014). Dünya çaycılığında özellikle üretici ülkelerin birbirlerinin çaylarını harmanlamak suretiyle yada tüketici ülkelerin ithal ettikleri çayı yeniden harmanlayıp ihraç etme işlemine tekrar ihraç (Re-export) denir. Tekrar ihraç (Re-export) yapan en önemli tüketici ülke İngiltere'dir. Yıllık kişi başına çay tüketim miktarları yüksek olan ilk beş ülke ise; İrlanda (3,2 kg), İngiltere (2,6 kg), Kuveyt (2,5 kg), Türkiye (2,3 kg) ve Katar (2,0 kg)'dır (Çaykur, Çay Sektörü Raporu 2009). Türkiye, çay tarım alanlarının genişliği bakımından, dünyada üretici ülkeler arasında 7. sırada, kuru çay üretimi yönünden de 5. sırada, yıllık kişi başına tüketim bakımından ise 4. sırada yer almaktadır (Özden, 2009). Türkiye'de çay sektörü diğer üretici ülkelerle karşılaştırıldığında nispeten yeni bir faaliyet görünümünde olmasına rağmen kısa süre içerisinde büyük gelişme göstermiştir.

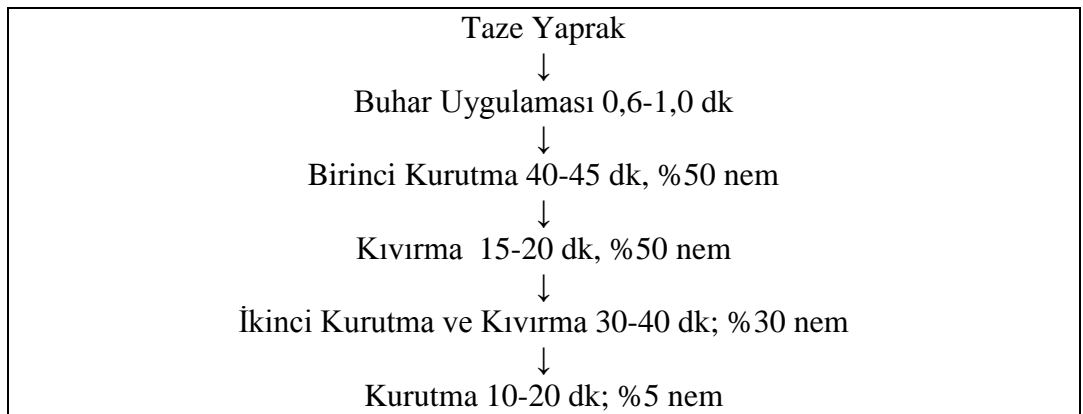
1950'li yıllarda kuru çay üretimi 25.000 tonun altında gerçekleşirken 2004 yılından itibaren de 200 bin tonun üzerine çıkmıştır. Bugün Türkiye çay üretiminde önemli üretici ülkeler arasında yer almakta ve üretim miktarı açısından Çin, Hindistan, Sri Lanka, Kenya ve Endonezya'dan sonra altıncı sırada bulunmaktadır. 1984 Yılına kadar devlet tekeli altında sürdürülen çay işletmeciliği 1988 Aralık ayında 3092 sayılı "Çay Kanunu" ile serbest bırakılmıştır. 1994 yılında Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü, çıkarılan 4046 sayılı kanun ile KİK kapsamından çıkarılarak İktisadi Devlet Teşekküller arasına alınmış, 2002 yılında ise Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın kuruluşu olmuştur. Bugün sektörde Çaykur'un 47 adet yaş çay işleme fabrikası, 3 adet paketleme fabrikası özel sektörün ise biri kooperatif olmak üzere yaklaşık 229 adet yaş çay işleme fabrikası bulunmaktadır (Çaykur, Çay Sektörü Raporu 2009).

1.1.1. Çay Tipleri

Dünya çay üretiminin % 70'i siyah, % 23'ü yeşil, % 7'si oolong, beyaz çay ve diğer çay çeşitlerinden oluşmaktadır (FAO, 2006). Dünyada ticari çaylar siyah, yeşil ve oolong olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır (Mukhtar ve Ahmad, 2000). Bu çayların üretimi, bileşimi ve özellikleri birbirinden farklıdır. Her üç tip çayda *Camellia sinensis* bitkisinden tomurcuk ve ilk 2 yaprağından elde edilmektedir.

1.1.1.1. Yeşil Çay

Yeşil çay, geleneksel alkolsüz bir içecek olarak Çin ve Japonya'da yaygın olarak tüketilmektedir (Yoshida vd., 1999). Yeşil çay, taze çay yapraklarının fermentasyona uğratılmadan (kateşinlerin enzimatik oksidasyonuna izin verilmeden) üretilen bir çay çeşididir. Yeşil çay üretimi için iri yapraklı (Assam) çay çeşitlerine göre genelde ufak yapraklı daha az kateşin ve kafein ve daha fazla amino asit içeren (Çin) çay çeşitleri daha uygundur (Gulati vd., 2003). Yeşil çayın üretim aşamaları Şekil 1.1'de gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü üzere, yeşil çay üretiminde ilk ve en önemli aşama ısı uygulaması ile yapraktaki enzim aktivitesini durdurmaktır. Bu amaçla uygulanan sıcaklık ve süre yaprak pozisyonu, mevsim ve çeşit gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, körpe yapraklarda polifenol oksidaz (PPO) aktivitesi olgun yapraklara göre daha fazla olduğu için bunlara daha yüksek sıcaklıkta ve daha uzun sürede ısı işlem uygulanmaktadır (Zhen, 2002). Yeşil çayın rengi kateşinlerin oksidasyona uğramaması nedeniyle oolong ve siyah çaydan farklı olarak tamamen yeşildir. Yeşil çayın antioksidatif ve antikarsinojenik özelliklere sahip bileşikleri arasında yer alan ve yeşil çayın kütleye %20'sini oluşturan kateşinlerin, oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (Wang ve Helliwell, 2000). Yeşil çayın toplam antioksidan potansiyelinin %68'inin kateşinlerden, %30'unun ise tek başına EGCG'dan kaynaklandığı belirtilmektedir (Stewart vd., 2005). Yeşil çay üretimi Şekil 1.1'de verilmiştir (Mizukami vd., 2006).



Şekil 1.1. Yeşil çay üretimi

1.1.1.2. Siyah çay

Siyah çay, *Camellia sinensis* (Linneaus) O. Kuntze türünün farklı varyetelerinin yaş çay yaprağı (iki buçuk yaprak), tomurcuk ve bunlara bitişik taze sap kısımlarının uygun yöntemlerle işlenmesiyle elde edilen üründür. Siyah çay üretimi için çoğunlukla polifenol içerikleri daha fazla olan Assam çeşitleri kullanılmaktadır (Astill vd., 2001). Üretim aşağıda detaylı olarak belirtildiği üzere soldurma, kıvrırma, fermentasyon ve kurutma/derecelendirme olarak 4 farklı aşama sonucunda gerçekleştirilmektedir (Tomlins ve Mashingaidze 1997; Łuczaj ve Skrzydlewska, 2005; Borah ve Bhuyan, 2005; Muthumani ve Senthil-Kumar, 2007a).

Soldurma: Yaş çayın ihtiva ettiği %70-80 oranındaki suyun %50-55'e düşürülmesi yani taze çay yapraklarının kısmi olarak kurutulması işlemini oluşturur. Bu işlem geleneksel olarak, yapraklarda istenilen nem düzeyine ulaşılan kadar ortam havasının veya ısıtılmış havanın yaprakların arasından geçirilmesi ile gerçekleştirilir (Tomlins ve Mashingaidze, 1997). Çayların solma süresi yaş çayın tazeliği ve ıslaklık durumuna, uygulama koşullarına (kullanılan havanın sıcaklığı, hızı, yaprak serme kalınlığı gibi) koşullarına göre değişir. Soldurulmuş çay yaprağında yapraktaki su kaybına bağlı olarak hücre duvarlarının geçirgenliği artar (Kaçar, 1987; Zhen, 2002) ve yaprak hücresinde ayrı bölümlerde yer alan polifenoller ile polifenol oksidaz (PPO) enziminin, kıvrırma aşamasında birbiriyle karışmasını sağlayan fiziksel değişim meydana gelir (Muthumani ve Senthil-Kumar, 2007a). Bu aşamada gerçekleşen aşağıdaki biyokimyasal değişiklikler ve yaprakların sahip olduğu nem içeriği siyah çayın kalitesini etkilemektedir (Sud ve Baru, 2000; Lopez vd., 2005; Ghodauke vd., 2006)

- Amino asitler, basit şekerler ve kafein miktarlarında artma
- Karotenoid, klorofil ve lipid içeriklerinde azalma
- Kateşin miktarı ve PPO aktivitesinde azalma (Tomlins ve Mashingaidze, 1997).

Soldurma sonucunda yaprakların hücre özsuları daha yoğun hale gelir ve kıvrırma işlemi için uygun elastiki yapı temin edilir. Taze yapraklar soldurulmadan doğrudan doğruya kıvrırmaya tabi tutulursa, hücre özsuyunun dışarı çıkması ve hücre parçalanması tam olmaz, yapraklarda kıvrılmadan ziyade kırılma meydana gelir, presleme esnasında kıvrırmadan akan sularla çayın içerisinde bulunan etkin maddeler dışarı atılır (URL-1, 2007). Ayrıca, karotenler, amino asitler, doymamış yağ asitleri ve terpen glikozidleri, siyah çayın önemli kalite parametrelerinden olan çay aromasından sorumlu bileşiklerin ön

maddeleridir ve bu bileşiklerin soldurma sırasındaki değişimlerine bağlı olarak çayın aroma bileşimi de değişim göstermektedir (Ravichandran, 2002). Bu nedenle, soldurma işleminin siyah çay üretiminin en önemli aşamalarından biri olduğu düşünülmektedir (Ghodake vd., 2006; Muthumani vd Senthil-Kumar, 2007a).

Kıvrırma: Solmuş çay yaprağının değişik çay imalat makinelerinde parçalanması, ezilmesi ve bükülmesiyle hücre özsuyunun kıvrılmış yaprak yüzeyine yayılması ve oksidasyonun başlaması işlemidir. Kıvrırma işlemi ya geleneksel olarak ortodoks yöntemi ile ya da CTC (parçalama, yırtma ve bükme) yöntemi ile gerçekleştirilir (Peterson vd., 2004).

Ortodoks kıvrırma yönteminde soldurulmuş çay yapraklarının kıvrılması, büyüklükleri ve düzenlemeleri birbirinden farklı ancak aynı ilkelere dayanan presli ve pressiz kıvrırma makinalarında gerçekleştirilir. Sürekli bir sistem olan CTC yönteminde ise soldurulmuş yapraklar, birbirinin tersi yönünde dönen iki yatay valsten oluşan CTC makinasında işlenirler. Dakikadaki devir adetleri birbirinden farklı olan valslerin arasından yapraklar geçerken parçalanır, yırtılır ve bükülür. CTC makinaları, ortodoks kıvrırma, rotorvan (parçalayıcı) ya da kendi aralarındaki kombinasyonlarla siyah çayın işlenmesinde kullanılmaktadır (Kaçar, 1987). Yaprak hücrelerinin vakuolü etrafında bulunan ve yaprak içinde polifenoller ve enzimleri birbirinden ayıran ince membranlar kıvrırma sırasında parçalandığı (Bhattacharyya vd., 2007b) için kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlar bu aşamada başlamaktadır (Caffin vd., 2004). Stoplazmik flavonoidlerin, kloroplast PPO'ı ve hücre duvarı peroksidaz (POD)'ı ile temas etmesi sonucunda çay yapraklarının rengi sarıkırmızı kahverengiye dönmektedir (Baruah, 2003). CTC yöntemiyle üretilen çayların flavonoid özellikle de teafavin (TF) ve tearubijin (TR) içerikleri ortodoks çaylarından daha fazladır (Peterson vd., 2004). Diğer taraftan, ortodoks çayları CTC çaylarından daha iyi koku ve aromaya sahiptir ve kalitesini daha iyi muhafaza eder (Ravichandran ve Parthiban, 2000). Bu durum karotenoid ve lipid gibi bileşiklerin parçalanma derecesiyle ilgilidir.

Kıvrılan yapraklarda sıcaklık yükselmesi enzim-substrat reaksiyonunu zamansız bir şekilde artırır. Bu da siyah çayın kalitesini düşürür. O nedenle aşırı sıcaklık yükselmelerinden kaçınmak gerekir. Genellikle en uygun sıcaklık 27-32 °C arasındadır (Kacar, 1987). Siyah çay, ülkemizde ortodoks, CTC, Çay-Kur, rotorvan ve bunların değişik kombinasyonlarından oluşturulan farklı yöntemlerle işlenmekle birlikte, Çay-Kur yöntemi olarak adlandırılan, pressiz ortodoks + rotorvan + konik Ortodoks

kombinasyonundan oluşan yöntem uygulamada yaygınlık kazanmıştır (Kaçar, 1987; Özdemir vd., 1993; Tüfekçi ve Güner, 1997).

Fermentasyon: *C. sinensis* bitkisinden ticari ürün hazırlanmasında en önemli işlem fermentasyondur. Bu fermentasyonun derecesi çayın tipini ve kalitesini etkiler. Yeşil çay (fermente edilmemiş), çay yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin enzimatik oksidasyonunu önlemek için ısıtma ve kurutma yoluyla; siyah çay (fermente edilmiş) fenolik bileşikleri tam olarak oksidasyona uğratarak, oolong çay (yarı fermente, siyah çay ile yeşil çay arasında) ise kısmen enzimatik oksidasyona uğratma yoluyla üretilir (Luczaj ve Skrzydlewska, 2005; Jain vd., 2013). Kıvrılan yaş çay yaprağının hücre öz suyunda bulunan kimyasal bileşiklerinin oksidaz enziminin tesiri ile biyolojik değişikliğe uğrayarak siyah çayda istenen renk, burukluk, parlaklık, koku ve aromanın oluşması olayıdır. Çay imalatında ilk kalite kontrolü fermentasyon safhasında yapılır. Bu işlem sırasında; Çay yapraklarının rengi yeşilden bakır kırmızısı veya siyah renge ve kompleks biyokimyasal reaksiyonlar zinciri sonucunda oluşan bir çok uçucu koku bileşikleri nedeniyle yaprakların yağimsi kokusu çiçeğimsi kokuya dönüşür (Bhattacharyya vd., 2007 a, b). Polifenoller, PPO ve POD ile enzimatik oksidasyona uğratılır. Enzimatik oksidasyonun başında o-kinonlar oluşur ve oluşan o-kinonlar arasında bir dizi reaksiyonların gelişmesiyle TF'ler ve TR'ler oluşur (Luczaj ve Skrzydlewska 2005; Muthumani ve Senthil-Kumar, 2007b). Bunlar, çay deminin burukluk, parlaklık, renk ve ağızda bıraktığı his gibi özelliklerinden sorumlu bileşiklerdir (Sud ve Baru, 2000).

Fermentasyon sırasında istenilen ürün özelliklerinin oluşumundan sorumlu en önemli faktörler süre, sıcaklık, pH, nisbi nem ve oksijendir (Muthumani ve Senthil-Kumar, 2007b). Süre açısından yetersiz olan fermentasyon çay deminin yeşil renkli, çiğ tatta ve ince olmasına yol açarken, aşırı fermentasyon çay deminin koyu ve kuvvetli olmasını sağlamaktadır (Bhattacharyya vd., 2007a). Fermentasyonun başlangıç aşamalarında sürenin artmasıyla orantılı olarak TF miktarları en yüksek seviyelere ulaşırken bu aşamadan sonra sürenin daha fazla uzaması TF miktarlarında azalmaya neden olmaktadır (Muthumani ve Senthil-Kumar, 2007b). Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı, istenilen kalite özelliklerinin elde edildiği bir fermentasyonun başarılması için tüm bu faktörlerin düzenlenmesi ve ayrıca yaprağın kateşin bileşimi ve enzim aktivitesi hakkında yeterli bilgiye sahip olunması gerekmektedir (Bhattacharyya vd., 2007a)

Kurutma/Derecelendirme: Kıvrılmış ve fermente olmuş çay yaprağının fırınlanarak nem oranını %2-4 seviyelerine indirme işlemidir. Kurutmanın amacı enzim oksidasyonunu

durdurarak, kazanılan özelliklerin ve oluşan maddelerin yitirilmesine engel olacak ortamı oluşturmak, çayı depolanabilir, paketlenir ve taşınabilir duruma getirmektir. kurutma sırasında çayın neminin azalmasının yanı sıra tadı, rengi ve aroması da gelişmektedir (Caffin vd., 2004). Kurutulmuş çay, uygun partikül boyutu ve şekline göre derecelendirilir. Bu amaçla mekanik olarak hareket eden delik genişlikleri farklı elekler kullanılır ve eleklerin delik genişlikleri esas alınarak derecelendirme yapılır (Tokuşoğlu, 2001). Ülkemizde uygulanan derecelendirme sistemine göre, kurutma fırınından çıkan çaylar bir dizi lif alıcısı ile çöp, lif ve benzeri materyallerinden ayrılır ve 5 mm delik genişliğindeki Midilton eleğinden geçirilir. Elekten geçen kısım çay eleklerine (pakka), geçemeyen kısım kırıcıya gönderilir.

Tablo 1.1. Çay-Kur tarafından işlenen siyah çayın sınıflandırılması

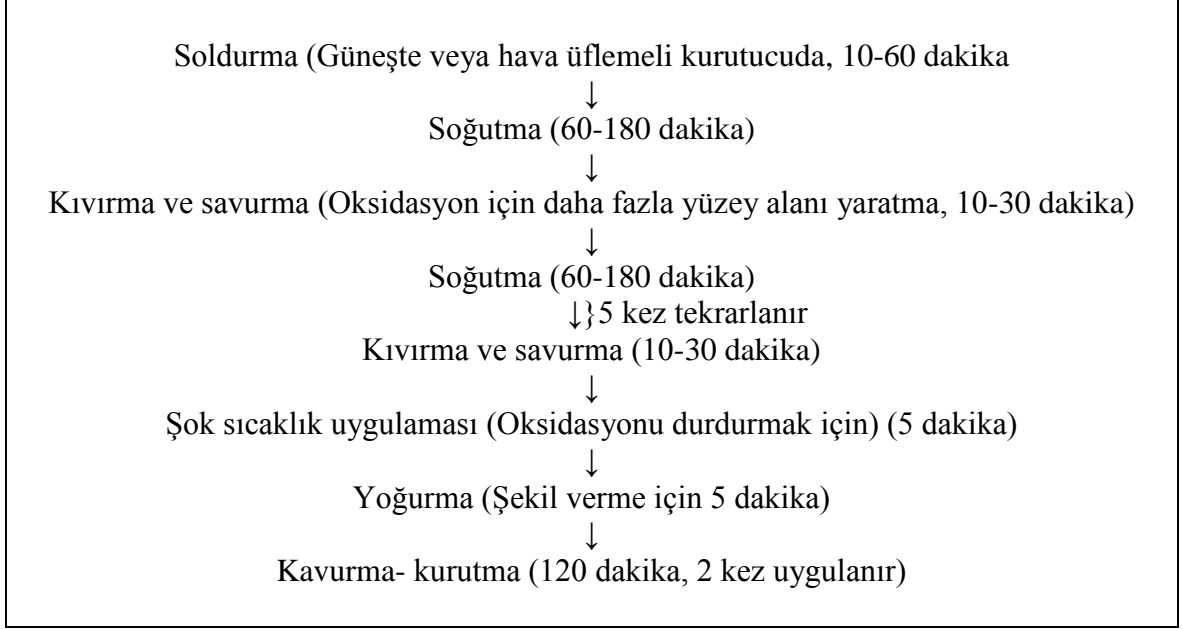
Numara	Türkçe	İngilizce	Tanımlanması
1	İmalat kırığı	Orange Fannings (OF)	Çok ince altınbaşlı imalat kırığı çay
2	İmalat kırığı	Broken Orange Pekoe 1 (BOP1)	İnce altınbaşlı kıvrım çay
3	İmalat kırığı	Orange Pekoe (OP)	Az altınbaşlı kalın kıvrım çay
4	Kırıcıdan geçen	Fanning (F)	Çok ince kırık çay
5	Kırıcıdan geçen	Broken Orange Pekoe 2 (BOP2)	İnce kıvrımlı kırık çay
6	Kırıcıdan geçen	Broken Pekoe (BP)	Kalın kıvrımlı kırık çay
7	Toz	Dust (D)	Toz çay

(Kaçar, 1987;1992)

1.1.1.3. Oolong Çay

Oolong çay özellikle Asya ve Kuzey Afrika' da tüketilen bir çay çeşididir (Alcázar vd., 2007). Oolong çay üretiminde fermentasyon olarak bilinen oksidasyon derecesine göre fenolik bileşikler kısmen değişime uğramaktadır. Dolayısıyla oolong çay hem önemli miktarda primer fenoliklerden olan kateşinleri hem de sekonder fenoliklerden olan TF ve TR gibi oksidasyon ürünlerini içerdiği için (Benzie ve Szeto, 1999; Kim vd., 2011; Wang vd., 2010), siyah çaya göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (Benzie ve Szeto, 1999; Satoh vd., 2005; Anna, 2007). Ayrıca, lipoksigenaz enzimini inhibe etme gücü yüksektir (Xie vd., 1993). Siyah ve yeşil çaydan daha güçlü antimutajenik etkiye sahiptir (Yen ve Chen, 1996). Antioksidan, antimutajen ve anti-inflamatuar etkisi yüksek olan oolong çayın kanser önleyici etkiye sahip olduğu, obezite ve diyabeti önleyici ve lipid düşürücü etkisi bulunduğu bildirilmiştir (Chen vd., 2010). Oolong çayın üretiminde

kompleks bir yarı fermentasyon işlemi uygulanmakta olup, işlem basamakları aşağıda belirtilen Şekil 1.2'deki gibidir (Chen vd., 2010).



Şekil 1.2. Oolong çay üretim basamakları

Fermente edilen çaylar 200 °C'deki fırında bekletilerek enzimatik oksidasyon sonlandırılır, sonra kıvrılıp kurutulur (Dou vd., 2007). Tüketicinin isteğine bağlı olarak enzimatik oksidasyon derecesi %20 ile 60 arasında değişir (Kim vd., 2011). Oolong çay üretiminde enzimatik oksidasyon ve kurutma iki önemli aşamadır. Depolama koşullarına bağlı olarak, çaylar nem çekerek yavaş bir şekilde enzimatik oksidasyona devam edebileceğinden işlemi kontrol altına alma açısından kurutma periyodik olarak tekrarlanmalıdır. Uzun süre depolanan çayların tadı ve sağlık üzerine yararları daha fazladır (Dou vd., 2007).

1.1.2. Çayın Bileşimi

1.1.2.1. Çayın Genel Bileşimi

Çayın kimyasal bileşimi, tür çeşitliliklerine, iklim koşulları, tarımsal uygulamalar (toprak, su, mineraller, gübre), coğrafi konum, toprak, toplama mevsimi, işleme teknolojileri, depolama ve kurutulma gibi pekçok faktöre bağlıdır (Shi, 2009). Yararlı

bileşenleri içerdiğinden son zamanlarda yeşil çay çok dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmalarda, çayın sağlık üzerine yararlı etkileri, daha çok yapısında bulunan polifenolik maddelerle ilişkilendirilmektedir (Baptista vd., 1998; Chang vd., 2000; Zuo vd., 2002; Imai ve Nakachi, 1995; Dufresne ve Farnworth, 2001; Koo ve Cho, 2004). Çayın doğal yapısında, kateşin bileşikleri, polisakkaritler, flavonoidler, Vitamin B kompleksi, C, E vitaminleri, R-amino bütirik asit ve florür bulunur (Shi, 2009). Çayın bileşenleri arasında fenolik maddeler ve alkaloidler en büyük öneme sahiptir. Ayrıca çayda 26 çeşit amino asit bulunmaktadır. En bol bulunan amino asit sadece çay bitkisine özgü olan ve toplam amino asitlerin %50'sini oluşturan teanindir (Yao vd., 2006a). Teanin, yeşil çay kalitesi ile en yüksek korelasyonu gösteren ve aynı zamanda önemli biyolojik etkiye sahip bir amino asittir (Wang vd., 2006). Beyindeki norepinefrin ve serotonin miktarlarını düşürdüğü, kan basıncını azalttığı ve kanser üzerine etkili olduğu belirtilmektedir (Juneja vd., 1999; Wang vd., 2006). Teanin yeşil çay demine etimsi tat ve koku vermektedir (Juneja vd., 1999). Teaninin bu önemli özelliklerinin anlaşılmasından sonra üzerinde giderek daha fazla çalışılmaktadır.

1.1.2.2. Çayın Fenolik Madde Bileşimi

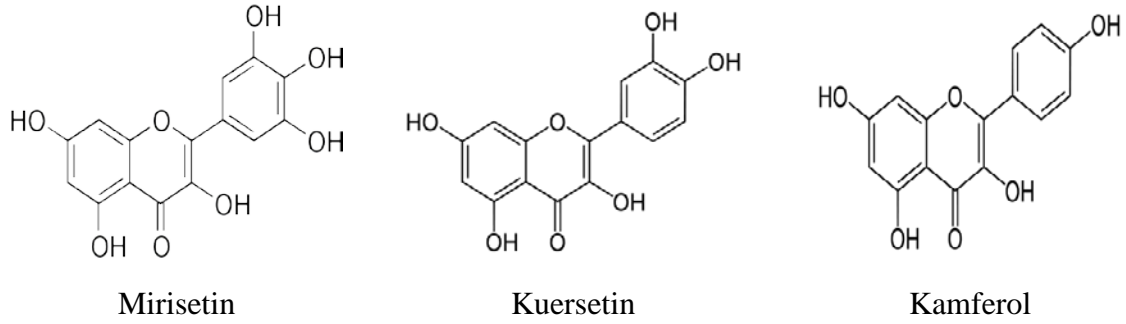
Fenolik maddeler basit fenolik maddeler ve polifenoller olmak üzere kabaca iki gruba ayrılmakla beraber meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddeler hidroksibenzoik asitler, hidroksisinamik asitler ve flavonoidler olmak üzere üç kısımda incelenmektedirler. Flavonoidler ise kateşinler (flavanoller), antosiyanidinler, flavonoller, flavanonlar, flavonlar ve izoflavonoidler olmak üzere alt gruba ayrılmaktadırlar (Cemeroğlu ve Acar, 1986). Bitkiler aleminde fenolik madde içeriği en zengin olan bitkinin *Camellia sinensis* olduğu belirtilmektedir (Wilson ve Clifford, 1995). Flavanoller (kateşinler) ve flavonoller çayda bulunan başlıca polifenollerdir. Fenolik maddeler aromatik halkada bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir (Shahidi ve Naczki, 1995). Bu bakımdan en basit fenolik maddenin bir tane hidroksil grubu içeren fenol olduğu ve diğer fenolik maddelerin bundan türediği bilinmektedir (Cemeroğlu ve Acar, 1986).

Taze çay yaprağında bulunan fenolik bileşikler, başlıca flavan-3-oller (kateşinler) ve flavanol glikozidlerden oluşmaktadır (Clifford vd., 2000). Taze çay yaprağında ayrıca

diğer bir fenolik grup olan fenolik asitlerden gallik asit, klorojenik asit, neoklorojenik asit ve p- kumaril kuinik asit de bulunmaktadır.

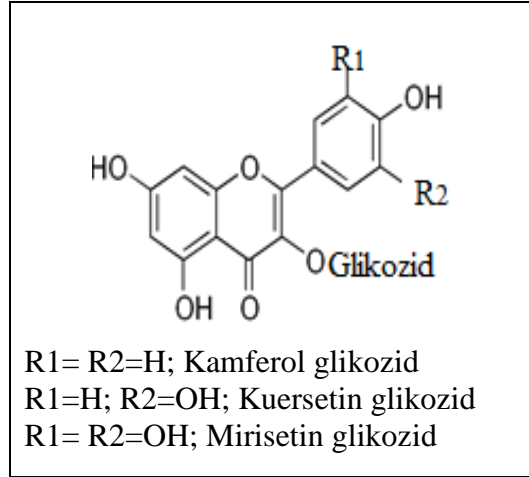
1.1.2.2.1. Flavonol Bileşikler

Flavonol bileşikler; difenil propan halkasına (C6-C3-C6) sahip olan flavonoidlerin C2 ve C3 yapıları arasında bir çift bağ oluşumu ile meydana gelmektedir (Tokuşoğlu, 2001). Çayda bulunan başlıca flavonoller ise kuru ağırlığın % 3'ünü oluşturan kuersetin, mirisetin ve kamferoldür (şekil 1.3). Flavonol bileşikler grubunun şekerlerle ester yapmaları sonucu oluşan glikozid formunda bulunurlar (Wang vd., 2000; Gramza ve Korczak, 2005) ve yapısal olarak kateşinlerden daha kararlıdırlar (Wang ve Helliwell, 2001).



şekil 1.3. Flavonolların yapısı

Flavonol glikozidlerin (şekil 1.4) (Tokuşoğlu, 2001) yapısında glukoz, ramnoz, galaktoz, arabinoz ksiloz ve rutinoz gibi şekerlerin yer almasıyla bu bileşiklerin polaritesi ve dolayısıyla suda çözünürlükleri artmaktadır ve böylece bitki hücrelerinin vakuollerinde depolanabilmektedirler. Bu bileşiklerin, bitkilerde UV radyasyonuna ve mikroorganizmalara karşı koruyucu ajan görevi üstlendikleri düşünölmektedir (Justesen vd., 1998).

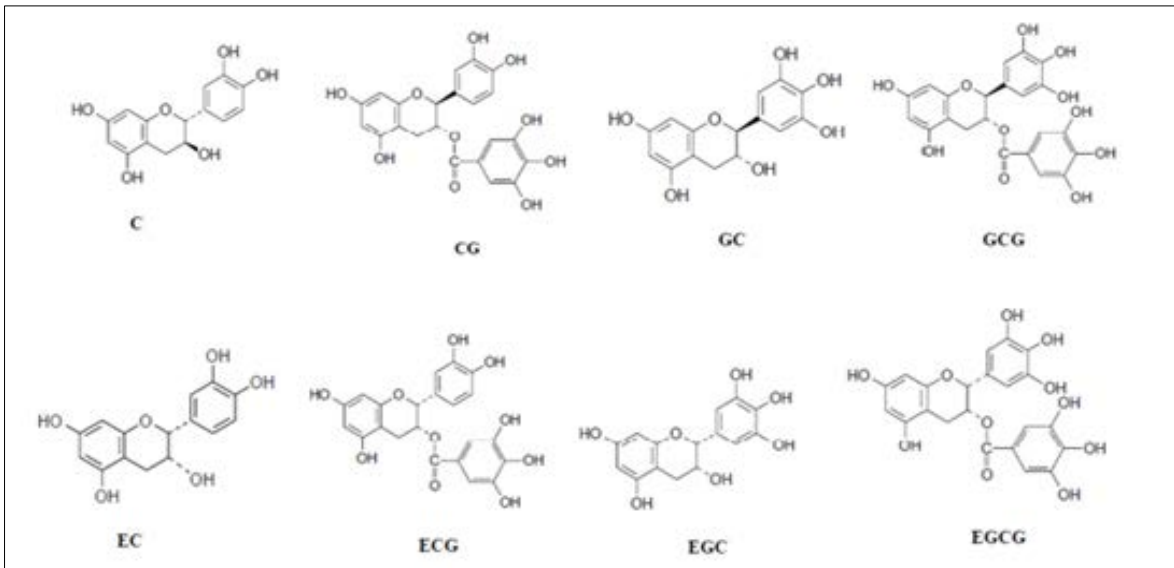


Şekil 1.4. Flavonol glikozidlerin yapısı

1.1.2.2.2. Flavan-3-ollar

Flavonoid grubun bir üyesi olan flavan-3-ollar (kateşinler), fenolik ve piron halkalarını içeren benzo- γ -piron türevleridir (Heim vd., 2002). Kateşinler, C3 atomunda bir OH grubu içerdiğinden sistematik olarak flavan-3-ol olarak adlandırılırlar. Kateşinlerin yapılarında iki asimetrik karbon atomu bulunduğu için dört izomerleri bulunmaktadır. C2 ve C3 atomlarına bağlı hidrojen (+)kateşin ve (+)gallokateşin moleküllerinde *trans*, (-) epikateşin ve (-)epigallokateşin moleküllerinde ise *cis* konfigürasyonundadır.

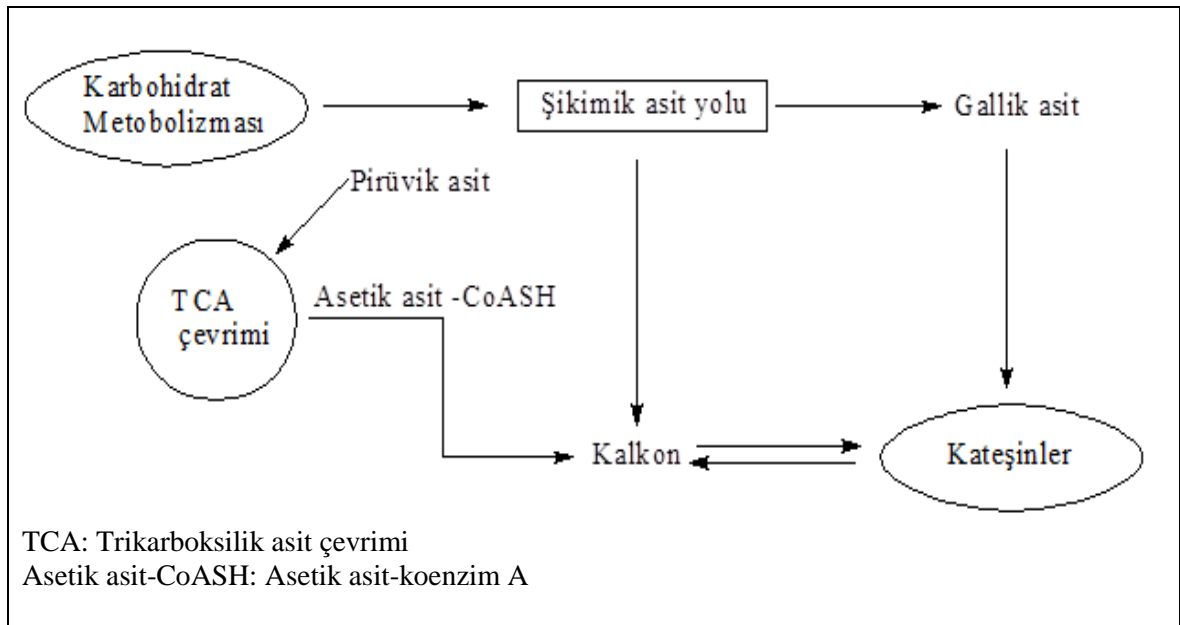
Çay kateşinleri, epi yapılı kateşinler ve epi yapılmayan kateşinler olmak üzere iki grupta sınıflandırılır (Li vd., 2005). Mevcut kateşin türevleri Şekil 1.5' de verilmiştir.



Şekil 1.5. Kateşin türevleri

Epi yapılı kateşinler, çaydaki ana kateşinlerdir ve epigallo kateşin gallat (EGCG) en çok bulunandır, bunu takiben azalan miktarda epigallo kateşin (EGC), epi kateşin gallat (ECG) ve epikateşin (EC) bulunur. Epi yapılı olmayan kateşinler ise gallo kateşin gallat (GCG), gallo kateşin (GC), kateşin gallat (CG) ve kateşin (C)' dir ve bunlar çayda yalnızca çok küçük miktarlarda bulunur (Kumar ve Rajapaksha, 2005).

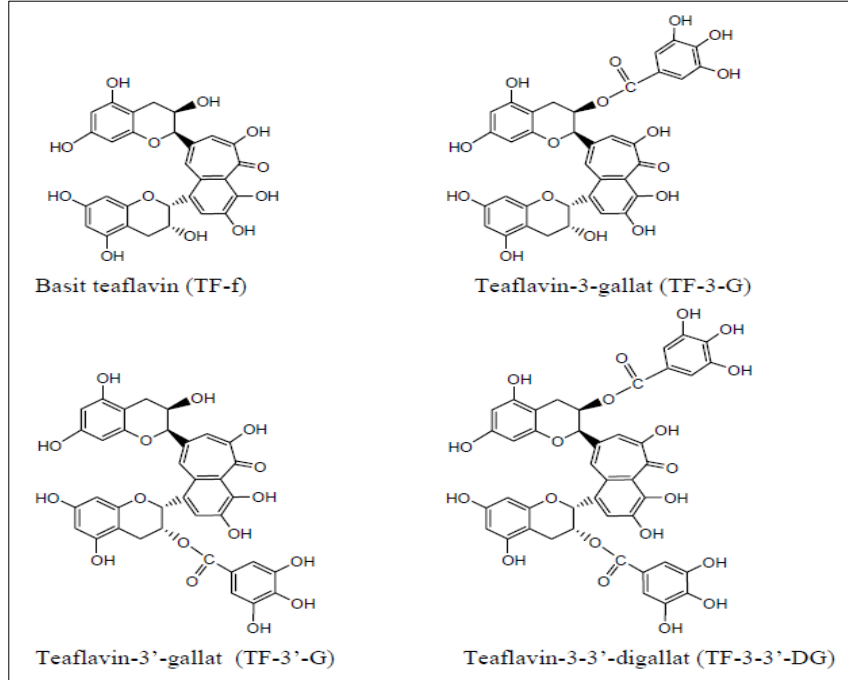
Kateşinler, *Camellia sinensis* bitkisinin yapraklarında, asetik-malonik ve şikimik-sinamik asit yolları boyunca sentezlenirler (Şekil 1.6). Kalkon ve gallik asit yoluyla farklı kateşinler üretilir (Bazinet vd., 2007). Yeşil çay yapraklarının ekstraktlarındaki tipik bir kateşin profili; %10-15 EGCG, %6-10 EGC, %2-3 ECG, %2 EC' den oluşur (Ishizu, 2009).



Şekil 1.6. Kateşinlerin çay bitkisindeki sentezi

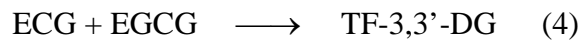
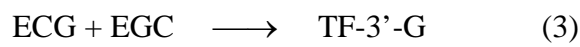
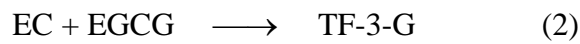
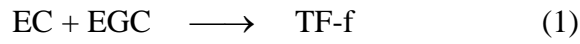
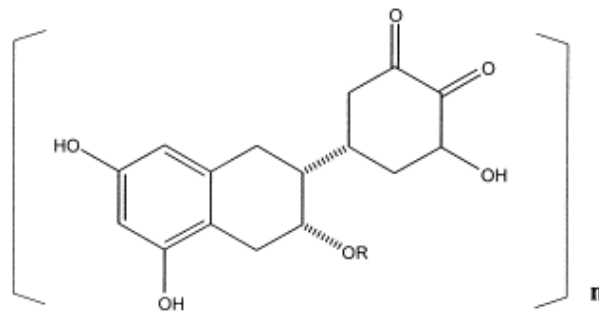
Siyah çayın en önemli fenolik bileşikleri ve aynı zamanda pigmentleri dimerik teaflavin (TF) ve polimerik tearubigindir (TR). TF parlak ve portakal kırmızı renkte iken TR kimyasal olarak daha heterojen olup kahverengi-kırmızımsı renktedir ve bu bileşikler flavonol glikozidlerle birlikte siyah çayın tat ve renginden önemli ölçüde sorumludur (Obanda vd., 2001). Siyah çayda toplam konsantrasyonu %2'yi geçmeyen, genellikle %0.3 gibi düşük düzeyde olabilen, TF'in sentezi ve moleküler yapısı çok iyi bilinirken, daha heterojen yapıdaki, kuru çay kütlelerinin %10-15'ini oluşturan, TR'in kimyasal yapısı ve oluşum mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Wright vd., 2002; Bonnely vd., 2003;

Haslam 2003; Obanda vd., 2004; Sang vd., 2004; Owuor ve Obanda 2007). Teaflavinlerin kimyasal yapıları Şekil 1.7’de verilmiştir (Kuroda ve Hara, 1999).



Şekil 1.7. Çay teaflavinlerinin kimyasal yapıları

TR için önerilen genel yapı ve TF oluşum yolları aşağıda verilmektedir (Kuroda ve Hara, 1999; Wang vd., 2000).



Alaşalvar vd., (2013) düşük ve yüksek kalitedeki Türk siyah çaylarının toplam fenolik içerikleri, vitamin içerikleri, teaflavin ve tearubigin miktarları, karotenoidler ve alkaloidler açısından incelemiştir. Düşük ve yüksek kalite aralığındaki yedi siyah çay örneklerin teaflavin içeriğini 56-124 mg/100g ve tearubigin içeriğini 10,2-12,7 g/100g olarak rapor etmişlerdir (Alaşalvar vd., 2013).

1.1.2.2.3. Kateşinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kateşinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılmalarına olanak sağlamıştır. Kateşinler, renksiz ancak tat olarak acı ve ekşidir (Copeland vd., 1998).

Her kateşin ayrı bir tada sahiptir; örneğin EGC ve EC ağızda mayhoş bir tat bırakan acı bir tada sahipken, EGCG ve ECG ise acı ve ekşi bir tada sahiptir (Jin vd., 2006). Kateşinler, kafein ve proteinlerle bulanık görümlü bir çözelti oluşturan çökelekler oluşturmak üzere reaksiyona girebilirler. Bu proses krem oluşumu olarak tanımlanır (Jin vd., 2006; Dong vd., 2011). Ayrıca lipoksigenaz, α -amilaz, pepsin, tripsin ve lipaz gibi enzimlerle çökelek oluşturmak üzere reaksiyon verir ve sonuç olarak bu enzimlerin aktivitesini inhibe eder. EGCG ve ECG gibi ester bağı içeren kateşinler enzimlerle daha kolay çökelek oluşturur.

Yapılarındaki galloil grubu demirle bağ yapma eğilimindedir ve böylece demirin vücuttaki emilimini inhibe eder (Zhao vd., 2007). Yükseltgeyici enzimlere, ısıya ve yüksek pH' a karşı hassas ve kararsızdırlar. Polifenol oksidaz (PPO) ve peroksidaz (POD) enzimleri varlığında teaflavin ve tearubigin formlarına yükseltgenirler (Lu vd., 2010). Sıcaklık ayarlaması yapılırken dikkat etmek gerekir, çünkü yüksek sıcaklıklarda (>95 °C) epi yapıları kateşinler, epimerizasyona eğilimlidir ve epi yapıları olmayan kateşinlere dönüşürler (Takeuchi vd., 2009). Ek olarak, asidik çözeltilerde çok kararlı olmalarına rağmen (pH<4), pH 4'ten 8'e doğru artırıldığında kararlılıkları azalır ve pH'ın 8'den büyük olduğu alkali çözeltilerde aşırı derecede kararsız hale gelir (Huang vd., 2007).

Yapılarında hidroksil grubu içerdiklerinden kuvvetli antioksidan özelliklere sahiptirler ve böylece süperoksit radikaller, singlet oksijen, hidroksil radikal, nitrik oksit, nitrojenioksit ve peroksinitrit gibi karsinogenizde çok önemli rol oynayan reaktif oksijen türlerini temizleyebilir (Escribano-Balo'n ve Santos-Buelga, 2003). Ek olarak, kateşinler peroksil radikallerini kolayca bağladıklarından serbest radikal zincir reaksiyonlarını

bastrabilir, lipid peroksidasyonunu sonlandırabilirler (Bond vd., 2003). Lipid peroksidasyonunu önlemede dört ana kateşinin etkinliği, EGCG, ECG, EGC ve EC sırasına göre azalır (Park vd., 2007). Bu durum yüksek yağ içeren gıdalarda kullanımları açısından önemlidir. Kateşinlerin genel fiziksel özellikleri Tablo 1.2’de, çözünme özellikleri ise Tablo 1.3’de verilmiştir (Ninomiya vd., 1997; Penders vd., 1998; Siebert vd., 1996; Zijp vd., 2000; Shi vd., 2005; Wan vd., 2009).

Tablo 1.2. Kateşinlerin önemli fiziksel özellikleri

	EC	EGC	ECG	EGCG
Molekül formülü	$C_{15}H_{14}O_6$	$C_{15}H_{14}O_7$	$C_{22}H_{18}O_{10}$	$C_{22}H_{18}O_{11}$
Molekül kütlesi	290	306	442	458
Max. Absorpsiyon dalga boyu (nm)	280	269	280	273
Erime noktası ($^{\circ}C$)	218	218	253	254
Çözünürlük	Zaman bağımlı	Zaman/ çözücü bağımlı	Zaman/sıcaklık bağımlı	Zaman/ sıcaklık/ çözücü bağımlı
Kristallendirme	Sudan	Sudan	Sudan	Sudan
Optik çevirme (α) ²⁰	-59.0 ⁰ (c1.0 asetonda)	-67.5 ⁰ (c1.0 etanolde)	-179 ⁰ (c0.28 etanolde)	-179 ⁰ (c0.28 ⁰ etanolde)

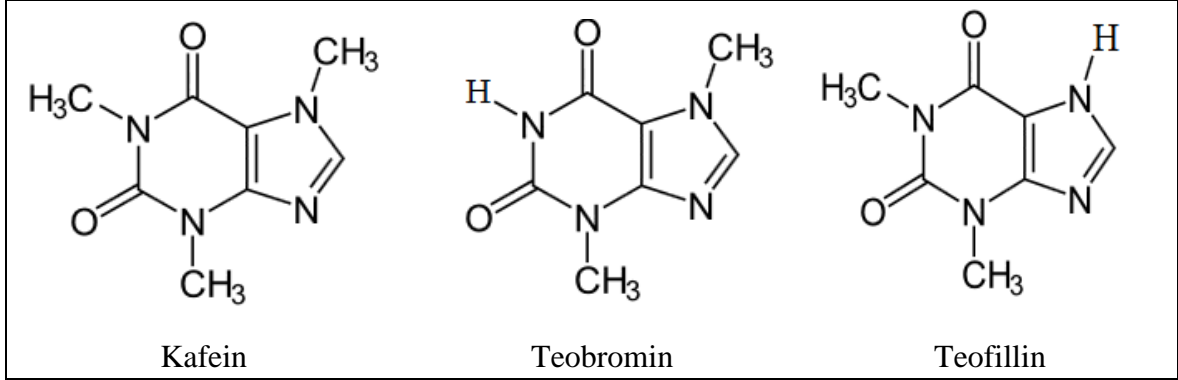
Tablo 1.3. Kafein, kateşin ve theanin arasındaki fiziksel ve kimyasal farklar

	Kateşin	Kafein	Theanin
Soğuk su	Az çözünür	Az çözünür	Çözünür
Etanol	Çözünür	Çözünür	Çözünmez
Eter	Çözünür	Çözünür	Çözünmez
Kloroform	Çözünmez	Çözünür	Çözünmez
Demir	Bağ yapar	Bağ yapmaz	Bağ yapmaz
Protein	Çöker	Çökmez	Çökmez
Kafein	Çöker	Çökmez	Çökmez

1.1.2.3. Çayda Bulunan Alkaloidler

Çayın içerdiği alkaloid maddeler pürin türevleri olan kafein, teobromin ve teofilindir (Şekil 1.8, Brunetto vd., 2007). Pürin nükleoproteinlerin en önemli yapı taşıdır. Çay

yapraklarının kafein içeriği çay türüne göre değişim gösterse de genellikle %2-5 (Kuru kütle, a/a) aralığındadır.



Şekil 1.8. Alkaloidlerin kimyasal yapısı

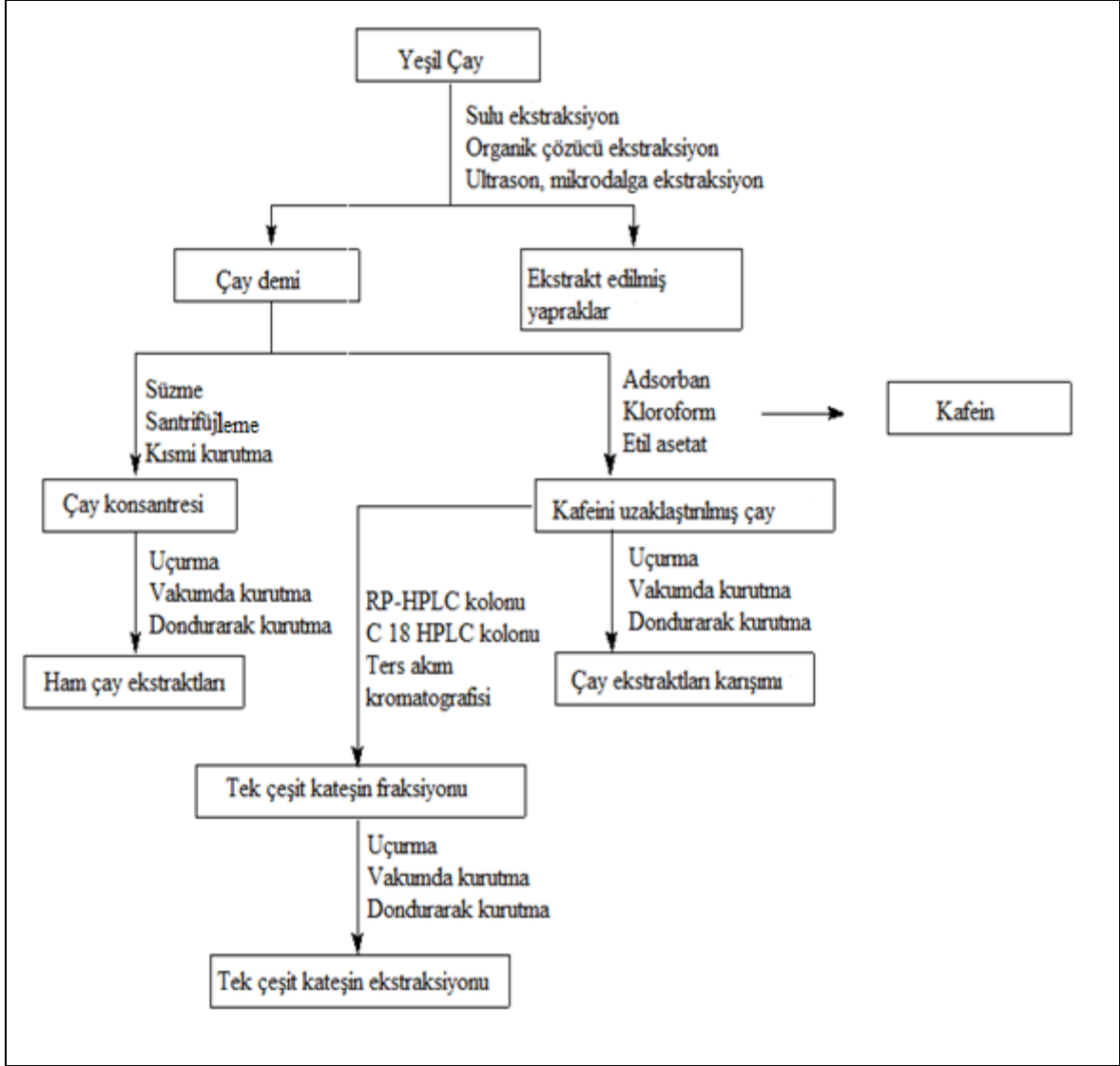
Metilksantin bileşikleri olarak da bilinen bu üç alkaloid, çayın uyarıcı etkisinden sorumlu bileşiklerdir (Goto vd., 1996; Fernández vd., 2003; Yao vd., 2006a). Çay yapraklarından izole edilen ve 1,3,7-trimetilksantin ($C_8H_{10}N_4O_2$) olarak adlandırılan arı kafein, tadı acı kristal halde bir maddedir. İlaç ve meşrubat sanayinin önemli bir hammaddesi olan kafeinin başlıca doğal kaynağı kahve, çay ve kakao çekirdekleridir. Üretimiminin %45'i doğal kaynaklardan (kafeinsizleştirilmiş kahve üretiminden ve çay atıklarından) geri kalan kısmı ise sentetik yollardan elde edilmektedir. Dünya kafein tüketiminin %70'e ulaşan kısmı kolalı içeceklerde, geri kalan kısmı ilaç sanayinde kullanılmaktadır. Kalp, solunum yolu ve merkezi sinir sisteminde uyarıcı işlev görür ve idrar söktürücü olmakla birlikte damar genişletici etkiye sahiptir. Bunun dışında özellikle kozmetik sanayinde tercih edilen bir ürün haline gelmiştir. Teobrominin ise kuvvetli diüretik etkisinin olduğu belirtilmektedir (Tokuşoğlu ve Ünal, 2002). Bazı bitkiler stresli koşullar altında alkaloid üretimini artırmaktadır. Gölgeye toleranslı bazı bitkilerde de gölge derecesi arttıkça alkaloid üretimi artmaktadır (Streit vd., 2007). Lin ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan çalışmada da kafein miktarı açısından siyah çay birinci sırada yer alırken, bunu sırasıyla oolong çay, yeşil çay ve taze çay yaprağı izlemiştir. Benzer sonuçlar, Cabrera vd., (2003) tarafından da elde edilmiştir. Ayrıca çay bitkisinde kafein, nükleik asitlerin parçalanması sonucu oluşmaktadır ve bu parçalanma soldurma aşamasında da devam ettiği için siyah çayın kafein içeriği artmaktadır (Kacar, 1987). Hindistan çaylarından %2,8-4,0, Çin çaylarında %2,9-4,0 arasında kafein bulunurken Türk çaylarında %2,0-3,8 arasında kafein bulunduğu rapor edilmiştir.

1.1.3. Çaydan Kafein ve Kateşinlerin Geleneksel Yöntemlerle Ekstraksiyonu

Çay örneklerinden kafein ve kateşinler gibi değerli kimyasalların ayrılmasında farklı yöntemler uygulanmaktadır. Su veya organik çözücülerin kullanıldığı geleneksel yöntemlerin yanı sıra modern ekstraksiyon yöntemleri de kullanılabilir. Çaydan kateşinlerin ekstraksiyonuna yönelik literatürde mevcut çalışmaları ve yöntemleri içeren önemli bir derleme Vuang ve arkadaşları tarafından (2010) yayınlanmıştır. Sıcak su gibi geleneksel yöntemlerin yanı sıra ultrasonik, mikrodalga ve süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemleri detaylarıyla tartışılmıştır. Tüm bu yöntemler de iki hedef vardır. Birincisi çay örneklerinden (Yeşil, siyah, oolong) veya çay atıklarından kafein ve kateşin ekstre edilerek alınması. İkincisi ise çay bileşenlerinin bulunduğu karışımdan kafein ve kateşinlerin seçimli ekstraksiyonu. İlk işlem için çoğunlukla tercih edilen sıcak su ekstraksiyonudur. Hem kafein hemde kateşinler (ve diğer bazı bileşenler) suda çözüldüğünden en kolay ve temiz ekstraksiyon yöntemidir. Su içine ekstre edilen kafein ve kateşinleri hem birbirinden hemde sulu çözeltiden ayırmak için farklı polaritelere sahip çözücülerle sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemleri uygulanır. Genel yaklaşım sulu çözeltiyi önce kloroformla ekstre ederek sonra da etil asetat ekstraksiyonuyla kateşinleri ayırmak şeklindedir. Kafein ticari anlamda önemli olan bir madde olduğundan mevcut çalışmaların pek çoğu çay veya çay atıklarından kafeinin ayrılmasına odaklanmıştır.

Çay; kateşin, kafein, teanin, klorofil, organik asit ve vitaminler gibi bir dizi suda çözünür madde içerir (Tablo 1.4). Diğer çözünebilir maddelerle karşılaştırıldıklarında daha büyük miktarlardadırlar ancak aralarında önemli ölçüde çözünürlük ya da moleküler boyut farkı olmadığından kateşinleri bu maddelerden ayırmak oldukça zor ve karmaşıktır (Huo vd., 2008) Son zamanlarda ilaç, gıda ve kozmetik ürünlerinde kullanılmak üzere çaylardan kateşin izole etmek için önemli metotlar geliştirilmiştir (Huo vd., 2008; Shi vd., 2005; Wang ve Provan 2000). Çünkü yeşil çay, siyah çay ve oolong çay gibi diğer çaylara nazaran yüksek oranda kateşin içerir (Graham, 1992). Çoğu kateşinler yeşil çaydan ham kateşin ekstraktları, kateşin karışımları ve tek çeşit kateşin formunda izole edilmişlerdir. Ayırma ve izolasyon basamaklarını içeren bir şema Şekil 1.9'da verilmiştir. Ham çay ekstraktları terimi, ekstraktların sadece kateşin içermediği, kafein ve teanin gibi diğer çay bileşenlerini de içerdiğini temsil eder. Kateşin karışımı ekstraktları yüksek saflıkta kateşin karışımları içerirken tek çeşit kateşin ekstraktları yüksek konsantrasyonlarda ya EGCG,

ECG, EGC ya da EC içerir. Yeşil çay yaprağının kimyasal bileşimi ve fenolik madde kompozisyonu Tablo 1.4’de verilmiştir (Graham, 1992; Balentine, 1998).



Şekil 1.9. Çay ekstraktlarını hazırlama yolları

Tablo 1.4. Yeşil çaydaki ana bileşenler

Bileşenler	% Kuru madde
Kateşin	30
Theanin	3
Kafein	3
Karbonhidrat	11
Proteinler	15
Organik asitler	2
Lipidler	30
Mineraller	10
Klorofil ve diğer pigmentler	0,5

Genellikle çaydan kateşinlerin izolasyonu için basit sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve adsorbsiyon ayırma teknikleri kullanılır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğinin avantajı; daha az enerji tüketimi ve geniş kapasitesidir. Fakat organik çözücü fazlaca kullanıldığından üretim maliyetinin yüksekliği ve çevre kirliliği gibi iki önemli sakıncası vardır. Etil asetat, propil asetat, kloroform, ve diklorometan gibi fazla miktarlarda organik çözücünün sıvı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılması, son üründe belirlenemeyecek eser miktarlarda çözücünün kalmasına ve gıda sağlığında tehditlere yol açar. Adsorbsiyon ayırma metodu, çözücü kontrolü ve basit çalışma süreci ile daha avantajlıdır. Çay kateşinlerinin adsorbsiyon ile ayırma tekniğinde silikajel, selüloz, C-18 silika, Amberlite-XAD-7HP ve Amberlite XAD-4 reçineleri adsorban olarak kullanılır.

Çaydan kafein ve kateşin ekstraksiyonu ile ilgili en önemli çalışmalarından biri 2010 yılında Vuong ve arkadaşları tarafından yayınlanan derleme makalesidir. Bu çalışmada mevcut ekstraksiyon yöntemleri detaylarıyla açıklanmıştır. Endüstriyel anlamda çay ekstraksiyonuna yönelik çalışmalar genellikle çaydan kafeinin uzaklaştırılmasına yöneliktir. Kafeinsiz çay üretimi önemli bir endüstri alanı olup toksik kalıntı bırakmadan çayın kafeinsizleştirilmesi amaçlanır. Temelde hem kafein hem de kateşinler suda çözünür olduğundan kafeinin kloroform kullanılarak basit bir ekstraksiyonla ayrılması mümkündür. Kafein ve kateşinlerin ekstraksiyonuna yönelik bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Copeland ve ekibi (1998) ilk önce kloroform kullanıp çay deminden kafeini uzaklaştırdıktan sonra kateşinleri çöktürmek için tekrar kafein ekleyerek bir kateşin karışımı hazırlamıştır. Sonra karışım etil hegzanoat ve propil asetat ile bileşenlerine ayrıştırılıp dondurarak kurutma yoluyla EGCG yönünden ekstrakt elde etmişlerdir. Ayrıca, Jin ve ekibi (2006) çay çözeltilisinden kafeini uzaklaştırmak için kloroform ekstraksiyonu

uygulamış daha sonra kateşin karışımı ekstraktı elde etmek için etil asetat ile ekstraksiyon yapmıştır. Dong ve ekibi (2011) kateşinleri ekstre etmek için etil asetat kullanarak kateşin karışımı hazırlamıştır ve kafeinin %79'unu almak için etil asetat fazını sitrik asit ile yıkamış ve %69 (w/w) kateşin ve %4'ten az kafein içeren ürün elde etmiştir.

Yeşil çaydan kateşinlerin ekstraksiyonu için literatürde mevcut bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Vovk ve arkadaşlarının (2005) yaptığı bir çalışmada ise yeşil çay kaynayan su ile ekstre edilerek kafein ve kateşinler ayrılmış daha sonra kloroform ve etil asetat ekstraksiyonu ile birbirinden ayrılmıştır. Row ve Jin (2006) organik çözücü ekstraksiyonunu Kore çayında kullanmışlardır. 3 g yeşil çay yaprağını 60 mL saf su ile 50, 80, 100 derecelerde 4 saat, 40 dakika ve 15 dakika 300 rpm'de karıştırılarak ekstraksiyonları sağlanmıştır. Sonra süzgeç kağıdından süzülerek, süzölmüş kısımlar su/kloroform (1:1 v/v) ile fazlarına ayrılmıştır. Kafein ve diğer safsızlıklar kloroform fazına taşınmıştır. Su fazları biriktirilip su/etil asetat (1:1 v/v) ile yeniden fazlarına ayrılmıştır. Etil asetat fazına taşınan kateşin bileşikleri $MgSO_4$ kullanılarak kurutulduktan sonra evapore edilmiştir. En yüksek verimin 80 °C'de 40 dakikalık ekstraksiyonla elde edildiği rapor edilmiştir.

Kadeniz ve İlkay Koca tarafından yapılan çalışmada (2009) siyah çay örneklerinin su kullanılarak (100 °C) kafein ve kateşinler su fazına alınarak içerik analizi yapılmıştır.

1.1.4. Mikrodalga Yardımlı Ekstraksiyon (ME)

Bu yöntem karmaşık yapıları örneklerden önemli bileşenlerin ekstrakte edildiği çözücülerin ve mikrodalga enerjisinin kullanıldığı bir işlemdir. İkinci dünya savaşından beri kullanılan mikrodalga teknolojisinin, analitik laboratuvarında kullanımı 1970'lerin sonunda olmuştur. Mikrodalga enerjisinin etkinliği büyük oranda çözücünün içeriğine, bitki materyaline ve uygulanan mikrodalga gücüne bağlı olmaktadır. Polar moleküller ve iyonik türlerin bulunduğu durumlarda daha hızlı bir enerji yayılması gerçekleşmektedir.

Mikrodalga enerjisi elektrik ve magnetik alan bileşenlerini içeren yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalardır (300-300000 MHz). Elektromagnetik dalga olduklarından birbirine dik yönde etkiyen elektrik ve magnetik alan bileşenlerine sahiptirler. İletişim sahasında kullanımları yanında endüstriyel ve akademik sahada da uygulamaları vardır. Tıbbi, endüstriyel ve bilimsel çalışmalar için genelde 2450 MHz frekanslar tercih edilir. Bu

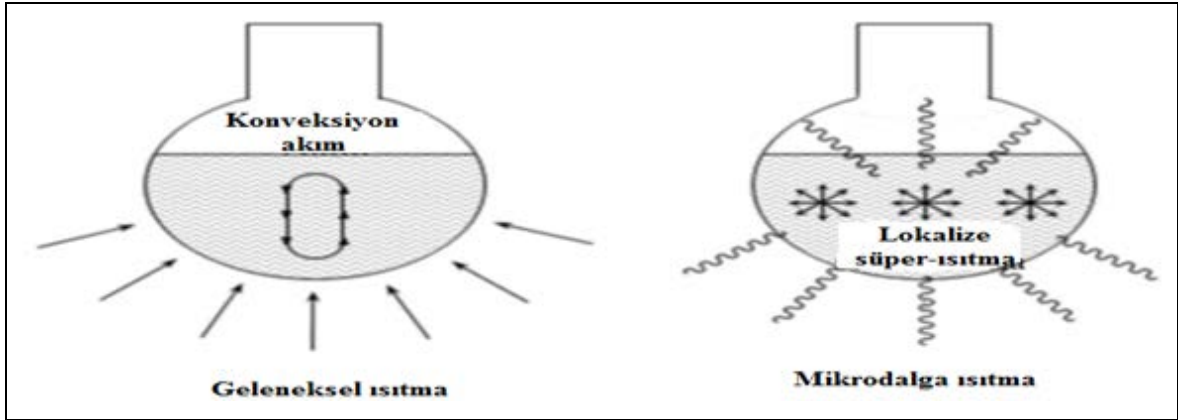
frekans 12.2 cm dalga boyuna karşılık gelir. Mikrodalgalar, ultraviyole, görünür yada infrared ışık gibi diğer elektromagnetik dalgalardan daha düşük enerjiye ve daha yüksek dalga boyuna sahiptir (Kingston ve Haswell, 1997). Genel olarak Mikrodalga-madde etkileşimi maddeler halinde sıralanırsa;

- 1) Kimyasal maddeleri doğrudan ısıtır.
- 2) Enerji tasarrufu sağlar, çünkü mikrodalgaların ısıya dönüşmesi yalnız malzemenin kapladığı hacim içinde meydana gelir ve civarı soğuk kalır.
- 3) Herhangi bir ikincil etki ve radyoaktivite tesiri göstermezler. Akım kesildiği zaman etkisi ortadan kalkar.
- 4) Elde edilen işlem hızı klasik metodlardan daha yüksektir
- 5) Karışımlarda seçici ısıtma sağlar.
- 6) Otomatik sistemlere kolaylıkla adapte edilebilir ve güç seviyesi elektronik olarak kontrol edilebilir.
- 7) Klasik ısıtmanın aksine sıcaklık gradyeni üreten volumetrik bir prosestir. Sıcaklık belirli bir kritik değere ulaştığı zaman çok hızla yükselir. Bu durum mikrodalga ile ısıtılan maddede ani bir sıcaklık yükselmesi meydana getirir.
- 8) Isıtma doğrudan ve merkezdendir.
- 9) Elektromagnetik dalgalarla taşındığından ortamda enerji kaybı meydana gelmez ve maddede sıcaklık gradienti minimum olur.
- 10) Maddenin içine kadar nüfuz eder ve böylece endüstriyel işlemin daha aktif ve hızlı yapılmasını sağlar.
- 11) Uzaktan etki yapar. Enerjiyi malzemeye taşıyan doğrudan bir araç bulunmaz. Kullanılan ortamda kirlenme olmadığından sistemin daha sağlıklı ve temiz kullanılabilmesini sağlar (Baysar ve Kuester, 1994; Strauss ve Trainor, 1995; Kingston ve Haswell, 1997).

Ekstraksiyon, elektromanyetik dalgaların sebep olduğu hücre yapısındaki değişiklikler sonucu ortaya çıktığından mikrodalga ekstraksiyonu (ME) yönteminin temeli geleneksel yöntemlerden (katı-sıvı, basit ekstraksiyon) farklıdır. Mikrodalga ekstraksiyonunda işlemin hızlanması ve yüksek ekstraksiyon verimi, aynı yönde çalışan ikili ısı ve kütle gradyan taşıma olaylarının birleşimi sonucu olabilir (Chemat vd., 2009). Oysaki, geleneksel ekstraksiyonda ısı transferi substratın dışından içine doğruyken, kütle transferi içten dışa meydana gelir (Şekil 1.9). Buna ek olarak, geleneksel ekstraksiyonda ısı, materyalin iç ısıtma ortamına transfer edilir. Oysaki ME'da ısı ışınlanmış ortam içine

hacimsel olarak dağıtılır. Ekstraksiyon işlemi esnasında, ekstraktın geri kazanılma hızı (oranı), zamanın lineer bir fonksiyonu değildir. Katı içindeki madde derişimin değişimi kararsız duruma yol açar. Katı parçacık içeren katı ve çözücü arasında ayırmayı oluşturan etkileşim süresi boyunca meydana geldiği öngörülen adımlar serisi şu şekildedir;

- 1) Katı matris içine çözücünün etkisi
- 2) Çözündürme ve/veya bileşenlerin parçalanması
- 3) Katı matris üzerinden çözünmüş maddenin taşınması
- 4) Katının dış yüzeyinden ekstrakte edilen çözünmüş maddenin taşınması (Aguilera, 2003).



Şekil 1.10. Geleneksel ve mikrodalga ısıtmada ısı dağılımı modelleri

Genellikle çözücü, difüzyon ile katı matris içine nüfuz eder ve katı özelliklerinin sınırlandırdığı derişimine varıncaya kadar çözücü dağılır. Çözünmüş madde içeren çözelti, etkin difüzyon ile yüzeye yayılır. Son olarak, doğal veya güçlendirilmiş konveksiyon, çözeltinin yüzeyden materyalin iç kısmındaki çözeltiye transferidir. Materyal ekstraksiyon boyunca fiziksel ve kimyasal pek çok etkileşime maruz kalır. Dağılma güçleri, dokular arası difüzyon, itici güçler ve kimyasal etkileşimler bunların sadece bazılarıdır. Bu olayların dayanıklılığı ve sürekliliği çözünürlük, çözündürme gücü, saflık, polarite gibi çözücünün özelliklerine bağlı olabilir (Majors, 2008).

Mikrodalga enerji kullanılarak ısıtmanın prensibi, iyonların iletimi ve dipol döndürme yoluyla molekül üzerine mikrodalga'nın direkt etkisi temeline dayanır. Çoğu uygulamalarda bu iki mekanizma eş zamanlı meydana gelir. İyonik iletim, bir manyetik alan uygulandığında iyonların elektroforetik göçüdür. Çözeltinin bu iyon akışına direnci sürtünme ile sonuçlanır ve böylece çözelti ısınır. Dipol döndürme uygulanan manyetik

alanla dipollerin yeniden düzenlenmesi anlamına gelir (Périno-Issartier vd., 2011; Buffler, 1993).

1.1.4.1. Mikrodalga Ekstraksiyonun Önemli Parametreleri

Mikrodalga ekstraksiyonunu etkileyen pekçok önemli parametre vardır. Bunlar sırasıyla aşağıda tartışılmıştır.

1.1.4.1.1. Çözücü Seçimi ve Oranı

Başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirmek için uygun çözücü seçimi çok önemlidir. Seçilen çözücülerin de mikrodalga ışımasını absorplaması, çözücünün matrisle etkileşimi ve analitin çözücüdeki çözünürlüğü göz önüne alınmalıdır (Pan vd., 2003). ME'nin seçiciliği üzerine çok az literatür rapor edilmiştir. Örneğin içindeki tüm maddeleri ekstrakte edildiğinden seçici bir ekstraksiyon tekniği olduğu söylenemez ve hemen hemen her durumda ekstraksiyon sonrası temizleme basamağı gereklidir (Song vd., 2011). Ekstraksiyon genellikle kapalı bir kapta gerçekleştirilir. Bu durumda basınç artar ve çözücü kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklara çıkabilir. Çoğu çözücü için (aseton, asetonhekzan, diklormetan aseton gibi) kabın içindeki sıcaklık, solventin kaynama noktasının 2-3 katıdır. Temel olarak iki tip ME sistemi kullanılabilir: Kapalı kap sistemi (kontrollü sıcaklık ve basınç altında) ve açık kap sistemi (atmosfer sıcaklığında). Kapalı kap sisteminde hücreler eşzamanlı olarak ışınlanırken, açık sistemde kaplar sıralı olarak ışınlanır. Açık kaplarda sıcaklık çözücünün atmosferik basınçta kaynama noktasıyla sınırlıyken, kapalı kaplarda sıcaklık uygulanan basınçla yükseltilebilir (Llompart vd., 1997). Kapalı kap sistemi, uçucu bileşikler olması durumunda daha uygun görünmektedir. Bununla birlikte, kapalı kaplarda, ekstraksiyon sonrasında kap açılmadan önce sıcaklığın düşmesini beklemek gereklidir. Bu bazı durumlarda ekstraksiyon süresini artırır.

ME yöntemini etkileyen en önemli faktör çözücü seçimidir. Uygun bir çözücü seçimi daha verimli bir ekstraksiyon işlemi sağlayacaktır. Çözücü seçimi, ilgili bileşiklerin çözünürlüğüne, çözücü etkisine, örnek matrisi ve dielektrik sabiti ile etkileşimine (Chen vd., 2008) ve yöntemin kütle kinetik transferine bağlıdır (Spigno ve De Faveri, 2009). Bu nedenle çözücünün analite seçici olması tercih edilir. Bir diğer önemli konu ise geleneksel ekstraksiyonda kullanılan çözücülerden doğrudan seçilmemesidir. Bu nedenle çözücünün mikrodalga enerji absorblama kapasitesine ve ısıtma kapasitesine de bağlıdır (Spigno ve

De Faveri, 2009; Eskilsson ve Björklund, 2000; Mandal vd., 2007; Chan vd., 2011). Genel olarak, çözücüde yüksek dielektrik sabiti ve dielektrik kayıp mevcutsa çözücünün mikrodalga enerjii absorblama kapasitesi yüksektir (Spigno ve De Faveri, 2009). Örneğin etanol oldukça iyi bir mikrodalga emici çözücü iken hekzan mikrodalga-geçirgen bir çözücüdür. (Spigno ve De Faveri, 2009; Tatke ve Jaiswal, 2011). Polar ve polar olmayan çözücüler ME'da kullanılabilir. Etanol, metanol ve su gibi yeterince polar olan çözücüler mikrodalga enerjisi tarafından ısıtılabilirler. Bu bağlamda, çözücünün özellikleri farklı çözücülerle birleştğinde de değiştirilebilir (Brachet vd., 2002) Kutuplaşmanın ana kaynağı olan dipol yönlendirmenin yanı sıra iyon iletkenliği ve dielektik etki ile ısıtmadaki ısı kaybı engellemelerinden dolayı çözücü ortama tuzların eklenmesi ısıtma hızını da artırır (Spigno ve De Faveri, 2009). Küçük miktardaki suyun matriksin hücrelerine difüzyonu kolaylaştırdığını daha iyi ısıtmayı sağladığını ve bu nedenle bileşiklerin daha yüksek oranlarda çözücü içine transferini kolaylaştırdığını göstermektedir.

1.1.4.1.2. Ekstraksiyon Süresi

ME da ısıtma süresi dikkate alınması gereken bir başka önemli faktördür. Ekstraksiyon süresi geleneksel yöntemlere göre çok kısa ve genellikle birkaç dakikadan yarım saate değişmektedir. Olası ısıl bozunma ve yükseltgenme kontrollü ışınlamayla önlenabilir (Al-Harahshed ve Kingma, 2004; Chan vd., 2011). Aşırı ısınma nedeniyle çözücünün (özellikle etanol, metanol ve çözücü kombinasyonunun) ısı kapasitesi artar. Su miktarının artması yüksek dielektrik özelliklerini ortaya çıkarır.

Uzun ekstraksiyon süresi genellikle ekstraksiyon verimini artırma eğilimindedir, ancak bu artışın çok da uzun olmadığı rapor edilmiştir (Wang vd., 2008). Çözücünün dielektrik özellikleri ışınlama süresini de etkilenmektedir. Su, etanol ve metanol gibi çözücüler çok uzun ısıtmaya maruz bırakılabilir ancak bu işlem termolabil (ısılkararsız) bileşenlerin parçalanarak kaybına neden olabilir (Mandal vd., 2007). Eğer uzun ekstraksiyon süresine ihtiyaç duyulursa kısa süreli ardışık ekstraksiyon devirleri uygulanarak aşırı ısınmaya engel olunabilir (Chan vd., 2011; Xiao vd., 2008). Bu durumda, bir sonraki ışınlama sürecinde taze çözücü materyali besler ve tekrarlanan basamaklarla en yüksek verime ulaşılır (Spigno ve De Faveri, 2009; Chan vd., 2011). İşlem döngülerinin sayısı matris türü ve çözünene bağlıdır.

1.1.4.1.3. Mikrodalga Gücü ve Ekstraksiyon Sıcaklığı

Mikrodalgada güç ve sıcaklık birbiriyle ilişkilidir çünkü yüksek mikrodalga güç sistemin sıcaklığını artırır ve ekstraksiyon veriminin artmasına sebep olur (Chemat vd., 2005; Hu vd., 2008; Chan vd., 2011). Matrise sağlanan enerji miktarını kontrol eden mikrodalga güç aynı zamanda sıcaklığıda kontrol etmektedir. Viskozite ve yüzey geriliminde oluşan düşüş sebebiyle yüksek sıcaklıklarda çözücü gücü artar, çözünmeyi kolaylaştırır ve matrisin ıslatma ve nüfuz etmesini teşvik eder (Mandal vd., 2007; Khajeh vd., 2009; Liv d., 2010;). Buna ek olarak kapalı bir kaptaki çalışıldığında çözücünün sıcaklığı kaynama noktasının çok üzerine çıkar böylece matris içindeki aktif bölgelerden bileşenlerin daha iyi ekstraksiyonuna yol açar (Eskilsson ve Björklund, 2000). Kullanılacak mikrodalga gücün büyüklüğü doğrudan doğruya örnek miktarı ve ekstraksiyon süresi ile ilişkilidir. Ancak örnek içinde bölgesel ısıtma alanları oluşabilir bu da bitki matrisini parçalamak için itici güç olarak hareket eder böylece çözünen dışarı difüze edilir ve çözücüye alınmış olur. Gücü artırmak, genellikle ekstraksiyon verimini artırır ve daha kısa ekstraksiyon süresi ile sonuçlanır (Hu vd., 2008; Chan vd., 2011). Ancak ekstraksiyon süresiyle ilgili tartışmada olduğu gibi termal olarak duyarlı bileşiklerin bozulmasına da neden olabilir. Ayrıca, daha yüksek güç kullanıldığında, hücre duvarının hızlı yırtılması da gerçekleşir, bunun sonucu olarak daha fazla istenmeyen madde de çözünen ile birlikte ekstre edilmiş olur (Mandal vd.,2007).

İstenilen sıcaklığa ulaşmak ve zamanı en aza indirmek için en uygun ME gücünü seçmek önemlidir (Eskilsson ve Björklund; 2000). Alfaro ve arkadaşları (2003) mikrodalga ekstraksiyonda mikrodalga güç etkisini incelemek için bir terim önermektedir. Bu terim belirli bir zaman için çözücünün birim hacmi başına mikrodalga radyasyon enerjisi olarak tanımlanan enerji yoğunluğudur (W/mL). Li ve arkadaşlarına (2010) göre enerji yoğunluğu, bir güç düzeyinde tek başına parametre olarak kabul edilmelidir.

1.1.4.1.4. Yüzey Alanı ve Su Miktarı

Sadece yukarıda belirtilen parametreler değil, örnek özelliklerinin de ME sürecine etkisinin tartışılması ve dikkate alınması gereken bir parametredir. Daha yüksek bir temas yüzey alanında ekstraksiyon veriminin artacağı bilinmektedir. İnce parçacıklar mikrodalganın derin girişine izin verir (Huie, 2002). Diğer taraftan, çok ince parçacıklar birkaç teknik sorunda yaratabilir ancak santrifüj veya filtrasyon ile bunun üstesinden

gelinebilir (Mandal vd., 2007; Tatke ve Jaiswal; 2011). Hazırlık aşamasında örnek öğütülür ve matris çözücü arasındaki temas alanını artırmak için homojenize edilir. Parçacık boyutları genellikle 2 mm ile 100 mm aralığındadır (Eskilsson ve Björklund, 2000). Bazı durumlarda, mikrodalga ekstraksiyonu öncesinde kurutulmuş bitki materyallerinin ekstraksiyon çözücüsünde ıslatılması verim artışına neden olur. Bu yöntem ön özütleme (pre-leaching) olarak adlandırılır (Mandal vd., 2007). Birçok durumda ekstraksiyon geri kazanımı örneğin içerdiği nem tarafından artırılır. Örnek içindeki nem ısınır, buharlaşır ve hücrede iç basıncın oluşumuna neden olur. Bu basınç çözünüeni serbest bırakmak için hücreyi parçalar bundan dolayı ekstraksiyon verimi artar (Wang ve Weller, 2006). Ayrıca, suyun bulunması hidrolizi teşvik eder ve böylece bileşiklerin oksidasyon riskini azaltır (Wang vd., 2008). Verim artışının muhtemel nedeni, suyun şişmeyi artırması ve çözücü ile bitkisel materyal arasındaki temas yüzey alanını artırmasıdır (Yan vd., 2010).

Ekstraksiyon yöntem verimliliği en yüksek geri kazanıma özellikle bileşenlerin etkisine, en kısa işlem süresi, en düşük üretim maliyetine ve minimum organik çözücü kullanımına dayalı iken ideal ekstraksiyon teknolojisi ekstrakte edilen bileşik tipine bağlıdır (Dhobi vd., 2009).

Mikrodalga ekstraksiyon ile verim ve seçicilik performansını artırmak için geliştirilmiş bazı teknikler de mevcuttur. Bunlar doğrudan mikrodalga ekstraksiyonu yerine birleştirilmiş tekniklerdir: Bitki ve baharatların uçucu yağların izolasyonu için mikrodalga destekli damıtma (MAD) (Chemat ve Smadja, 2004); mikrodalga hidrodifüzyon ve ağırlık ekstraksiyonu (Vian vd., 2008); vakum mikrodalga hidrodamıtma (VMHD); biyolojik matriksten su-yağın azeotropik karışımının buharlaştırılması için 100 ve 200 mbar arasında basınçlarla mikrodalga ekstraksiyonu (Mengal ve Mompon, 1996); Soxhlet'le birleştirilmiş mikrodalga ekstraksiyon ve çözücü içermeyen mikrodalga ekstraksiyonu bu kombinsyon örneklerinin bazılarıdır (Chemat vd., 2004). Bu teknikler bilimsel olarak araştırıldığında, dünya çapında bitkisel ilaçların kalitesinin sağlanması için etkili ekstraksiyon teknolojileri olarak gösterilmektedir (Mandal vd., 2007). Özetle, mikrodalga ekstraksiyonu birçok nedenlerden dolayı doğal ürünlerin ekstraksiyonunda geleneksel yöntemlere alternatif bir yöntem olarak çok kullanılmaya başlanmıştır. Tabiki bazı dezavantajlarından da söz edilebilir: Birincisi katı tortuyu uzaklaştırmak için ek filtrasyon veya santrifüj işlemleri gerekebilir; hedef bileşikler veya çözücüler apolar/uçucu olduğunda ekstraksiyon verimi düşük olabilir; son olarak da yüksek sıcaklıkların kullanımı ısıya duyarlı biyoaktif bileşiklerin kaybına yol açabilir (Wang, 2010). Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında ve

ME' nin avantaj ve dezavantajları düşünüldüğünde geleneksel yöntemlerle bir performans karşılaştırması yapılabilir.

1.1.4.2. Çay Örneklerinin Mikrodalga Ekstraksiyonu

Mikrodalga ekstraksiyon tekniğinin geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre bazı üstünlüklere sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Genel olarak, mikrodalga ekstraksiyon tekniğinin, kateşin için etkin bir ekstraksiyon yöntemi olduğu gösterilmiş ve çay bileşenlerinin ekstraksiyonu için umut verici yeni bir yöntem olarak teşvik edilmiştir. Örneğin Mandal (2007), Sherwani ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada sekiz farklı çayı geleneksel ve mikrodalga ekstraksiyon yöntemlerine göre ekstre edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Mikrodalga ekstraksiyonu ile 140 W, 210 W ve 245 W olmak üzere üç farklı güçte, 100 mL su çözücüsü içinde 15 dakikalık süreçte ekstre edilmiş en yüksek ekstrakt verimi % 34,1 olarak 245 W güç de yeşil çayda elde edilmiştir. Vuong ve ark. (2012) poşet yeşil çay örneklerini 200 mL su çözücüsünde 500 W güçte kullanarak 30 saniyeden 120 saniyeye değişen zaman aralıklarında ev tipi bir mikrodalga ile ekstraksiyona tabi tutmuşlardır. Çay çözeltisi oda sıcaklığına getirmek için buz üzerinde soğutulup 1:1 oranında 500 mM L-tryptophan ile seyreltilerek HPLC analizine hazırlanmıştır. Çalışmanın ikinci kısmında 200 mL sıcak suda yarım dakika, 1, 2, 3 veya 4 dakika bekletildikten sonra 500 W güç de 30, 45 ve 60 saniyelik süreçlerde mikrodalga ekstraksiyonu yapılarak diğer işlemleri aynen uygulamışlardır. En yüksek kateşin verimleri en az yarım dakika sıcak suda bekleterek 1 dakika ev tipi mikrodalga ekstraksiyonda elde edilmiştir.

Vuong ve arkadaşları (2012) yeşil çayın ekstraksiyon verimliliğinde önemli olan dört parametreyi incelemişlerdir. Bu parametreler *i*) ön demleme (0-180 dk), *ii*) ME süresi (0-6 dk) *iii*) su/çay oranı(4:1-100:1, mL:g), *iv*) çay parçacıklarının boyutu olarak belirlenmiştir. Oda sıcaklığında değişen zaman aralıklarında ön demleme işlemi ardından 800 W güçte mikrodalga ekstraksiyonu yapılarak ilk 43 saniye çalıştırdıktan sonra 13 saniye kapatılıp takiben 3 saniye çalıştırılıp tekrar 13 saniye kapatılarak ardışık ışınlamalarla farklı zaman aralıklarında 80 °C'de ekstraksiyon sürdürülmüştür. Sonuçta yeşil çayın ME için bir saat ön demleme, iki dakika ME süresi, 30 mL:g su/yeşil çay oranı ve 850 µm boyutta en yüksek ekstrakt verimi sağladığı rapor edilmiştir. Benzer bir çalışma Li ve ark. (2010) tarafından rapor edilmiştir. 600 W gücünde bir mikrodalga ekstraktöründe 3 dakika süre

ile 20:1 (mL:g) oranındaki çayın su ile ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. ME daha kısa ekstraksiyon süresi, büyük enerji tasarrufu ve çevresel kirliliğin azaltılması gibi önemli avantajlardan dolayı geleneksel yöntemlere göre üstünlüklere sahiptir.

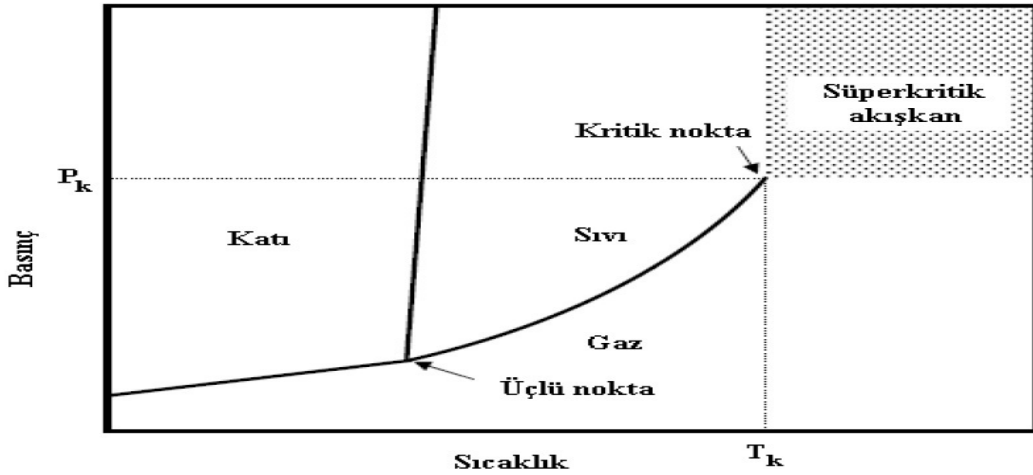
Mikrodalga ekstraksiyon tekniği ile ilgili olarak literatürde su dışında diğer çözücülerin kullanıldığı çalışmalar da rapor edilmiştir. Pan ve ark. (2003) 20:1 (mL/g) çözücü/çay oranında 90 dakika boyunca oda sıcaklığında %50 (v/v) etanol ile kuru çayın demlenmesi ve bu işlemi takiben ev tipi mikrodalga ile maksimum ekstraksiyon verimlerine ulaşıldığı rapor edilmiştir. Nkhili ve ark. (2009) 600W mikrodalga fırında 80 ile 100 °C arasında kontrollü bir sıcaklık ile 20:1 (mL/g)'de çözücü çay oranı için 30 dakikalık süreçte ekstraksiyon verimlerini belirlemişlerdir. Bu koşullar altında çay kateşinlerinin ekstraksiyon veriminin geleneksel ısıtma yöntemlerine göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir.

1.1.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE)

1980'lerin ortalarından itibaren kimyacılar, endüstride ve kontrol amaçlı resmi laboratuvarlarda, karmaşık yapıları örneklerden analitleri ayırmak için süperkritik akışkanları kullanmaya başlamıştır. Çünkü bu akışkanlar, sıvıların kullanımında karşılaşılan problemlerin bir çoğunu ortadan kaldırmaktaydı. Süperkritik akışkan kullanımı diğer ekstraksiyon yöntemlerine karşı alternatif bir yöntem olarak ilgi çekmektedir. Bazı durumlarda, destilasyon, Soxhlet, sıvı ekstraksiyonu gibi yöntemlerle başarısız olan çözme üstünlükleri sağlar.

1.1.5.1. Süperkritik Akışkanlar ve Özellikleri

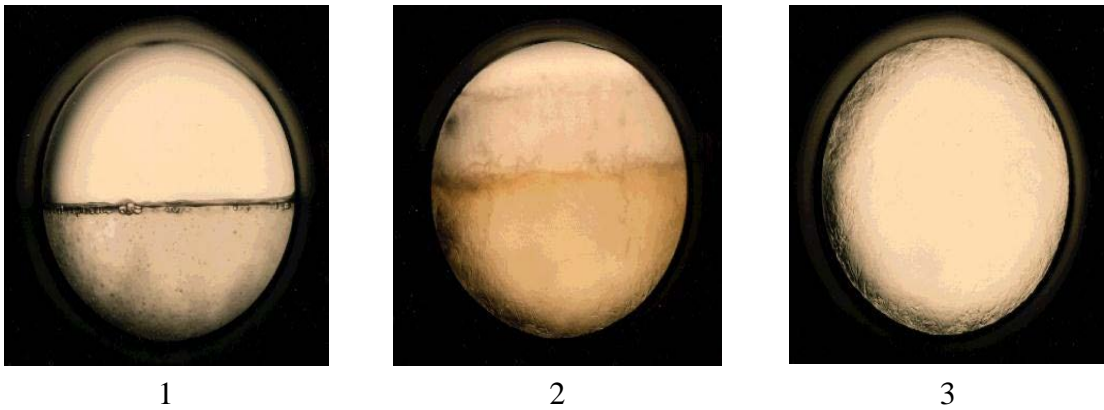
Saf bir madde için sıcaklık-basınç arasındaki ilişkiyi gösteren faz diyagramı Şekil 1.11'de verilmiştir.



Şekil 1.11. Saf bir madde için sıcaklık-basınç diyagramı

Bir maddenin, basınç-sıcaklık faz diyagramında gaz-sıvı denge eğrisi ileriye doğru hareket edilecek olursa, sıcaklık ve basıncı artar. Isıl genleşmeler nedeniyle, sıvının yoğunluğu azalırken; basınç arttığından gazın yoğunluğu artmaya başlar. Giderek sıvı ve gazın yoğunlukları birbirine yaklaşır, gaz ve sıvı arasındaki farklar kaybolur ve eğri bir kritik noktaya gelir. Bu noktada madde artık “akışkan” olarak adlandırılabilir. Böylece, maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığının (T_k), basıncı ise kritik basıncının (P_k) üzerine çıkartıldığında katı, sıvı ve gaz fazlarından daha farklı, yeni bir bölge ortaya çıkar ve bu bölgedeki akışkan “süperkritik akışkan” olarak tanımlanır. Kritik nokta Baron Charles Cagniard de la Tour tarafından 1822 yılında bulunmuş, Thomas Andrews ise 1870 yılında süperkritik hal diye bir kavramı ilk defa tanımlanmıştır (Brunner, 2005).

Sıvı ve gaz fazları arasındaki ayrımın kritik noktaya ulaşıldığında ortadan kalkması Şekil 1.12’ de verilmiştir.



Şekil 1.12. İki faz bölgesindeki CO_2 'in artan basınç ve sıcaklıkla süperkritik hale geçişi

Şekil 1.12’de sıvı-gaz sisteminde ayırım açıkça ayırt edilebilirken (1.durum) sistemin sıcaklık ve basıncının artırılmasıyla ayırım daha az fark edilir. (2.durum) Bu iki fazın yoğunlukları arasındaki farkın azalmasından kaynaklanır. En sonunda ayırım tamamen ortadan kalkar (3. durum) ve sistem homojen hal alır (Oakes, 2001).

Süperkritik akışkanların fizikokimyasal özellikleri sıvılarla gazların özellikleri arasındadır. Bu süperkritik akışkanların daha etkin bir çözücü olmasını sağlamaktadır. Gaz, sıvı ve süperkritik akışkanlar için özellikler Tablo 1.5’de verilmiştir (Brunner, 2005).

Tablo 1.5. Yoğunluk, viskozite ve difüzyon hızı değerlerinin değişimi

Özellik	Sıvı	Süperkritik Akışkan	Gaz
Yoğunluk (g/cm ³)	0,6-1,6	0,2-0,5	(0,6-2,0)x10 ⁻³
Viskozite (g/cms)	(0,2-3,0)x10 ⁻²	(1,0-3,0)x10 ⁻⁴	(0,6-2,0)x10 ⁻⁴
Difüzyon hızı (cm ² /s)	(0,2-2,0)x10 ⁻⁵	0,7x10 ⁻³	0,1-0,4

Süperkritik bir akışkanın çözme gücü o akışkanın yoğunluğuna bağlıdır. Sıvının gibi yüksek yoğunluk ve çözme gücü, gazın gibi düşük viskozite, sıfır yüzey gerilimi ve analitler için yüksek difüzyon hızına sahiptir (Büyüktuncel, 2012). Yayımlılığın artması ve düşük viskoziteleri nedeniyle, süperkritik akışkanların katı gözenekli materyallere gazlar gibi kolayca yayılabilmekte ve çözme güçleri artmaktadır. Çözme ve yayılma gücü sıvılara göre daha fazla olduğundan, hızlı reaksiyon kinetiğine sahiptirler (Zougagh vd., 2004; Mira vd., 2009). Normal sıvıların tersine, süperkritik akışkanlar sıkıştırılabilir ve bu yüzden yoğunlukları geniş bir aralıkta değiştirilebilir. Yoğunluk ve diğer özellikleri, sıcaklık ve basıncın ayarlanmasıyla kolaylıkla değiştirilebilir. Bu önemlidir, çünkü süperkritik akışkanının daha yüksek yoğunluğu, onun daha iyi çözme kabiliyeti anlamına gelmektedir. Yoğunlukla maddelerin süperkritik akışkanlardaki çözünürlüğü, sıvılardaki çözünürlüğünden daha fazladır. Süperkritik akışkan çeşitli örnek matrisleri için ideal bir ekstraksiyon ortamı oluşturur. Sıcaklık, basınç ve çözme gücünün değiştirilmesiyle yüksek seçicilik de sağlanır (Zougagh vd., 2004).

Süperkritik akışkan bir örnekten geçirilmesi ile özellikle iyonlaşmayan türlerin ayrılması için elverişli bir teknik oluşur; Bu tekniğe *süperkritik akışkan ekstraksiyonu* (SFE) denir. Gıda ve ilaç endüstrisinde değerli ve ortam koşullarına duyarlı hammaddelerin ekstraksiyonunda kullanılacak akışkanın seçimi son derece önemlidir. Bu seçimde, hammaddenin akışkan içinde çözünürlüğü; kimyasal kararlılığı; ekonomik ve

kolay bulunabilen bir akışkan olması ve akışkanın toksik, patlayıcı ve yanıcı olmaması gibi sorunları göz önünde tutulmalıdır. Tablo 1.6’da biyolojik uygulamalarda en çok kullanılan çözücülerin kritik sıcaklık, basınç ve yoğunluk değerleri verilmiştir (McHugh ve Krukoniş, 1994). Amonyak, n-pentan, metanol ve toluenin kritik sıcaklıklarının yüksek olması nedeniyle, sıcaklığa duyarlı olan doğal maddelerin ekstraksiyonu için uygun çözücü olmadıkları görülmektedir (Çalımlı, 2003).

Tablo 1.6. Süperkritik akışkanların fiziksel özellikleri

Çözücü	T_c (K)	P_c (MPa)	ρ_c (kg/m ³)
Etilen	282,5	5,0	220
Karbondioksit	304,3	7,4	470
Etan	305,4	4.9	200
Propan	369,9	4.3	220
Amonyak	405,4	11.3	240
n-pentan	469,6	3.4	240
Metanol	512,7	8.1	270
Toluen	591,8	4.1	290
Su	647,7	22.1	320

Süperkritik akışkan olarak genellikle düşük kritik sıcaklık ve basınca sahip olduğundan karbondioksit (Kritik koşulları =31,1°C ve $P_c=72,8$ atm =7.4 MPa) kullanılır. Karbondioksit toksik değildir, alev almaz oldukça ucuzdur, kimyasallara ve radyoaktif maddelere karşı kararlıdır, sistemden kolaylıkla ayrılır ve geride atık bırakmaz (Büyüktünel, 2012). CO₂, endüstride amonyak sentezi ve fermentasyon işlemlerinin yan ürünü olarak bol miktarda üretilmektedir. Doğada saf ve ucuz olarak bulunabilen bir başka madde ise sudur. Suyun süperkritik akışkan olarak kullanım alanı, sahip olduğu yüksek kritik sıcaklık ($T_c=647.7$ K) değeri nedeniyle sınırlıdır (McHugh ve Krukoniş 1994). Polar olmayan ve orta polar organik bileşikler için yüksek çözme gücü gösterir. Karbondioksit apolar olduğundan, daha polar analitlerin ekstraksiyonunu artırmak için karbondioksite modifiyer çözücüler de eklenir (Büyüktünel, 2012). Süperkritik akışkan ekstraksiyonu yukarıda özetlenen avantajlarıyla klasik çözücü ekstraksiyonu yöntemlerinin yerini almaktadır (Lang ve Wai, 2001).

Bazı dezavantajlarında şu şekilde sıralanabilir. Süperkritik akışkanlarla ayırma işlemlerinin yüksek basınçta (>80 atm) gerçekleşmesinden dolayı yatırım maliyeti ve enerji

gereksiniminin artışı gibi birkaç dezavantajı vardır. Bununla birlikte, kateşinler için yüksek ekstraksiyon verimi her zaman mümkün olmayabilir (Park vd., 2007). Bir başka dezavantajı ise en saf CO₂ tüplerinin içeriğinde bile varolan %1-2'lik oksijenin, antioksidantlar gibi oksijene hassas bileşikler ile reaksiyona girip az miktarda da olsa bozunmalarına neden olmasıdır (Cocero vd., 2000)

1.1.5.2. Çay Örneklerinin Süperkritik Akışkan ile Ekstraksiyonu

Çay örneklerinin süperkritik ekstraksiyonu ile ilgili literatürdeki çalışmalar çok fazla değildir. Kim ve ark. (2007) saatte 5,04–28,08 kg CO₂/kg akış hızında, 10–40 MPa basınçta, %15,8–23,8 kütlede su miktarı ve 313–353 K aralıklarında değişen sıcaklıklarda süperkritik karbondioksit yöntemi kullanarak yeşil çaydan kafeini ekstrakte etmişlerdir. Park ve arkadaşları (2007), sıcaklık, basınç ve modifier kullanımının, yeşil çaydan kafein ve kateşinlerin ekstraksiyonunda büyük etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Etanol kullanarak 7 g çaydan 300 bar basınçta ve 70 °C sıcaklıkta, 120 dk'lık ekstraksiyon ile kafeinin %97 den fazlasının ayrıldığı rapor edilmiştir. İçen ve Gürü (2009) 250 bar basınç, 60 °C sıcaklık ve 11 g/dk CO₂ akış hızında 7 saat sürede atık çaydan kafein izole etmişlerdir. Kim ve ark. (2008) modifier çözücü su ile süperkritik karbondioksit ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yeşil çaydan kafein ve EGCG ekstrakte ederek, 40-80 °C sıcaklık, 200-400 bar basınç ve %4-7 su içeriğinde bir seri optimizasyon çalışması yapmıştır. En iyi verimin 40 °C, 400 bar ve %7 su içeriğinde sağlandığı belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar, su veya etanolün çözücü olarak kullanıldığı geleneksel sıvı ekstraksiyon yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Sun ve ark. (2010) süperkritik karbondioksit metodunu kullanarak yeşil çaydan kafein ve kateşinin alınmasında modifier (yardımcı) çözücü, çay parçacıkları boyutu, ekstraksiyon sıcaklığı ve zamanın etkilerini incelemişlerdir. Etanolün en iyi yardımcı çözücü olduğu belirtilmektedir. Ortogonal dizi tasarım yöntemine göre yeşil çayı kafeinsizleştirmek için en iyi yöntemin 0,2-0,6 mm boyutundaki, 10 g çayın 300 bar basınçta, dakikada 1,5 L akış hızında 80 °C'de 15 mL etanol modifiyeri kullanılarak 2 saat boyunca yapılan süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu olduğu belirtilmiştir. Bu şekilde yeşil çaydan % 70,2 kafein, % 6,2 kateşin elde edildiği rapor edilmiştir.

1.1.6. Çay Fenoliklerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler

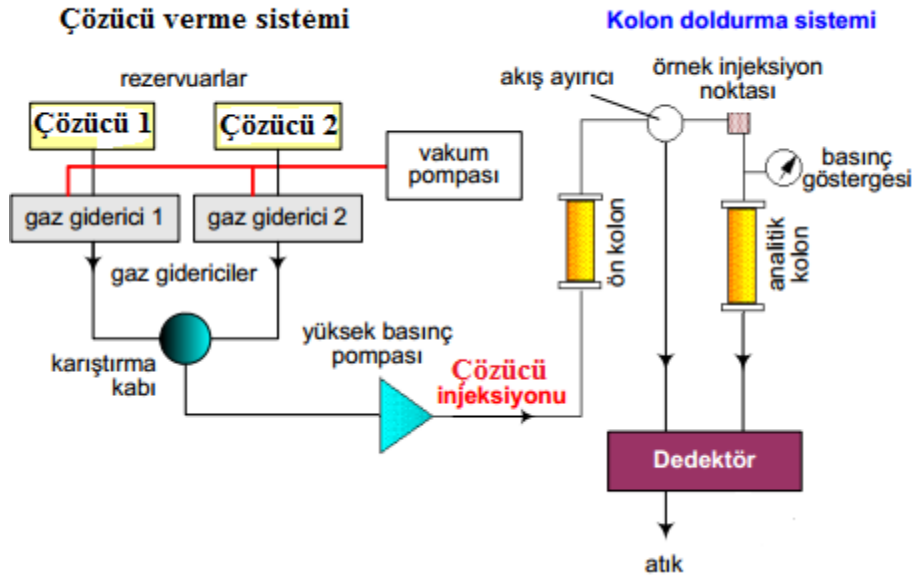
Kromatografi bir karışımda diğer yöntemlerle ayrılmaları zor olan benzer özellikli bileşenlerin ayrılması, tanımlanması veya nicel ölçümlerinin yapılmasına olanak sağlayan yöntemler topluluğudur. Tüm kromatografik ayırmalarda numune bir gaz, sıvı ya da süperkritik akışkan hareketli bir fazda çözülür. Ardından bu hareketli faz uygun bir sabit faz boyunca geçirilir. Bu iki faz öyle seçilir ki numunenin bileşenleri hareketli faz ve sabit faz arasında kendiliklerinden farklı derecelerde dağılırlar. Sabit faz tarafından güçlü bir şekilde tutulan bileşikler hareketli fazın akışıyla yavaşça hareket ederken sabit faz tarafından zayıfça tutulan bileşikler hızlıca hareket ederler. Hareketlilikteki bu farklılıkların bir sonucu olarak numunenin bileşenleri birbirinden ayrılarak kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilir (Skoog vd., 1998). Kromatografi hareketli fazın özelliklerine, hareketli fazla sabit fazın temas şekline veya bileşenlerin birbirinden ayrılma mekanizmasına göre sınıflandırılır.

Bitkilerin uçucu bileşenleri gaz kromatografisiyle analizlenirken daha büyük moleküler yapıları fenolik bileşikler sıvı kromatografisiyle (HPLC) analizlenir. Çay ekstraksiyonu ürünleri suda çözünen orta polar karakterli bileşikler sınıfında olduğu için analizleri genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilir.

1.1.6.1. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) özellikle biyolojik, farmakolojik, besinsel, çevresel ve endüstriyel v.b. numunelerde organik ve anorganik bileşiklerin ayrılma ve belirlenmesi için uygulanan analitik bir tekniktir. Numunelerdeki bileşikler sıvı hareketli faz ve sabit faz arasında dağılım davranışlarındaki farklılıklardan dolayı kolon boyunca farklı hızlarda geçerler.

HPLC cihazları hareketli faz deposu, pompa, enjektör, ayırma kolonu (seçimli ön-kolon), kolon ısıtıcısı, dedektör ve integratör veya bilgisayarlı dijital sinyal alıcısı içerirler. HPLC cihazının genel bir görüntüsü Şekil 1.13'de verilmiştir (URL 2, 2014).



Şekil 1.13. HPLC cihazının genel görüntüsü

Ultraviyole dedeksiyonuyla birlikte RP-LC (ters faz-sıvı kromatografisi) bitki ekstraktlarının fenolik bileşikleri için seçilen bir yöntemdir. Fenollerin ayrılması genellikle metanol veya asetonitril ve modifiye edici olarak az miktarda asit içeren su hareketli fazlarıyla çalışan C18 kolonlarında gerçekleştirilir. Mobil fazda fenolik asitlerin protonlaşmalarını önlemek için formik asit (HCOOH), asetik asit (AcOH), trifloroasetik asit (TFA) ve fosforik asit (H₃PO₄) gibi asitler modifiye edici olarak kullanılırlar ve böylece pik şekli ve çözünürlüğün iyileştirilmesi sağlanır (Wu vd., 2004).

On-line UV spektrum bileşiklerin tanımlanmasını kolaylaştırırken, diyot serili dedektörler (DAD) seçicilik ve duyarlılığı optimize etmek için farklı dalga boylarının eş zamanlı olarak görüntülenmesi için kullanılırlar. RP-LC-DAD (ters faz-sıvı kromatografisi-diyot serili dedektör), pek çok fenolik bileşik için güçlü bir analiz yöntemi olarak gösterilmiştir. Fakat yinede UV dedeksiyonu belli uygulamalar için yeterince duyarlı ve spesifik değildir.

Çay fenoliklerinin HPLC ile analizleri konusunda yüzlerce çalışma mevcuttur. Çay kökenli flavonoidlerin analizinde yegane teknik olarak tanımlanabilir.

1.1.6.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi, bir katı-sıvı adsorpsiyon kromatografisidir. Bu yöntemde sabit faz, çeşitli materyallerden yapılmış plakalar üstüne (cam, alüminyum, polimer) ince

bir tabaka halinde kaplanmış katı adsorban maddedir. Adsorban madde olarak kolon kromatografisinde de kullanılan tüm sabit fazlar (poliamid, alümina, silika jel, selüloz vb.) kullanılabilir.

Maddelerin kolay, hızlı ve kesin taranması ve ucuz olması sebebiyle geleneksel TLC, gıda, çevre, ilaç, bitki ve metabolizma gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılan bir tarama tekniğidir. Ancak geleneksel yöntem çoğunlukla sınırlı analiz gücüne sahip ve çoğunlukla nitel analiz için kullanılır. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HP-TLC), geleneksel TLC'yi model alarak geliştirilmiş ve nicel analiz yapabilen modern bir analitik cihaz halini almıştır. Günümüzde plaka ve cihaz alanında meydana gelen teknolojik gelişmeler, sistemin ayırım sağlamadaki performansını arttırmış ve 1980 sonrası densitometre ünitesinin sisteme kazandırılmasıyla oldukça yüksek hassasiyette, kesin ve hızlı miktar analizi yapabilen bir teknik olarak, son zamanlarda analitik uygulamalarda yerini almıştır. Oldukça basit olan bu kromatografi tekniğinin standardize edilmesi ile kullanım alanları daha da artmıştır. Özellikle bitkisel araştırmalarda, çevre analizlerinde, gıda güvenliğinde, klinik uygulamalarda, metobilizma çalışmalarında, farmasötik uygulamalarda ve adli incelemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Türkmen vd., 2008).

Tekniğin uygulandığı ve yarı otomatize olan bu sistem, tek bir yazılım ile bilgisayar tarafından kontrol edilen ve farklı işlemlere sahip cihazlardan oluşur. Bu cihazlardan ilki plakaya en az 36, en çok 72 numune tatbik edebilen, robotik bir şırınga sistemine sahip örnekleyicidir. Uygun şekilde yerleştirilen vialler içindeki numunelerin, belirlenen miktarda ve bilgisayar kontrolü ile plakaya x-y düzleminde, uygun mesafelerde azot gazı altında bant veya nokta şeklinde uygulanmasını sağlar. Örnekler bu yolla plaka yüzeyine uygulandıktan sonra plaka yürütme tankına ayırım işleminin gerçekleşmesi için bırakılır. Daha sonra plaka, ayırımı gerçekleştiren lekelerin densitometrik olarak değerlendirilmesi için üçüncü cihaz olan tarayıcı ünitesine uygun şekilde yerleştirilir. Densitometri, plaka üzerindeki her bir lekeye gönderilen ışığın şiddetinden, yansıyan ışığın şiddeti çıkartılarak elde edilen spektrumdan bileşenin derişimine ilişkin bilgi sağlar.

1.1.7. Dünyadaki Pazarı

Çay ve çay atıklarından izole edilebilecek kimyasalların miktarı azımsanmayacak kadar önemlidir. Pek çok farklı marka içinde belli oranlarda kateşin içeren ürünleri içerik

miktarına göre değişen fiyatlarla piyasaya sunmaktadır. Tablo 1.7' de bazı ticari ürünler ve fiyatları bulunmaktadır (URL-3, 2013).

Tablo 1.7. Bazı ticari kateşin ürünleri ve fiyatları

Super Green Tea, 90 softjel, 12\$
Shogun Imperial Green Tea, 335 mg, 150 tablets, 19\$
Applied Nutrition Green Tea Fat Burner with EGCG - 200 Softgels, 25\$
Mega-T Green Tea 30 Caplet with Hoodia, 8\$
Maximum International Hoodia 500 with Green Tea, Veggie Caps, 120-Count Bottle, 36\$
AOR EGCG MAX 700mg epigallocatechin gallate - 90 vcaps, 46 \$
Xian Ruiren Biologic Products Co., Ltd. (Ruiren), 10-120\$ kg
Sigma Aldrich 5g'lık 1 kutu sentetik kafein 21 Euro

Bu pazar göz önüne alındığında Türkiye gibi çay üreticisi olan bir ülkede içimlik çay dışı ürünlerin değerlendirilmesi hem Türk çayının tanıtılması hem de çay dışı ürünler pazarında yerini alması için önemli bir başlangıç olacaktır. Yeşil çay kateşinlerinin dünya pazarındaki yeri ve yıllık potansiyeli hakkında en önemli veriler European Green Tea Extracts (GTE) Markets başlıklı bir raporla Research and Markets tarafından yayınlanmıştır (URL-4, 2011). Ticari olarak kateşin türevlerini satan firmalar istenen miktara ve kaliteye göre fiyat seçenekleri sunmaktadır. Özellikle bu pazarda kateşin türevleri farklı formülasyonlarla birlikte yağ yakıcı tabletler olarak tanıtılmakta ve sağlık ürünleri ve günlük yaşam destekleri içinde gösterilmektedir.

Diğer bir endüstriyel ürün olan kafeinin en yaygın kullanım alanı gıda sektörüdür. Kolalı içecekler için giderek artan kafein ihtiyacı, günümüzde genellikle sentetik yöntemlerle karşılanmakta ise de, tarıma dayalı ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de çay ve çay atıklarından üretimi, giderek önem kazanmaktadır. Bunun dışında özellikle kozmetik sanayinde ve ilaç sektöründe de tercih edilen bir ürün haline gelmiştir. Kafein ilaç endüstrisinde saf halde ya da karışım olarak kullanılır. En çok kafein-sodyum benzoat, kafein-sodyum salisilat ve kafein sitrat şeklinde kullanılmaktadır. Ayrıca piyasada 30 mg kafein içeren aspirin ve kafein tabletleri (350 mg salisilik asit+30 mg kafein) bulunmaktadır.

Özellikle enerji içeceklerinin üretiminde giderek artan bir potansiyele sahiptir ve bu yönüyle önemli bir endüstriyel hammadde adayıdır. Sadece ülkemizde kullanılmak amacıyla her yıl yaklaşık 50 ton kafein ithal edilmektedir.

1.1.8. Çalışmanın Amacı

Çay bitkisi, Çin, Japonya, Kuzey Hindistan, Endonezya gibi Doğu ve Uzakdoğu ülkelerinde yetişen ve uygun iklim koşullarına sahip diğer ülkelerde de kültürü yapılan, binlerce yıldan beri tanınan bir bitkidir. Çayın, statü sembolü ve şifa veren bir içecek olması sebebiyle, yüzyıllarca Asya kültüründe önemli bir yeri olmuştur (Işık, 2010). Yağışın bol ve iklimin sıcak olduğu bölgelerde yetiştirilmesine rağmen dünyada çay üretiminin ekonomik olarak yapıldığı yerler sınırlıdır. Hindistan, Çin, Sri Lanka, Endonezya, Kenya ve Japonya çay bitkisinin yaygın olarak yetiştirildiği ve çay üretiminin yoğun olarak yapıldığı ülkelerdir. Bu ülkeler ve Türkiye ile birlikte 30'a yakın ülkede ekonomik düzeyde çay üretimi gerçekleştirilmektedir. Türkiye'de çaylık alanların % 65,62'si Rize, % 20,46'sı Trabzon, % 11,3'u Artvin, % 2,6'si ise Giresun ve Ordu illerinde olmak üzere Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunmaktadır. Günümüzde bu bölgemiz Türkiye'nin ihtiyacını karşılamakta ve çay ihracatı yapacak boyutta üretim yapabilmektedir (Fisunoğlu ve Besler, 2008).

Türkiye'de çay Mayıs- Ekim ayları arasında 6 aylık bir periyotta üç sürgün olarak hasat edilmektedir. Doğu Karadeniz bölgesinde yetişen çaylar, ekolojik şartlar nedeniyle kış aylarında kar altında kalmaktadır. Bu doğal özellik dünyada Doğu Karadeniz kıyılarından başka hiçbir bölgede bulunmamaktadır. Coğrafi ve ekolojik şartlar gereği Doğu Karadeniz'deki topraklarda ve çay bitkisi üzerinde hiçbir suretle kimyasal ilaçla mücadele yapmaya gerek duyulmamaktadır. Kimyasal zirai mücadele ilacı kullanılmadığından bölgede üretilen siyah ve yeşil çaylarda pestisit kalıntısına da rastlanmamıştır. Bu durum ise ülkemizi sağlıklı siyah, yeşil ve organik çay üretimi için ideal ülke durumuna getirmektedir. Sadece bu özelliğinden dolayı Türk Çayı dünyanın en sağlıklı en doğal çayı olma özelliğini taşımaktadır.

Çaydan içimlik ürünler dışında katma değeri olan kimyasallarda elde edilmekte ve dünya piyasalarında bu kimyasallara artan bir talep vardır. Kateşin ve kafein gibi çay ekstraktları özellikle yiyecek-içecek endüstrisinde katkı maddesi olarak birçok alanda geniş kullanıma sahiptir. Çaydan fenoliklerin izolasyonları ve çeşitli yapı aydınlatma yöntemleriyle analizleri üzerine pek çok çalışma literatüre kazandırılmıştır. Bu çalışmalar bitkinin biyolojik aktiviteye sahip ikincil bileşenlerinin tayin edilmesi amacıyla yapıldığı gibi kemosistemik açıdan bitkinin incelenmesi için de önem arz etmektedir. Bugüne kadar yapılmış çalışmaların çoğu Çin ve Hindistan türleriyle ilgilidir. Türk çayı ile ilgili

sadece bir kaç çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların çoğu; çeşitli kalitede siyah çay türlerinin antioksidan aktivite, toplam fenol içeriği, vitaminler, mineraller, elementel içerikleri, teaflavin ve teanin içeriklerini konu almaktadır. Türkiye çay üretiminde dünyada beşinci sıradadır ve 2013 yılı rakamlarına göre 1,5 milyon ton çay üretilmiştir. Üretilen çayın büyük bir kısmı geleneksel içecek olan siyah çay için kullanılmakta olup yalnızca çok küçük bir kısmı yeşil çay olarak üretilmektedir. Bölgede üretilen çayların kateşin ve kafein içerikleri ile bunların etkin ekstraksiyonu için uzun vadeli izlenme ve analizlerine dair bilimsel veriler mevcut değildir.

Tez çalışması SAN-TEZ projeleri kapsamında Doğu Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen çaylardan önemli kimyasalların ayrılmasına odaklanmıştır. SAN-TEZ projelerinin temel unsuru bölge ekonomisine katkıda bulunabilecek bilimsel çalışmaları desteklemektir. Bu amaçla %75'i Sanayi Bakanlığı %25'i ise yararlanıcı firma tarafından oluşturulan bütçe doğrultusunda ekonomiye katkı sağlayacak yöntem veya üretme sistemleri oluşturulur. Bu projeler yeni yöntemlerin geliştirilmesine yönelik olabildiği gibi mevcut durumun belirlenmesi ve yeni stratejilerin oluşturulmasına yönelik de olabilir. Bu hedeften yola çıkarak bölgedeki özel çay fabrikalarının desteği ile 2011-2014 yılları arasında “Yeşil Çaydan Kateşinlerle Diğer Ürünlerin Makro Boyutta Üretimi” başlıklı 00932.STZ.2011-1 proje hayata geçirilmiştir. Bu çalışma 2013 ve 2014 yıllarında sürüm olarak adlandırılan iki toplama sezonunda yapılan örneklemelerle Doğu Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen yaş çay (yaş, kuru ve dondurulmuş) ve çay atıklarının çeşitli şartlarda ekstraksiyonundan kafein ve kateşinlerin elde edilmesini hedeflemektedir. Kateşin ve kafein elde etmeye yönelik etkin, ekonomik, kolay uygulanabilir ve çevreye duyarlı bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu anlamda ekstraksiyon süresini oldukça kısaltan mikrodalga ekstraksiyon (ME) geleneksel yöntemlere alternatif bir yöntem olarak kabul görmektedir. Tez kapsamında su, sitrik asit-su ve etanol-su olmak üzere üç farklı çözücü sistemi ile 600 W gücünde çalıştırılan kapalı bir mikrodalga ekstraksiyon sisteminde yaş çay, atık çay ve kafein tozu örneklerinden ekstraksiyon işlemi yapılarak etkin çözücü sisteminin belirlenmesi hedeflenmiştir. Etkin sistem yalnızca ekstrakt verimleri ile değil içerik analizleriyle daha net açıklanacaktır. Çalışmadan elde edilecek verilerle yıllar ve sürümler arasındaki farklar da değerlendirilebilir.

Mikrodalga ekstraksiyon sonrasında elde edilen ekstraktan toksik organik çözücü kullanmaksızın süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) ile ardışık olarak kafein ve kateşinlerin ekstraksiyonu da amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan tüm kimyasal malzemeler analitik saflıkta olup kullanım amaçları ve markaları Tablo 2.1' de verildi.

Tablo 2.1. Kullanılan kimyasallar, kullanım amaçları ve markaları

Kimyasal Adı	Kullanım Amacı	Marka
Etil asetat	Ekstraksiyon	Merck
Kloroform	Ekstraksiyon	Merck
Sitrik Asit	Ekstraksiyon	Sigma Aldrich
Etanol	Ekstraksiyon	Sigma Aldrich
Metanol	HPLC hareketli fazı	Merck
N,N Dimetilformamid	HPLC hareketli fazı	Merck
Asetik asit	HPLC hareketli fazı	Sigma Aldrich
MgSO ₄	Kurutucu	Sigma Aldrich
CO ₂	SFE Hareketli Fazı	Habaş
FeCl ₃	TLC Renklendirme	Ak-kim
Aseton	TLC Hareketli Fazı	Sigma Aldrich
n-Bütanol	TLC Hareketli Fazı	Sigma Aldrich
Poliamid Tabaka	TLC Sabit Fazı	Tzshsl,Taizhou,China
(-)Epigallokateşin (EGC)	HPLC Standardı	Sigma Aldrich
(-)Epigallokateşin gallat (EGCG)	HPLC Standardı	Sigma Aldrich
(-)Epikateşin (EC)	HPLC Standardı	Sigma Aldrich
(-)Kateşin	HPLC Standardı	Sigma Aldrich
(-)Kafein	HPLC Standardı	Sigma Aldrich
Gallik Asit	HPLC Standardı	Sigma Aldrich

2.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalar sırasında faydalanılan cihazlar, malzemeler ve markaları Tablo 2.2' de gösterildi.

Tablo 2.2. Kullanılan cihazlar, malzemeler ve markaları

Cihaz Adı	Marka
Hassas terazi	Ohaus PA 214C
Ultrasonik banyo	Elma D-78224
Evaporatör	Heidolph
Vakum Pompası	ILMVAC
0,40 µm filtre	Gelman Scienses
HPLC	Hitachi Elite
HPLC kolonu	Agilent C18, 150mm (4,6x5 µm)
HPLC enjektörü	Hitachi L-2200
HPLC pompası	Hitachi L-2130
HPLC kolon fırını	Hitachi L-2300
HPLC DAD dedektör	Hitachi L-2455
Vakum filtresi	0,2 milipore
Süperkritik akışkan ekstraktör	Applied Seperation
Süperkritik modifiyer pompa	Applied Seperation Series 1500
Süperkritik basınç pompası	Atlas Copco GX-4FF
Süperkritik Soğutucu	Applied Seperation Polyscience
Parçalayıcı	Waring Commercial Blender
Süzgeç Kağıdı	110 mm Sartorius Stedim
Mikrodalga	Milestone Start S Microwave

2.3. Çay Örnekleri

Çalışmada hem ekstraksiyon hem de izolasyon işlemleri için büyük boyutta kateşin ve kafein elde etmeye yönelik ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntemin geliştirilmesi için Theaceae familyasından camellia cinsinin yaş çay (*Camellia sinensis*) türü araştırıldı. Sadece yaş çay örnekleri değil aynı bölgede çay fabrikalarında üretim sırasında açığa çıkan çay atığı ve kafein tozu olarak adlandırılan atık materyallerde çalışıldı. Çalışmada kullanılan örneklerin görünümü Şekil 2.1’de verildi.



Yaş Çay



Çay Atığı



Kafein Tozu

Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan örnekler

2.4. Çay Örneklerinin Toplanması ve Tanımlanması

Çalışma materyali olarak kullanılan yaş çay örnekleri Sürçay San. Co. Ltd. (Sürmene, Trabzon) şirketi tarafından temin edildi. Tez kapsamında çalışılan *Camellia sinensis* bitkisinin lokalitesi, toplanma zamanı ve kısmı Tablo 1’de verildi.

Bu tez kapsamında hem çay toplama süreçleri hem de ekstraksiyon yöntemlerinde farklı yöntemler test edildiği için bir bütünlük olması amacıyla aynı çay bahçesinden toplanan örnekler kullanıldı. Bu amaçla tez çalışmasını SAN-TEZ projesi kapsamında destekleyen firmalardan olan SÜRÇAY (Sürmene, Trabzon) tesislerine ait bir çay bahçesi belirlendi. Aynı bölgeden yapılan örnekleme ile iklim, toprak, ve bitki farklılığından kaynaklanabilecek etkileri minimuma indirilmiş olunur. 2011-2014 yılları arasında yapılan örneklemelemlerle birçok çalışma yürütülmüş olmasına karşın bazı parametrelerin daha net karşılaştırılması ve sonuçların daha net değerlendirilmesi amacıyla 2013-2014 örneklerinden elde edilen veriler tez kapsamında değerlendirildi.

Bölüm 1.9’da ana hatları tartışılan çalışma amaçları doğrultusunda 2013-2014 yılı birinci, ikinci, üçüncü sürüm dönemlerinde örnekleme yapıldı. Bölge üreticileri iklim şartlarına bağlı olarak genellikle Mayıs (I. Sürüm), Haziran (II. Sürüm) ve Temmuz (III. Sürüm) aylarında çay hasatı yapmaktadırlar. Yaş çay çalışmalarında üreticinin çay üretmek için toplama yaptığı sistem uygulandı. Çay bitkisinin üst kısmından 2,5 yaprak içeren uç bölgeden örnekler alındı. Her toplama sezonunda toplanan örneklerin ekstraksiyonunda üç farklı örnek grubu oluşturuldu. Öncelikli olarak taze yaprak ve dallar hemen laboratuvara taşınarak yapılacak işlemler için gruplandırıldı. Enzimatik bozunmadan kaçınmak için taşıma sırasında koyu renkli poşetler kullanıldı. Bu tip örneklemelemlerde canlılığı korumak için sıvı azot tankında veya soğutma yapılarak taşımak uygundur. Ancak bu çalışma bir SAN-TEZ projesi kapsamında yürütüldüğü ve gerçek şartlarla uyumlu olmasına dikkat edildiği için özel koruma önlemleri alınmadı. Çay üreticisinin çayını toplayıp işlenmek

üzere fabrikaya getirmesi süreci çok kısa olmadığından kısmi enzimatik bozunma her zaman mevcuttur. Örnekleme sonrası taze çay yaprakları üç farklı yolla analize hazırlandı.

İlk grup çay örnekleri “taze” olarak adlandırıldı ve örnekler laboratuvara ulaştırıldıktan hemen sonra ekstraksiyon için işleme alındı. Bu örnekler önce blenderdan geçirildi ve hemen sonrasında seçilen ekstraksiyon işleme tabi tutuldu. İkinci grup “dondurulmuş” olarak tanımlandı. Bu grupta da taze örneğe uygulanan işlemler aynen tekrar edildi ve parçalanmış materyal uygun kaplara alınarak -20 °C’de ekstraksiyon işlemine kadar saklandı. Bu işlemin amacı Bölüm 1.3’de açıklandığı şekliyle büyük boyutlu analiz çalışmalarında kullanılarak materyalin taze-dondurulmuş olarak saklanmasıdır. Eğer çalışma sonuçları taze örneklerle çalışmanın daha verimli olacağını gösterirse ham bitkisel materyalin dondurularak saklanabilir olup olmadığını da gösterecektir.

Üçüncü grup ise “kurutulmuş” çay örneklerini içerdiğinden “kuru” olarak tanımlandı. Kurutma ile su içeriği uzaklaştırıldığından bu yolla daha yüksek verimler elde edilmesi beklenmektedir. Bu grupta çay örnekleri ışık almayan havadar bir ortamda kurutularak öğütme ekstraksiyon işlemlerine geçildi. Kurutma işlemi sonrası çay örnekleri yaklaşık 1/3 kütle kaybına uğramaktadır.

Yaş çayın taze, kuru ve dondurulmuş çay örneklerinin dışında aynı örnekleme periyotlarında siyah çay üretimi sırasında açığa çıkan atık ve kafein tozlarında örneklendi. Siyah çay atığı, çayın işlenmesi sırasında eleklerden ayrılan ve hiçbir ekonomik değeri olmayan kalıntıdır. Çoğunlukla çay bahçelerine atılmakta veya çay fabrikalarında ısıtma için yakılmaktadır. Kafein tozu çay fabrikalarında siyah çay üretimi sırasında oluşan küçük çay tozlarıdır. Bölge halkı tarafından “kafein tozu” olarak adlandırılır. Fabrikada hiçbir şekilde değerlendirilmeyen bu atığın başka bir kullanım alanı da bulunmamaktadır. Tez kapsamında 2013-2014 yıllarında tüm toplama sezonlarında siyah çay atığı ve kafein tozu örnekleme yapıldıktan sonra ekstraksiyona tabi tutuldu.

2.5. Kafein ve Katesinlerin İzolasyonu İçin Kullanılan Ekstraksiyon Yöntemleri

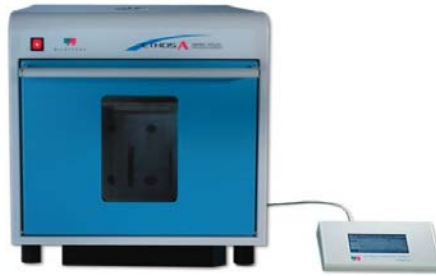
Tez çalışmasında ayrıntıları Bölüm 1.5’de tartışılan mikrodalga ekstraksiyonu kullanıldı. 2013 ve 2014 örnekleme yapılarak tüm örneklerin ME ile farklı çözücüler içindeki ekstraksiyon verimleri, ekstrakt içerikleri analiz edilerek en iyi verimleri sağlayan çözücü sistemin belirlenmesi hedeflendi.

Mikrodalga ekstraksiyonu, çay örneklerinden kafein ve kateşinlerin birlikte ekstraksiyonu için uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntem ile daha kısa süreçlerde ekstraksiyon yapılabilir. ME sonrasında sulu ekstraktın içerdiği kafein ve kateşinleri ayırmak için geleneksel yöntemlere benzer kloroform ve etil asetat ekstraksiyonları yapılması gerekir. Oysaki ME ile kısa süreçlerde sulu faza alınan bileşenlerin SFE ile seçimli olarak birbirinden ayrılması yeni bir strateji olabilir. Sulu ekstraktın liyofilizasyonla (dondurarak kurutulması) sonrası optimize edilmiş CO₂-SFE sistemiyle de kateşinlerin ayrılması amaçlandı. Uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinin detayları aşağıdadır.

2.5.1. Mikrodalga Ekstraksiyonu

Çay örneklerinin mikrodalga yöntemiyle ekstraksiyonunda mikrodalga gücü ve süresine yönelik pekçok ön çalışma yapıldı. Bu ön çalışmalarda literatürde verilen parametreler veya bu parametrelerin birleştirilmesinden oluşan modifiye şartlar kullanıldı.

Farklı yıllarda ve sürümlerde alınan yaş çay (kuru, yaş, dondurulmuş), kafein tozu, atık çay örnekleri 90 dakikalık bir ön çalkalama işlemi sonrasında 4 dakikalık bir süreçte 600 W mikrodalga gücünde, 80 °C sıcaklıkta ekstre edildi. Mikrodalga işleminde kapalı sistem ekstraksiyon kabı kullanıldı (MİLESTONE START S Microwave). Kullanılan cihazın görünümü Şekil 2.2' de verildi.



Şekil 2.2. Mikrodalga ekstraksiyon cihazının görünümü

Belirtilen çalışma şartlarında üç farklı çözücü ortamında ekstraksiyon yapıldı.

- 1) Su ile ekstraksiyon: 10 g örnek (kuru, yaş, dondurulmuş, kafein tozu, atık) 200 mL suda oda sıcaklığında 90 dk çalkalayıcıda çalkalandı. Daha sonra mikrodalga cihazının balonuna alındı (Pan vd., 2003). 600 W mikrodalga güç, 80 °C sıcaklık da 4 dakika süre ile ekstre edildi (Nkhili vd., 2009).

- 2) Sitrik asit-su ile ekstraksiyon: 10 örnek (kuru, yaş, dondurulmuş, , kafein tozu, atık) 200 mL 0,1 M sitrik asit-su (1:1 v/v) çözeltisi içinde 90 dk çalkalayıcıda çalkalandı ve aynı şartlarda belirlenen koşullarda mikrodalga ekstraksiyonu yapıldı.
- 3) Etil alkol-su ile ekstraksiyon: 10 g örnek (kuru, yaş, dondurulmuş, kafein tozu, atık), 200 mL etil alkol-su (1:1 v/v) çözeltisi içinde oda sıcaklığında 90 dk çalkalayıcıda çalkalandı ve aynı şartlarda mikrodalga ekstraksiyonu yapıldı.

Kafein ve diğer safsızlıkları ayırmak amacıyla 50 mL'lik kloroform ile üç kez ekstrakte edildi ve kloroform fazları birleştirildi. Evaporatör yardımıyla kloroform uçurularak elde edilen ekstraktın kütlesi tartıldı. Bu verilerden yararlanılarak % kafein verimleri hesaplandı. Su fazı daha sonra etil asetat (1:1 v/v) ile yeniden ekstre edildi. Etil asetat fazına taşınan kateşinleri elde etmek için önce $MgSO_4$ kullanılarak etil asetat fazı kurutuldu sonra kuruluğa kadar evapore edildi, kateşin ekstraktının kütlesi ölçüldü ve % kateşin ekstrakt verimleri hesaplandı. Karışımdaki herbir kateşinin nitel ve nicel analizi için HPLC kromatografik analizler yapıldı. Kafein içeren ekstraktında kromatografik analizleri yapılarak saflığı kontrol edildi.

2.5.2. Mikrodalga Ekstraksiyon Sonrası Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

2.5.2.1. SFE Optimizasyonu

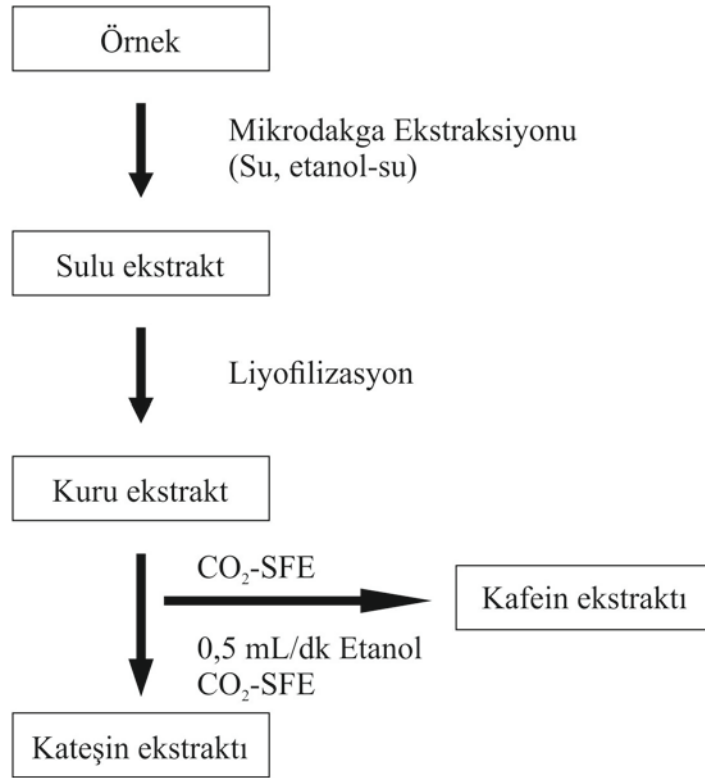
Mikrodalga ekstraksiyonuyla çay örneklerinden ayrılan ekstraktların çözücülerini liyofilizatörde tamamen uzaklaştırıldı. Bu kafein ve kateşinlerin bir karışımı olan bu kaba ekstraktlardan SFE ile kafein ve kateşinlerin ayrılması hedeflendi. Bu amaçla önce SFE için optimizasyon çalışması yapıldı daha sonra optimize edilen yöntem karışım ekstraktına uygulandı.

Çay örneklerinden SFE ile ekstraksiyonu konusunda yapılan literatür araştırmaları sonucunda yeşil çaydan kafeinin uzaklaştırılması için (kafeinsiz çay üretmek amaçlı) bir çok çalışma (İçen ve Gürü, 2010; Sun vd., 2010; Park vd., 2011; Huang vd., 2007; Kim vd., 2007) bulunmasına rağmen yalnızca kateşin eldesi için herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bütün çalışmalar ya yalnızca kafeini uzaklaştırmaya ya da kafeinle birlikte genellikle EGCG izolasyonuna yöneliktir. Kafeini ortamdan uzaklaştırdıktan sonra, kateşin karışımının izolasyonuna yönelik herhangi bir çalışma

yapılmamıştır. Bundan yola çıkılarak SFE için parametreler değiştirilerek yeni bir optimize yöntem oluşturuldu. Öncelikle yalnızca kafeinin ayrılması için CO₂ süperkritik akışkanıyla ekstraksiyon süreleri 1, 2, 3, 5 saatlik süreçlerde; 100, 200, 250, 300 bar basınçlarda; 30, 40, 50, 60 °C sıcaklıklarda ve CO₂ akış hızı 10 g CO₂/dk (İçen ve Gürü 2010) olacak şekilde ekstraksiyon işlemleri yapıldı. Daha sonra örnek kabından çay örnekleri çıkartılmadan kateşin izolasyonu için ortama polariteyi artırmak amacıyla ilave çözücü (yardımcı çözücü) olarak etanolün (Park vd., 2007) ilave edildiği bir ekstraksiyon işlemi uygulandı. Ekstraksiyon süreleri 1, 2, 3, 5 saat; basınçlar 100, 200, 250, 300 bar; sıcaklıklar 30, 40, 50, 60 °C; modifiyer etanol hacimleri 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mL/dk ve CO₂ akış hızı 10 g CO₂/dk olacak şekilde ekstraksiyon işlemleri yapıldı. Bütün optimizasyon çalışmaları da 10 g çay örneği kullanıldı. Kafein ve kateşin ekstraktlarının verimleri hesaplandı. Bu değişkenlerle kafein ve kateşin ekstraksiyonunun optimizasyonu aynı çalışma grubunda ve aynı SAN-TEZ projesinde yer alan doktora öğrencisi Ezgi Demir tarafından gerçekleştirildi (Demir, 2015). Elde edilen veriler tezin paralelinde hazırlanan doktora tezinde verilmektedir. Ayrıca ekstraksiyonun başarısını test etmek amacıyla her uygulama sonrası elde edilen ekstraktların HPLC analizleri yapıldı. Optimize edilen yöntem ile 2014 yılı örneklerinin analizleri gerçekleştirildi. Aynı işlemler tüm örnekler için üç kez tekrar edildi.

2.5.2.2. SFE ile Kafein ve Kateşinlerin Ayrılması

Hedeflenen yöntemin şematik gösterimi Şekil 2.3' de verildi.



Şekil 2.3. SFE’de izlenen ekstraksiyon basamakları

Mikrodalga ekstraksiyon uygulanarak elde edilen karışım halindeki ekstraktlar liyofilizatörde tamamen kurutulularak SFE sistemine alındı. SFE için optimize edilen 250 bar, 60 °C ve saatlik süreçte 0,5 mL/dk etanol modifiyerli CO₂-SFE ekstraksiyonu uygulanarak kateşinlerin ayrılması sağlandı. İşlem tüm örnekler için ayrı ayrı uygulanarak elde edilen kafein ve kateşinlerin verimleri hesaplandı. HPLC analizleriyle ayrılan türlerin içerik analizleri yapıldı.

2.6. Kromatografik Analizler

ME ve SFE sonrası elde edilen ürünler nitel analizleri için ince tabaka kromatografisi (TLC) ve nicel analizler için de HPLC yöntemleriyle analiz edildi.

2.6.1. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Analizleri

2013 yılının Mayıs, Temmuz, Ağustos aylarında toplanan örneklerin Bölüm 2.5.1’de verilen yöntemlerle ekstre edilen kateşin ekstraktlarının TLC analizleri yapıldı. Bu analizler sadece nitel veriler sağlamıştır. Elde edilen ekstraktların ve kateşin standartlarının

metanol çözücüsünde 1mg/mL derişiminde çözeltileri hazırlandı. Örnek çözeltileri ve standartlar (C, EC, EGCG, EGC) poliamid TLC tabakalarına uygulandı ve n-butanol-aseton-su 5:5:3 (h/h) hareketli fazında yürütüldü. Yürütme işlemleri tamamlandıktan sonra %5 (a/h)'lik FeCl₃ çözeltisi tabakalara püskürtüldü (Wang vd., 2009). Bir süre kuruması beklendi ve mor-siyah renkli bileşenler belirlendi.

2.6.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC) Analizleri

HPLC analizleri Shim-pack VP-ODS C18 kolon (5 mm, 4,6 x 250 mm, 35 °C) ile donanımlı Hitachi Elite Lachrom sisteminde yapıldı. Hareketli faz olarak; su(A) ve 20:1:0.5 DMF-metanol-asetik asit çözeltisinin (B) kullanıldığı gradiyent ayırma uygulandı. Enjeksiyon hacmi 20 µL ve kolon sıcaklığı 30 °C'ye ayarlandı. Akış hızı 1 mL/dk, dedektör 278 nm olmak üzere çalıştırıldı. B Çözücüsü 13 dakikada %14'ten %23'e sonraki 12 dakika boyunca da %23'ten %36'ya artırıldı ve 3 dakikada bu yüzdede kolondan geçirildi. Son olarak tekrar %14'e düşürüldü. Akış hızı analiz boyunca 1 mL/dk (Wang vd., 2011) olarak ayarlandı.

C, EC, EGC, EGCG ve GA standart olarak kullanıldı. Kateşin standartları şu şekilde oluşturuldu. Her standarttan 1 mg/mL'lik stok çözeltiler HPLC saflıktaki metanol içinde hazırlandı ve kullanılacak derişim için yine HPLC saflıktaki metanol ile seyreltmeler yapıldı. Analiz edilecek kateşin ve kafein ekstraktlarının 1 mg/mL'lik stok çözeltileri de HPLC saflıktaki metanol içinde hazırlandı. Standartlar ve örnekler 0,45 µL'lik membran filtrelerden süzülerek 500 µL'lik kısımlar viallere alındı. Otomatik örnekleme sistemi kullanılarak 20 µL'lik hacimlerde kolona verildi. Bileşenlerin nicel değerlendirmesinde her bir bileşenin bilinen derişimlerinde hazırlanan standart karışımı kullanıldı. Aynı şartlarda koşutlanan örnek ve standartların pik alanlarının integrasyonu ile miktar analizi yapıldı. Bu cihazın diyot serili bir dedektörü (DAD) bulunduğundan standartların UV spektrumlarını örnekteki bileşenlerle karşılaştırma olanağı vardır. Bazı analizlerde bu spektrumlardan da yararlanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Mikrodalga Ekstraksiyon

3.1.1. 2013 Yılı Bulguları

2013 yılının Mayıs (I.sürüm), Haziran (II.sürüm), Ağustos (III.sürüm) aylarında toplanan 10 g yaş çay örnekleri, çay atığı, kafein tozu, Bölüm 2.5.1'de belirtilen mikrodalga ekstraksiyon yöntemine göre ekstre edildi. Örneklerden elde edilen ekstrakt verimleri, ekstraktların kromatografik analiz bulguları ve içerik hesaplamaları ayrı ayrı tartışıldı.

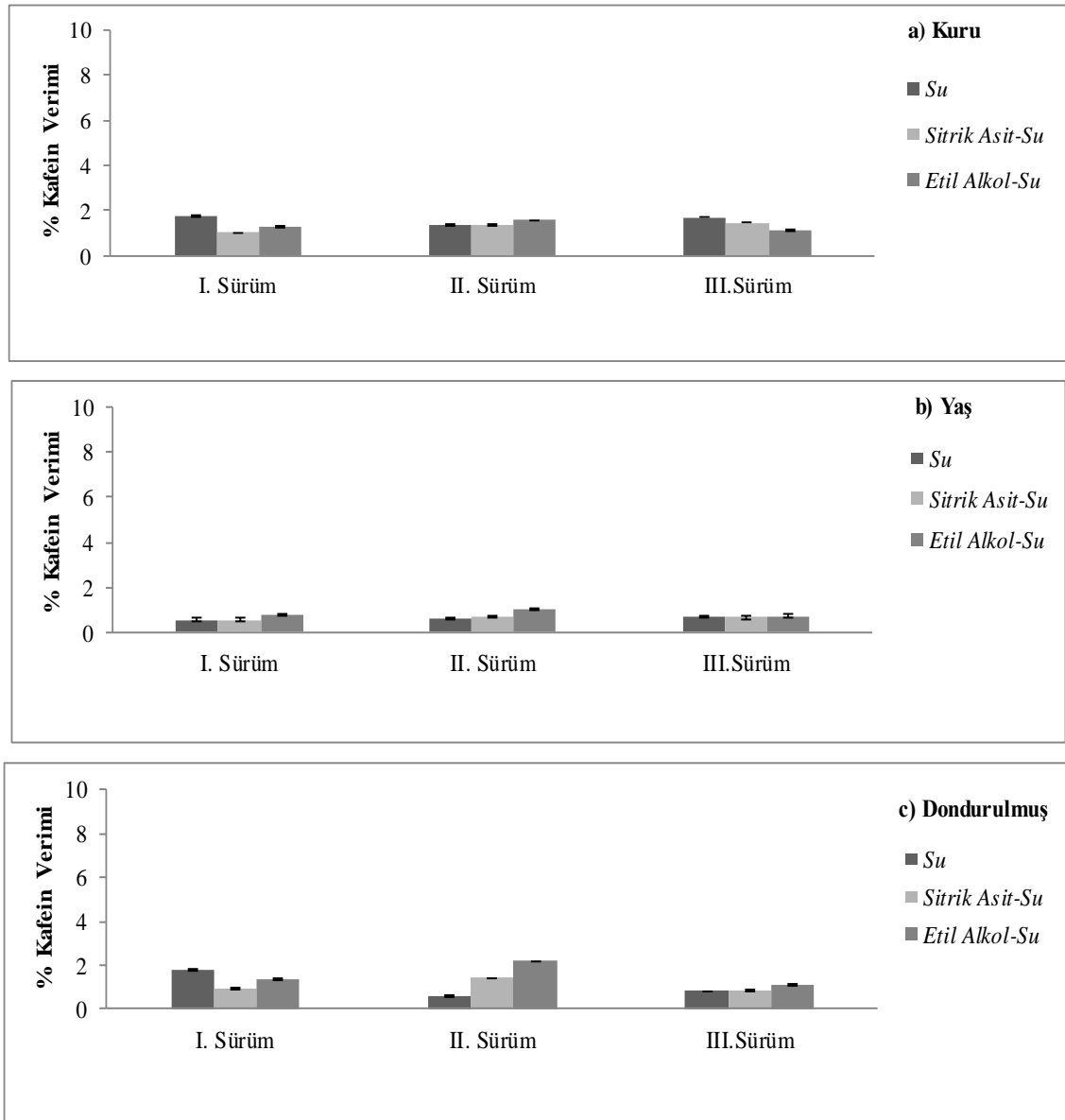
3.1.1.1. Ekstrakt Verimleri

Ekstraksiyon işlemi su, sitrik asit-su ve etanol-su çözücülerinde gerçekleştirildi. Aynı kütleli örnekler ilgili çalışmalarda önerilen şartlar altında ekstre edilerek kloroform ekstraksiyonu ile kafein ayrıldı ve organik çözücü uçuruldu ekstraktın kütlesi belirlendi. Benzer bir yaklaşımla kafeini ayrılan sulu ekstrakt etil asetatla tekrar ekstre edilerek organik çözücü uçuruldu ve ekstraktın kütlesi belirlendi. Ekstrakt kütleleri kullanılarak çay örneğinden elde edilen ekstrakt verimleri aşağıdaki eşitliklerden hesaplandı ve sonuçlar bu şekilde ifade edildi.

% Kafein verimi (a/a)= Kloroform ekstrakt kütlesi x100/örnek kütlesi

% Kateşin verimi (a/a)= Etil asetat ekstrakt kütlesi x100/örnek kütlesi

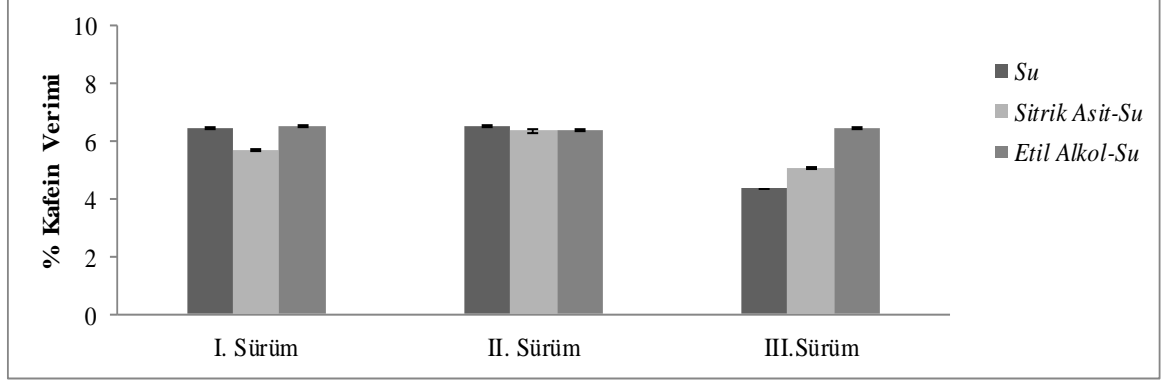
Kloroform ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kafein ekstraktının kütlesinden ekstrakt verimleri % olarak hesaplandı ve Şekil 3.1-3.3' de verildi.



Şekil 3.1. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların farklı çözücülerdeki % kafein verimleri

Yaş, kuru, dondurulmuş yaş çayların farklı çözücülerde ekstraksiyon sonucu elde edilen kloroform fazındaki ekstraktların kafein değerleri %0,54-2,18 aralığında değişmektedir. Örneğin taze olarak ekstraksiyona tabi tutulması düşük kafein verimleri sağladı. Kuru ya da dondurarak saklanan örneklerde kütlece daha yüksek verimli kafein ekstraktı elde edildi. Çözücü yönünden değerlendirildiğinde etil alkol-su çözücüsünün kullanımı bazı durumlarda daha yüksek kafein verimlerine neden olmaktadır. Etil alkol-su % kafein miktarları yaş ve dondurulmuş yaş çay örneklerinde yüksek iken birinci ve ikinci sürümün kuru çay örnekleri sadece su ile ekstre edildiğinde % kafein miktarları diğer

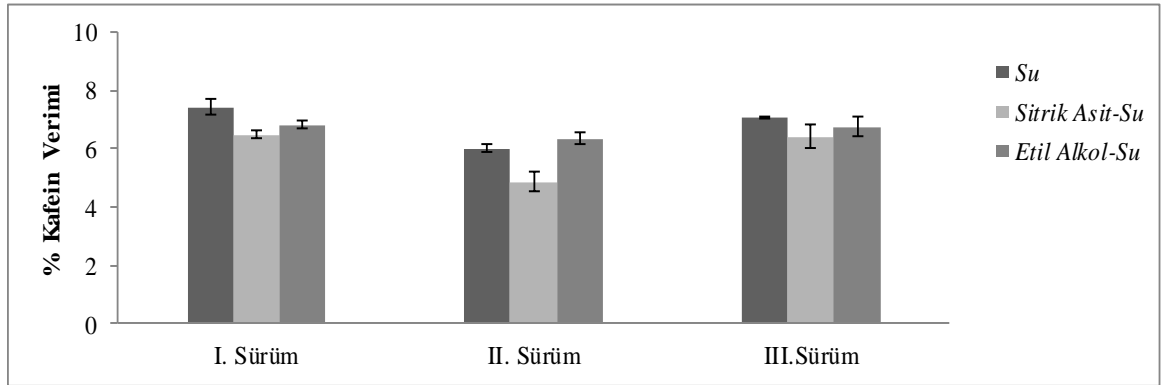
çözücülere göre daha yüksek bulunmuştur. Çay atıklarının aynı yöntemle ekstraksiyonundan elde edilen veriler Şekil 3.2’de görülmektedir.



Şekil 3.2. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm çay atıklarının farklı çözücülerdeki % kafein verimleri

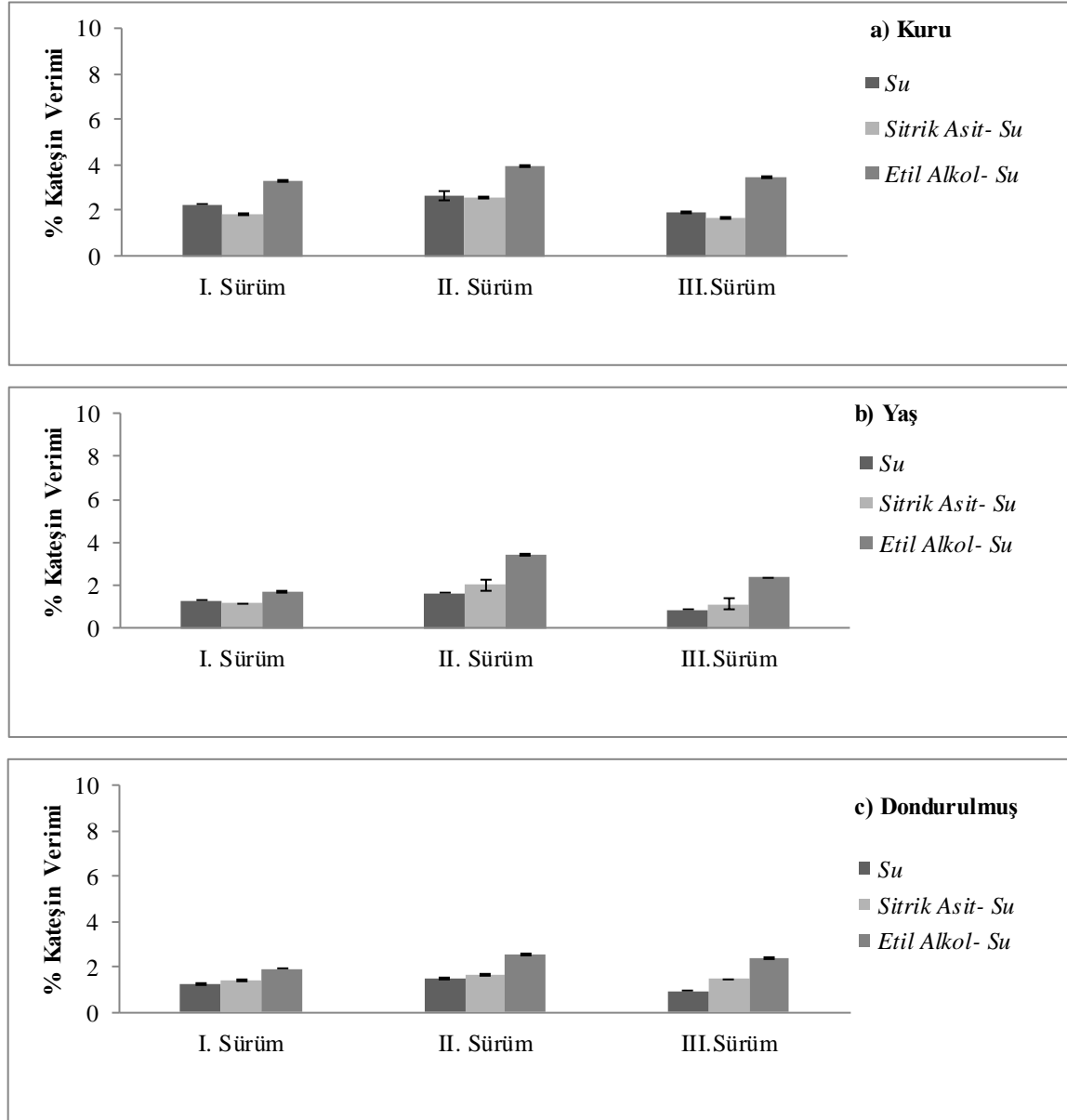
Bu örneklerde elde edilen kafein ekstraktının kütleleri yaş çaya göre önemli oranda yüksek bulundu. Birinci ve ikinci sürüm örneklerinde de benzer kafein verimleri elde edildi. Birinci ve üçüncü sürüm atıkların etil alkol-su çözültisindeki kafein verimleri sırasıyla %6,51 ve %6,46 iken birinci sürüm atığının etil alkol-su çözücüsündeki kafein verimi önemli derecede yüksek bulundu.

Benzer şekilde her üç sürüm döneminde fabrikada işlenen çaylardan elde edilen kafein tozu örneklerinde de önemli oranda kafein elde edildi (Şekil 3.3). Kafein içeriği birinci sürüm örneklerinde daha yüksek görünmekle beraber en yüksek kafein verimi birinci sürümün su çözücüsünde bulundu.



Şekil 3.3. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kafein tozlarının farklı çözücülerdeki % kafein verimleri

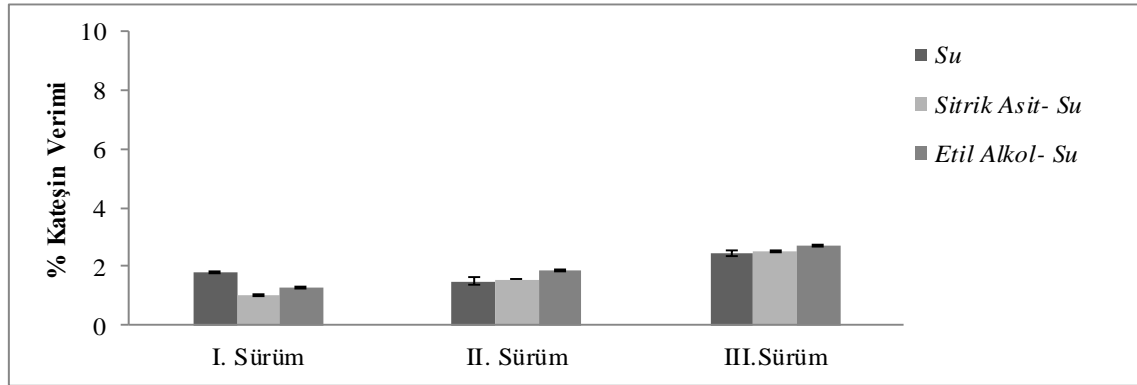
Üç farklı sürüm ve üç farklı çözücü için elde edilen kateşin ekstrakt verimleri hesaplanarak Şekil 3.4-3.6’da verildi.



Şekil 3.4. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların farklı çözücülerdeki % kateşin verimleri

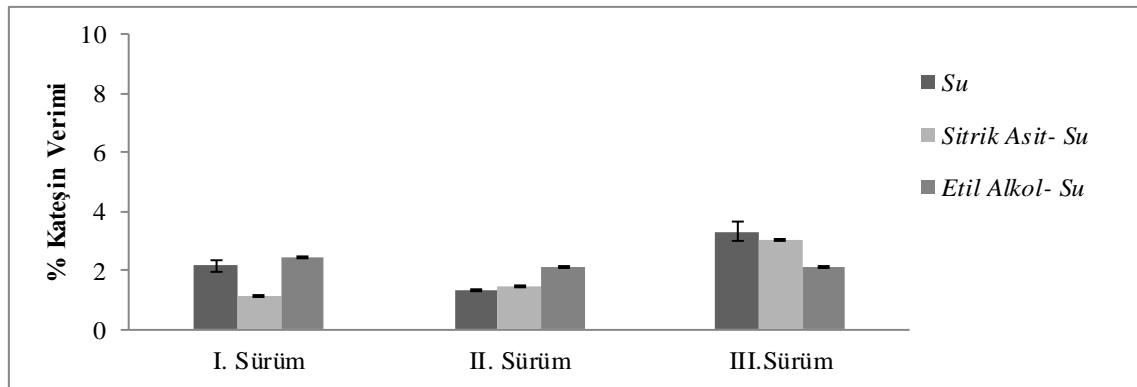
Her üç sürümün farklı çözücülerdeki etil asetat fazlarının kateşin miktarları yaş için %1,13-3,3 kuru için %1,47-3,96 ve dondurulmuş örnekler için %0,84-3,47 aralığında değişmektedir. Sürümler arasında kateşin verimlerinde net bir farklılık gözlemlendi. Özellikle ikinci sürüm örneklerinden hemen hemen tüm çözücülerle daha yüksek miktarda kateşin ekstraktı elde edildi. Etil alkol-su çözücüsünün kateşin ekstraktı verimlerini ciddi

ölçüde artırdığı açıktır. Su ve sitrik asit-su çözücülerini benzer ekstraksiyon verimleri sağladı. Diğer taraftan yaş çayın taze, kuru veya dondurulmuş olarak ekstraksiyonunda yine kurutulmuş örneklerinin üstünlüğü mevcuttur. Çay atıklarından elde edilen kateşin verimleri Şekil 3.5’de verilmiştir.



Şekil 3.5. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm çay atıklarının % kateşin miktarları

Şekilden de görüleceği üzere atıklar %1,10-2,69 aralığında kateşin içermektedir. Özellikle üçüncü sürüm örnekleri daha yüksek kateşin içermektedir. En yüksek kateşin üçüncü sürümün etil alkol- su çözeltilisinde (%2,69) elde edildi. Kafein tozundan elde edilen kateşin verimleri Şekil 3.6’da verilmiştir.



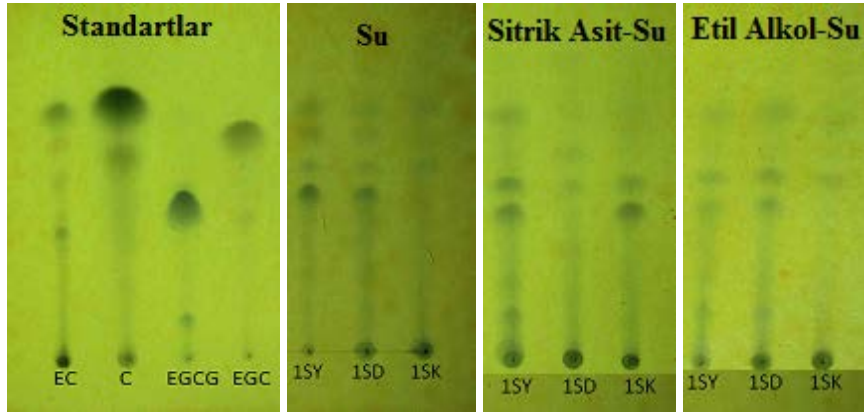
Şekil 3.6. 2013 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kafein tozlarındaki % kateşin miktarları

Kafein tozundan da önemli oranda kateşin ekstraktı elde edildi. Üçüncü sürüm örneklerinin daha yüksek kateşin verimi sağladığı, çözücü türünün genel bir farklılığa neden olmadığı söylenebilir. Örneğin birinci ve ikinci sürüm örneklerinde etil alkol-su en

yüksek verimleri sağlarken (sırasıyla %2,43 ve %2,12) üçüncü sürümde su ile %3,31 kateşin elde edildi.

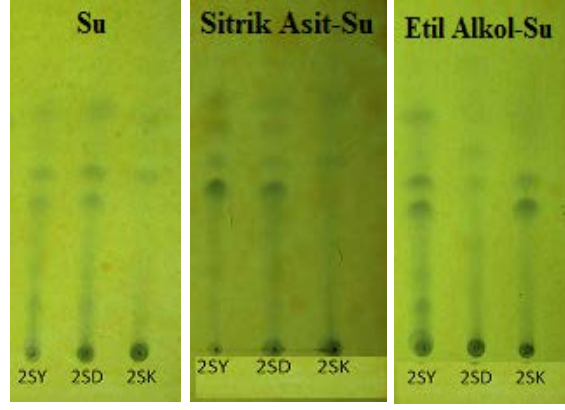
3.1.1.2. TLC Analizleri

Mikrodalga ekstaksiyonundan elde edilen kateşin ekstraktlarının metanol çözücüsünde 1 mg/mL derişiminde çözeltileri hazırlandı. Aynı derişimli C, EC, EGCG ve EGC standartlarının her biri poliamid tabakalarına uygulandı ve n-butanol-aseton-asetik asit 5:5:3 (h/h) mobil fazında yürütüldü. Yürütme işlemleri tamamlandıktan sonra %5(a/h)'lik FeCl₃ çözeltisi tabakalara püskürtüldü. Yaş çay örnekleri, siyah çay atıkları ve kafein tozlarının çözeltileri ile standartların ince tabaka kromatogramları aşağıdaki şekillerde görülmektedir. Boyama yapılan standartlar ve 2013 yılı birinci sürüm yaş çay örneklerinin TLC kromatogramları Şekil 3.7-3.9'da görülmektedir. Örnek olması açısından sadece 2013 örneklerinin kromatogramları verilmiştir. Benzer şekilde 2013 yılı siyah çay atığı ve kafein tozunun kateşin ekstraktlarına ait TLC kromatogramları sırasıyla Şekil 3.10 ve 3.11'de verildi.

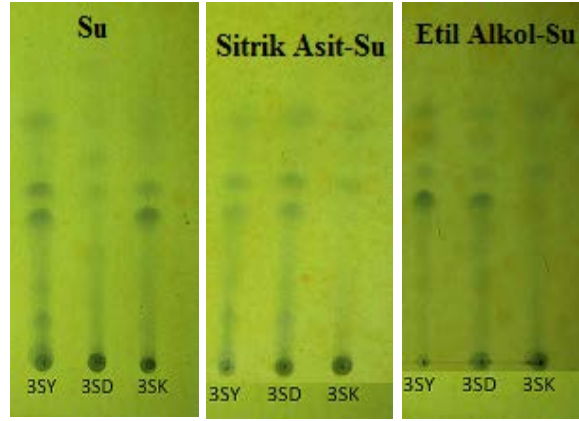


Şekil 3.7. Kateşin standartlarının ve 2013 yılı birinci sürüm yaş çayın, su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının TLC analizleri (1SY: Birinci sürüm yaş, 1SK: Birinci sürüm kuru, 1SD: Birinci sürüm dondurulmuş)

İkinci sürüm yaş çay örneklerinin TLC kromatogramları Şekil 3.14'de, üçüncü sürüm örneklerinin TLC kromatogramları ise Şekil 3.16'da görülmektedir.

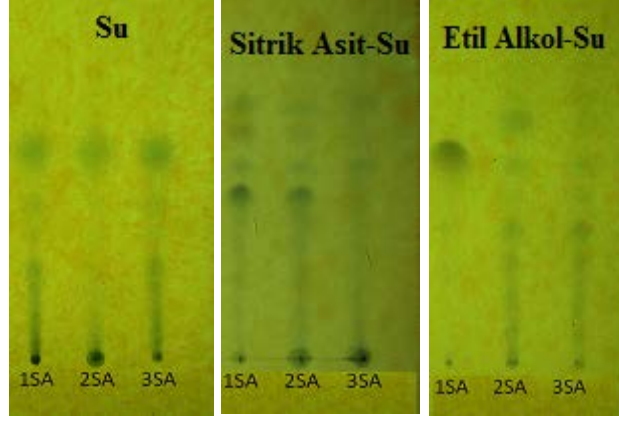


Şekil 3.8. 2013 Yılı ikinci sürüm yaş çay örneklerinin, su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının TLC analizleri (2SY: İkinci sürüm yaş, 2SK: İkinci sürüm kuru, 2SD: İkinci sürüm dondurulmuş)

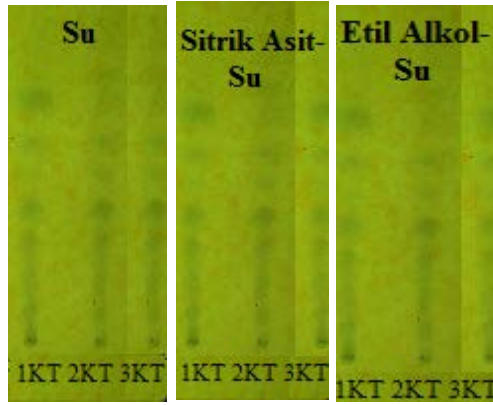


Şekil 3.9. 2013 Yılı üçüncü sürüm yaş çay örneklerinin, su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının TLC analizleri (3SY: Üçüncü sürüm yaş, 3SK: Üçüncü sürüm kuru, 3SD: Üçüncü sürüm dondurulmuş)

Çay atığının TLC kromatogramları Şekil 3.10'da, kafein tozu örneklerinin ki TLC kromatogramları ise Şekil 3.11'de görülmektedir.



Şekil 3.10. 2013 Yılı birinci, ikinci, üçüncü sürüm siyah çay atıklarının su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının TLC analizleri (1SA: Birinci sürüm atık, 2SA: İkinci sürüm atık, 3SA: Üçüncü sürüm atık)

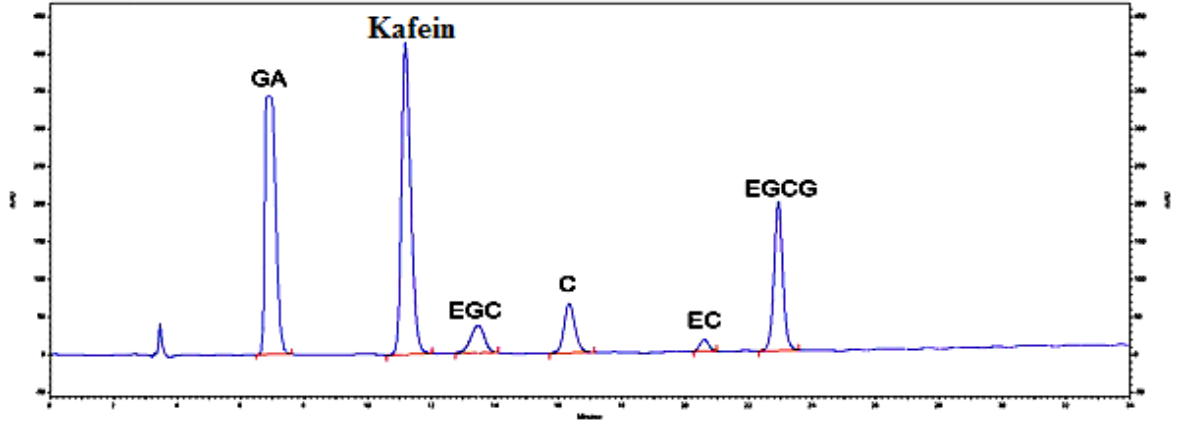


Şekil 3.11. 2013 yılı birinci, ikinci, üçüncü sürüm kafein tozlarının, su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının TLC analizleri (1SKT: Birinci sürüm kafein tozu 2SKT: İkinci sürüm kafein tozu 3SKT: Üçüncü sürüm kafein tozu)

3.1.1.3. HPLC Yönteminin Validasyonu

Ekstraktların içerik analizlerini yapmak amacıyla HPLC analizleri gerçekleştirildi. Öncelikle standartlar kullanılarak HPLC yöntemi hassasiyet ve güçlülük açısından değerlendirildi. Alıkonma zamanı ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği için hazırlanan standart karışımı 7 kez analiz edildi. Üç sürümün yaş çayları, atıkları ve kafein tozlarının farklı çözücüler ile mikrodalga ekstraksiyonu sonucu elde edilen özütlerin bileşenlerini belirlemek amacıyla HPLC cihazının dedektörü 278 nm'de çalıştırılarak kromotogramlar

elde edildi. Kafein ve kateşin standartlarının ve örneklerin, su (A) ve DMF-metanol-asetik asit çözeltisi 20:1:0,5 (B) ile gradiyentli elüsyonuyla nitel ve nicel analizleri yapıldı. Aynı dalga boyunda ölçülen standart karışımının HPLC kromatogramı Şekil 3.12’de görülmektedir.



Şekil 3.12. Standartların HPLC kromatogramı ($\lambda=278$ nm) GA:Gallik asit, EGC:Epigallokateşin, C:Kateşin, EC:Epikateşin, EGCG:Epigallokateşingallat

Ayrıca analitin mevcut olup olmadığını belirlemek için gerekli en küçük miktar olan ölçülebilirlik sınırı (ÖS) ve güvenilir kantitatif analiz yapabilmek için gerekli en küçük miktar olan belirlenebilirlik sınırı (BS) değerleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Optimize edilen HPLC yönteminin parametreleri

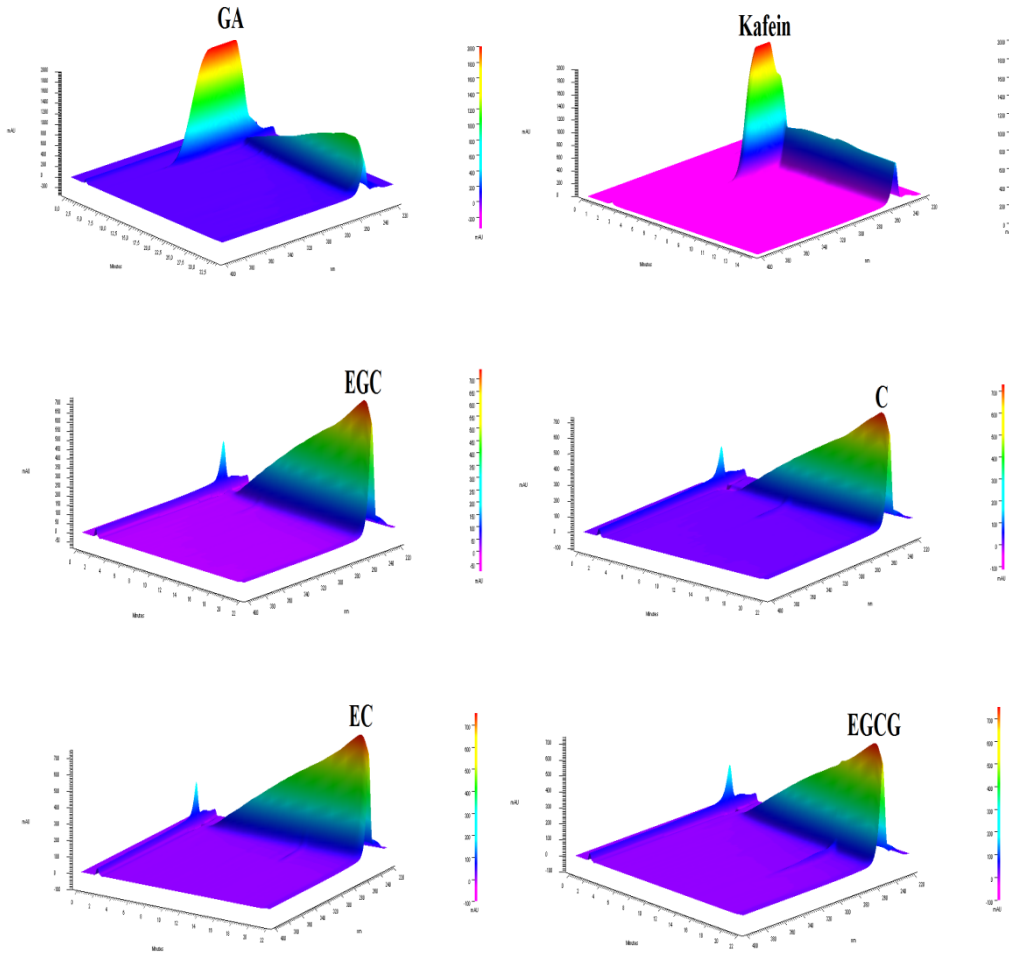
No	Alıkonma Zamanı (t_R) (dk)	Standart	R^2	%BSS (t_R)	%BSS (Alan)	BS (LOD)*	ÖS (LOQ)*
1	7,12	Gallik Asit	0,99	0,32	2,37	0,04	0,12
2	11,33	Kafein	0,99	0,09	1,92	0,03	0,11
3	13,56	EGC	0,99	0,08	2,47	0,04	0,13
4	16,27	C	0,99	0,11	2,12	0,02	0,08
5	20,89	EC	0,99	0,07	5,22	0,03	0,10
6	23,10	EGCG	0,99	0,07	1,68	0,03	0,10

*mg/L

Tablo 3.1’de analit derişimine karşı elde edilen absorbans değerlerinin doğrusallığı R^2 olarak değerlendirildi. Yüzde bağıl standart sapmalar (%BSS) alıkonma zamanları ve

pik alanları için hesaplandı. Belirleme sınırı ve ölçme sınırı değerleri mg/L olarak hesaplandı.

Nitel analizler HPLC sisteminde mevcut olan DAD dedektörü verileri kullanılarak da yapıldı. Mevcut standartların 200-400 nm dalgaboyu aralığında ölçülen DAD spektrumları Şekil 3.13’de verildi.



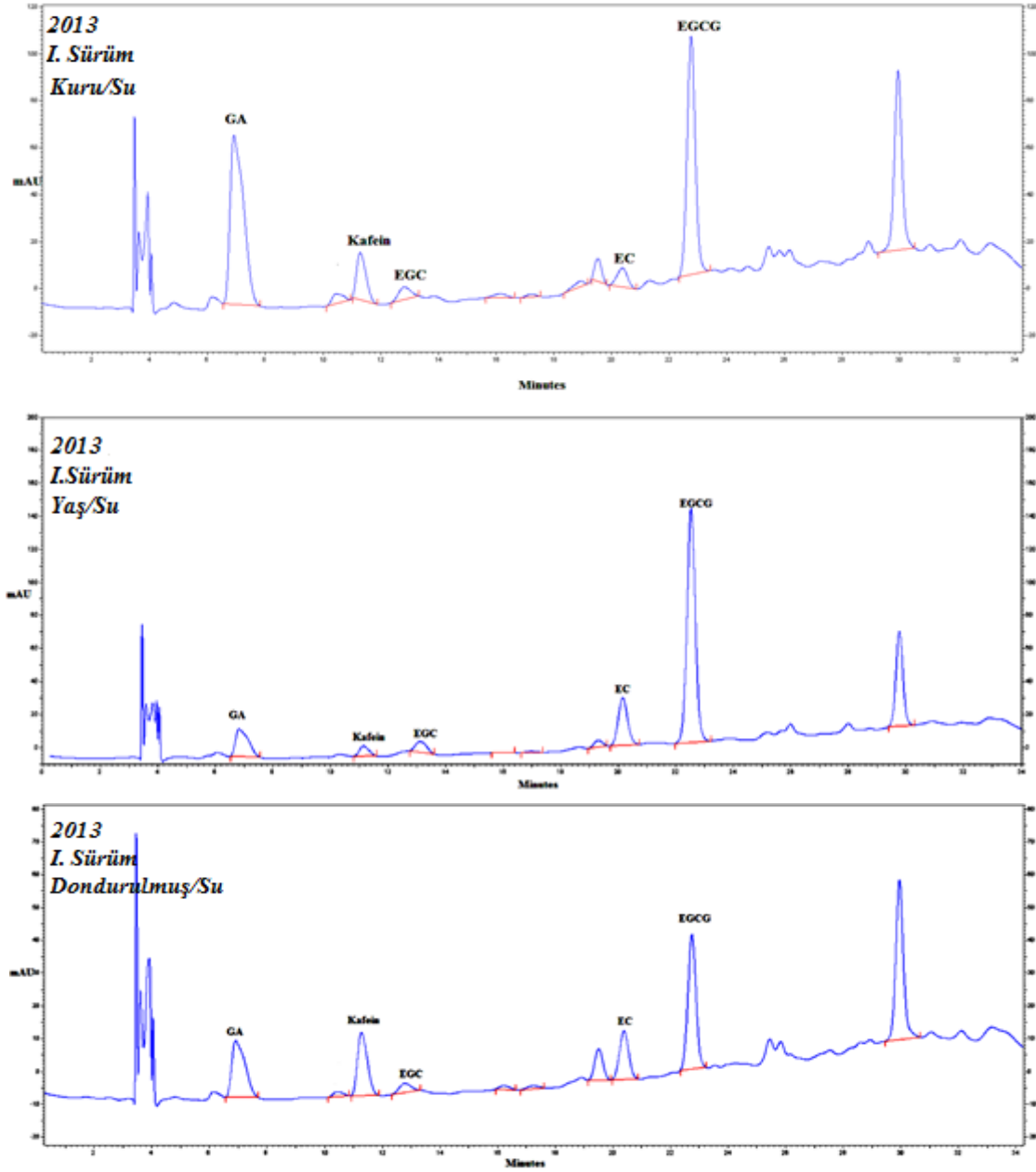
Şekil 3.13. GA, Kafein, EGC, C, EC ve EGCG standartlarının DAD spektrumları

Kateşin ekstraktlarının nitel analizleri DAD spektrumlarından yararlanılarak yapıldı.

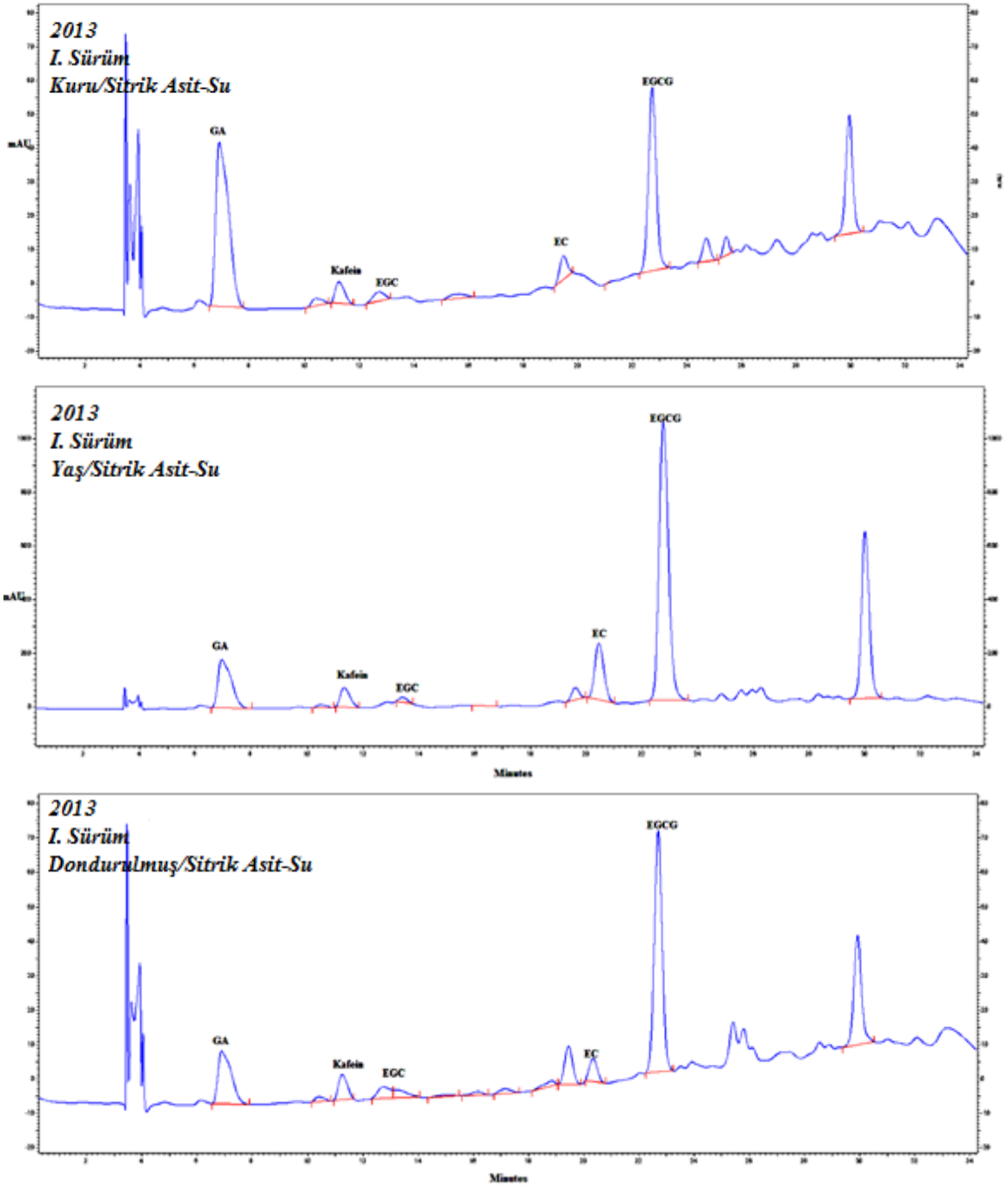
3.1.1.4. 2013 Yılı Örneklerinin HPLC Kromatogramları

2013 Yılı örneklemelerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının kütlelerinden hesaplanan %verim değerleri Bölüm 3.1.1.1’de verilmiştir. Ekstrakt kütleleri üzerinden ekstraksiyon etkinliği tanımlanabilir. Ancak uygulanan yöntem ve çözücü sisteminin

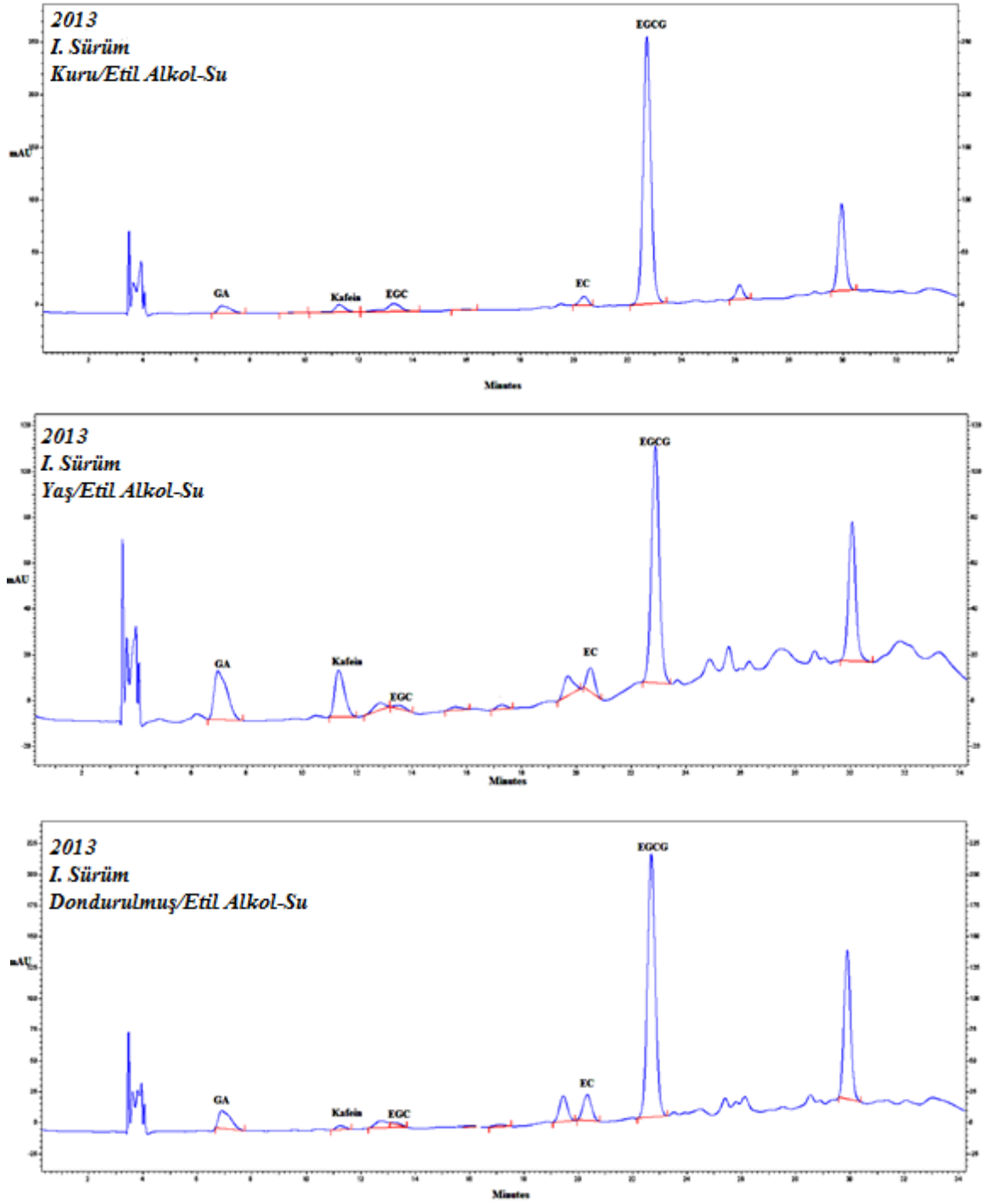
gerçekten ne kadar etkin olduğu ekstrakt içindeki kateşin türlerinin derişimlerine bağlıdır. Bu amaçla çözücü sistemlerinin etkinliği, örnek tipinine uygunluğu ve sürümler arasındaki farkları daha net değerlendirmek amacıyla ekstraktların kateşin içerikleri HPLC analizleriyle belirlendi. Bu örneklerin analizlerinde elde edilen HPLC kromatogramları birinci sürüm için Şekil 3.14-3.18’de, ikinci sürüm için Şekil 3.19-3.23 ve üçüncü sürüm için Şekil 3.24-3.28’de verilmiştir.



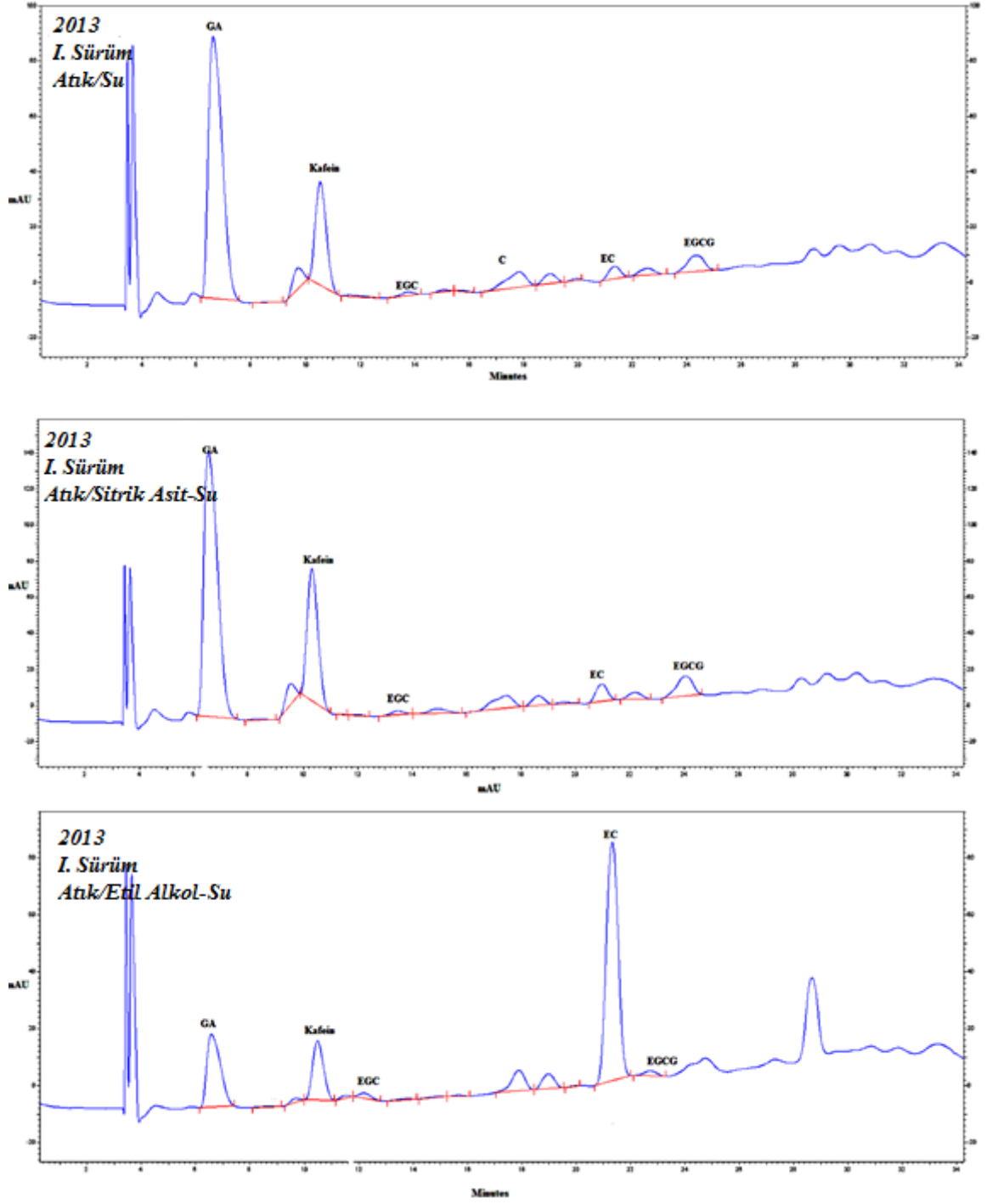
Şekil 3.14. 2013 Yılı birinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



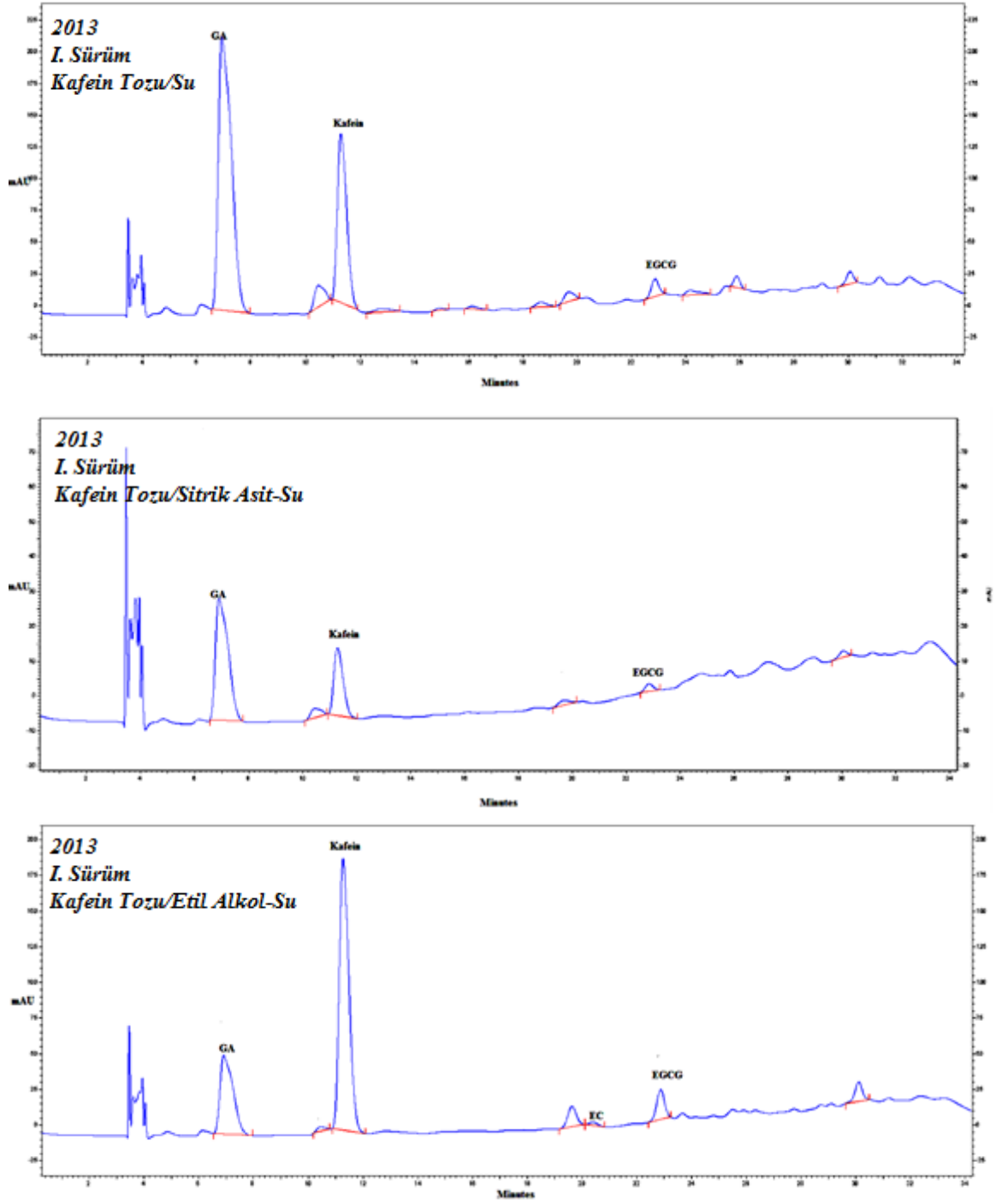
Şekil 3.15. 2013 Yılı birinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların sitrik asit-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



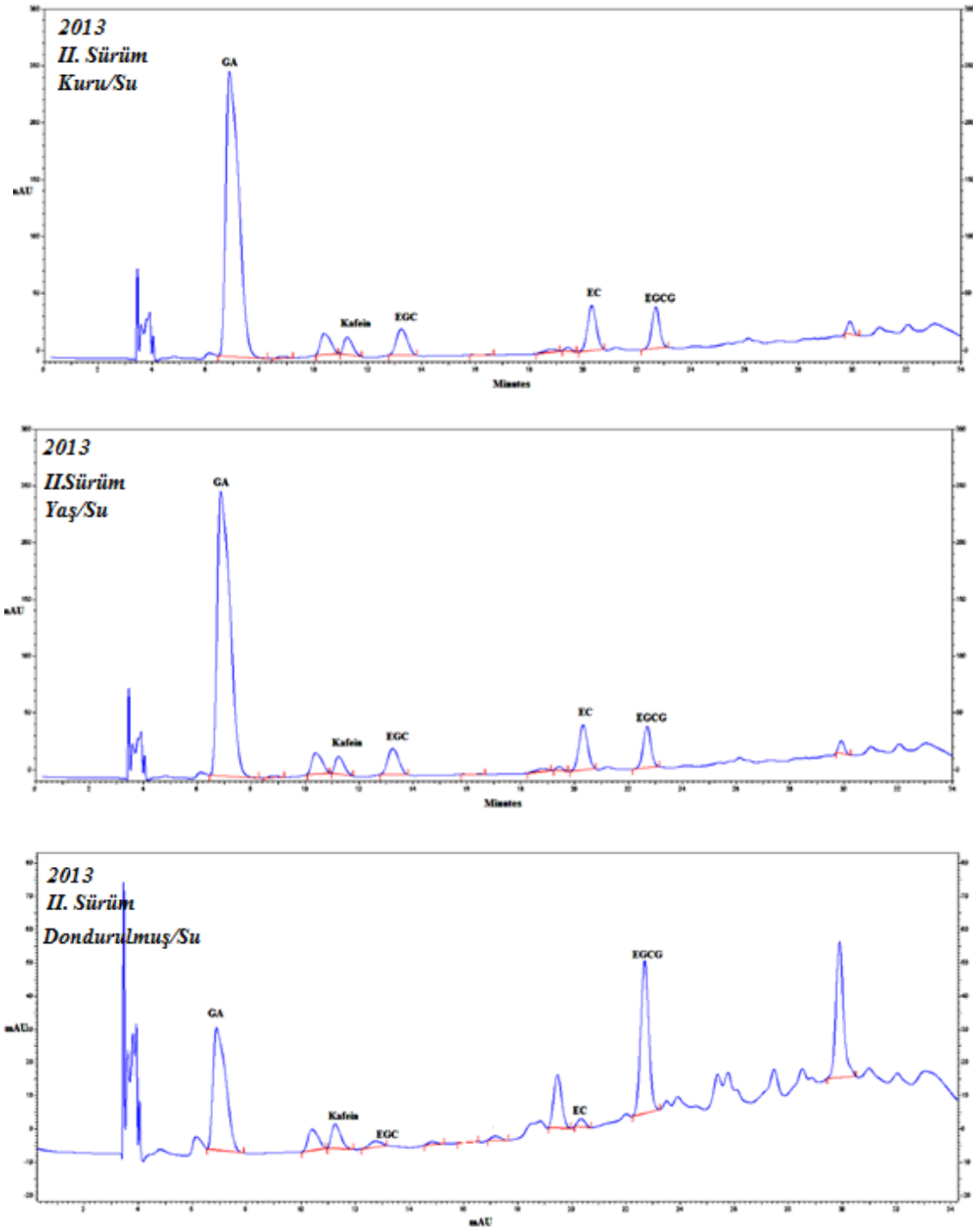
Şekil 3.16. 2013 Yılı birinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların etil alkol-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



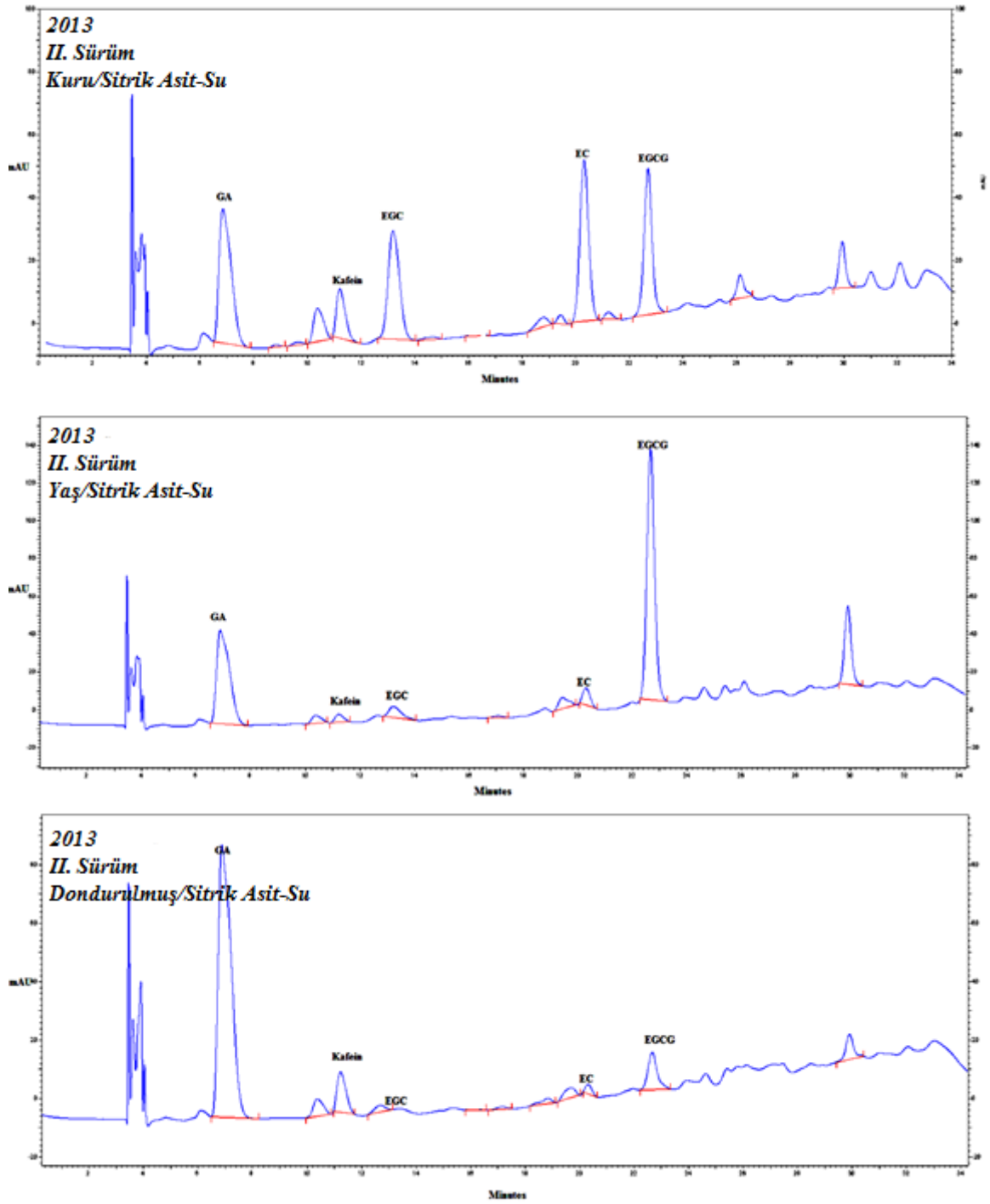
Şekil 3.17. 2013 Yılı birinci sürüm atığın su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerindeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



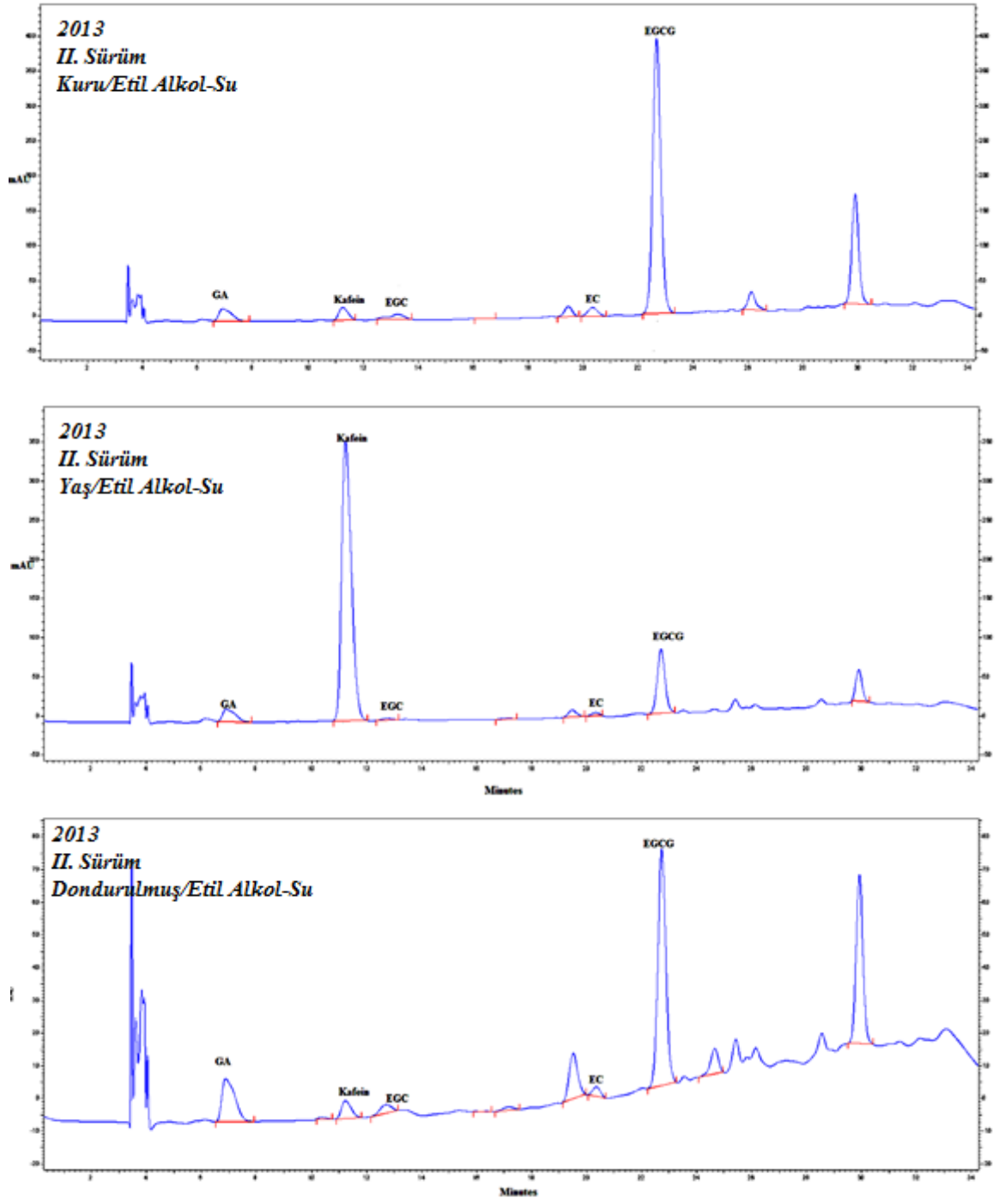
Şekil 3.18. 2013 Yılı birinci sürüm kafein tozunun su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerindeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



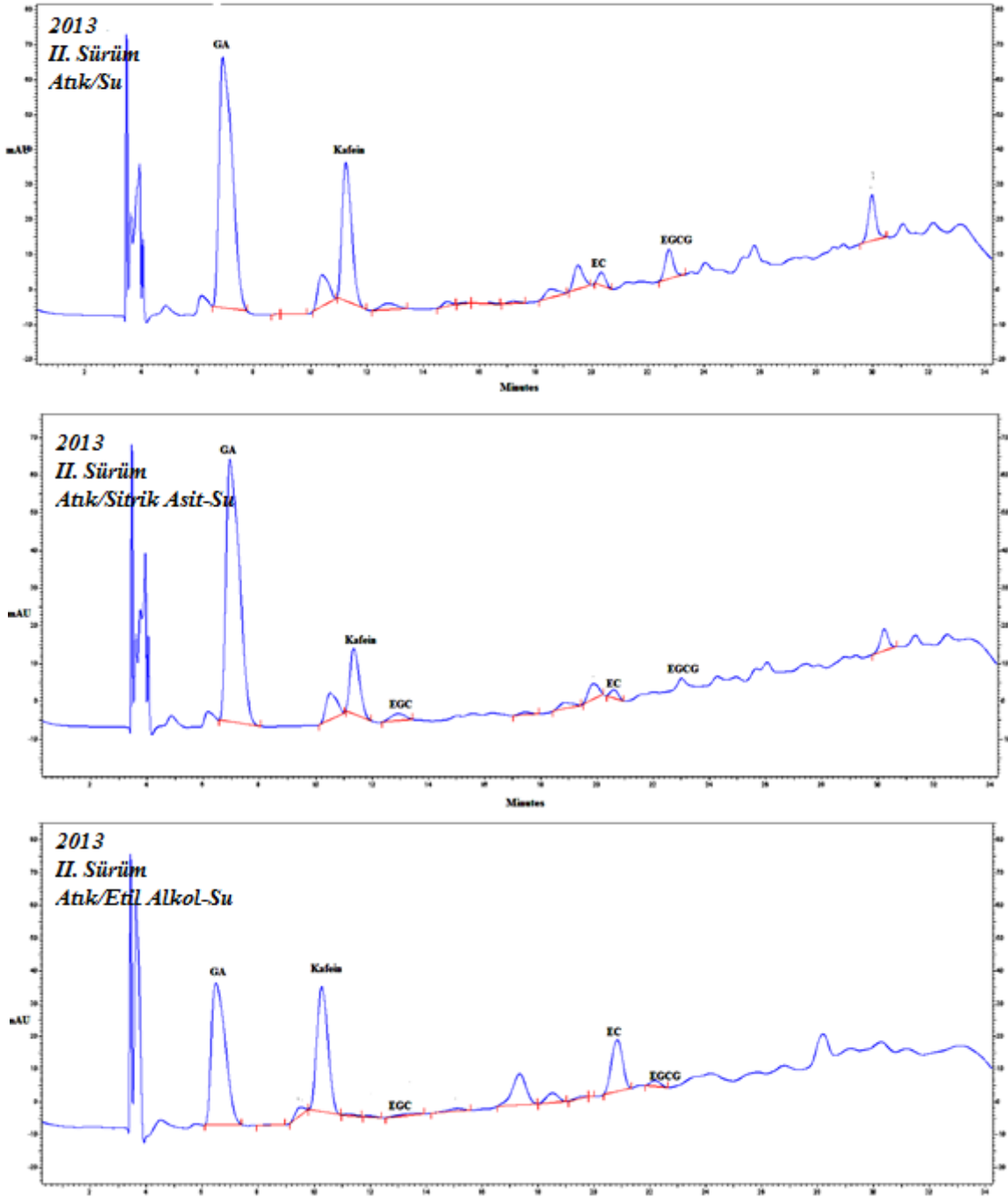
Şekil 3.19. 2013 Yılı ikinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



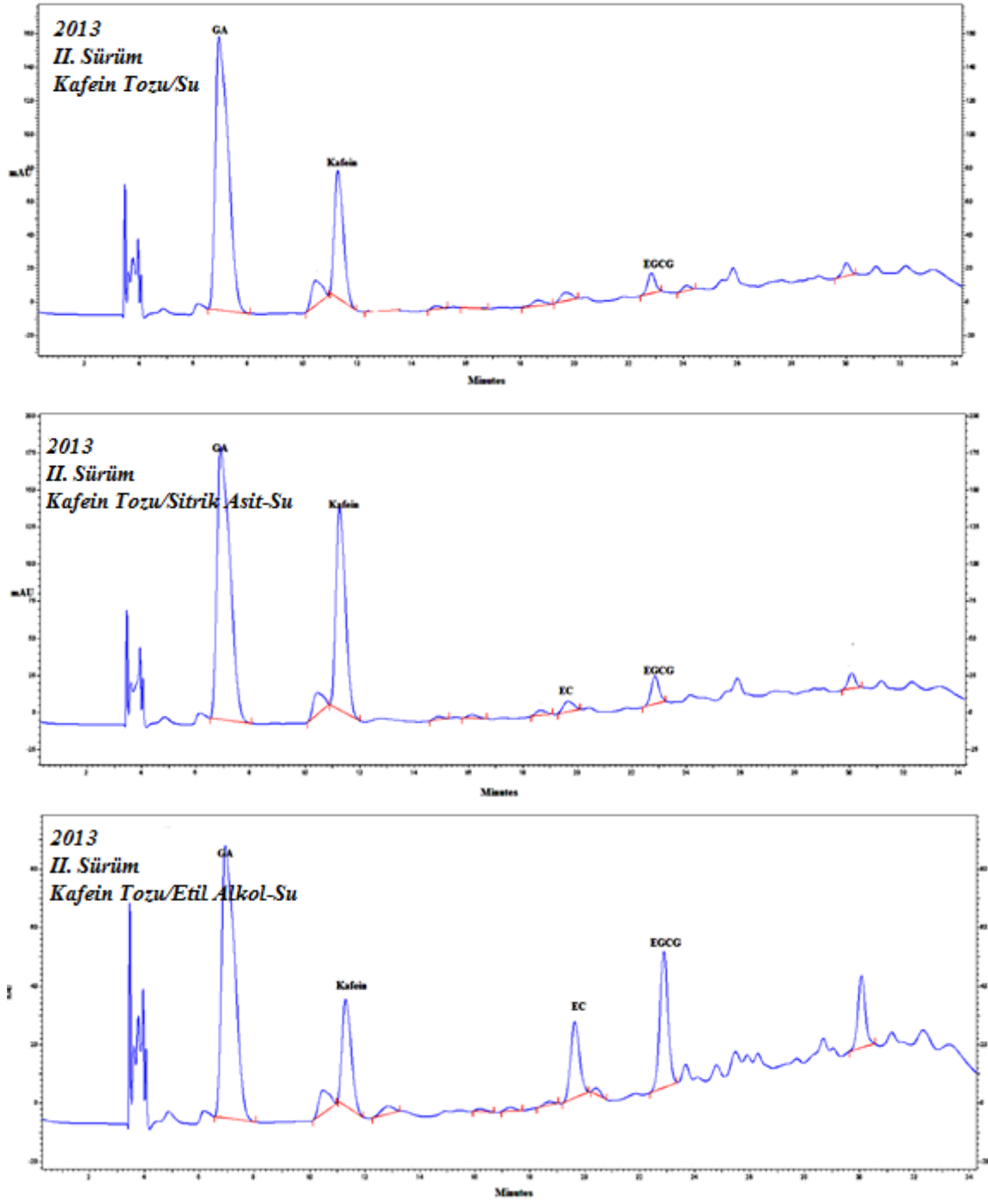
Şekil 3.20. 2013 Yılı ikinci sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çayların sitrik asit-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



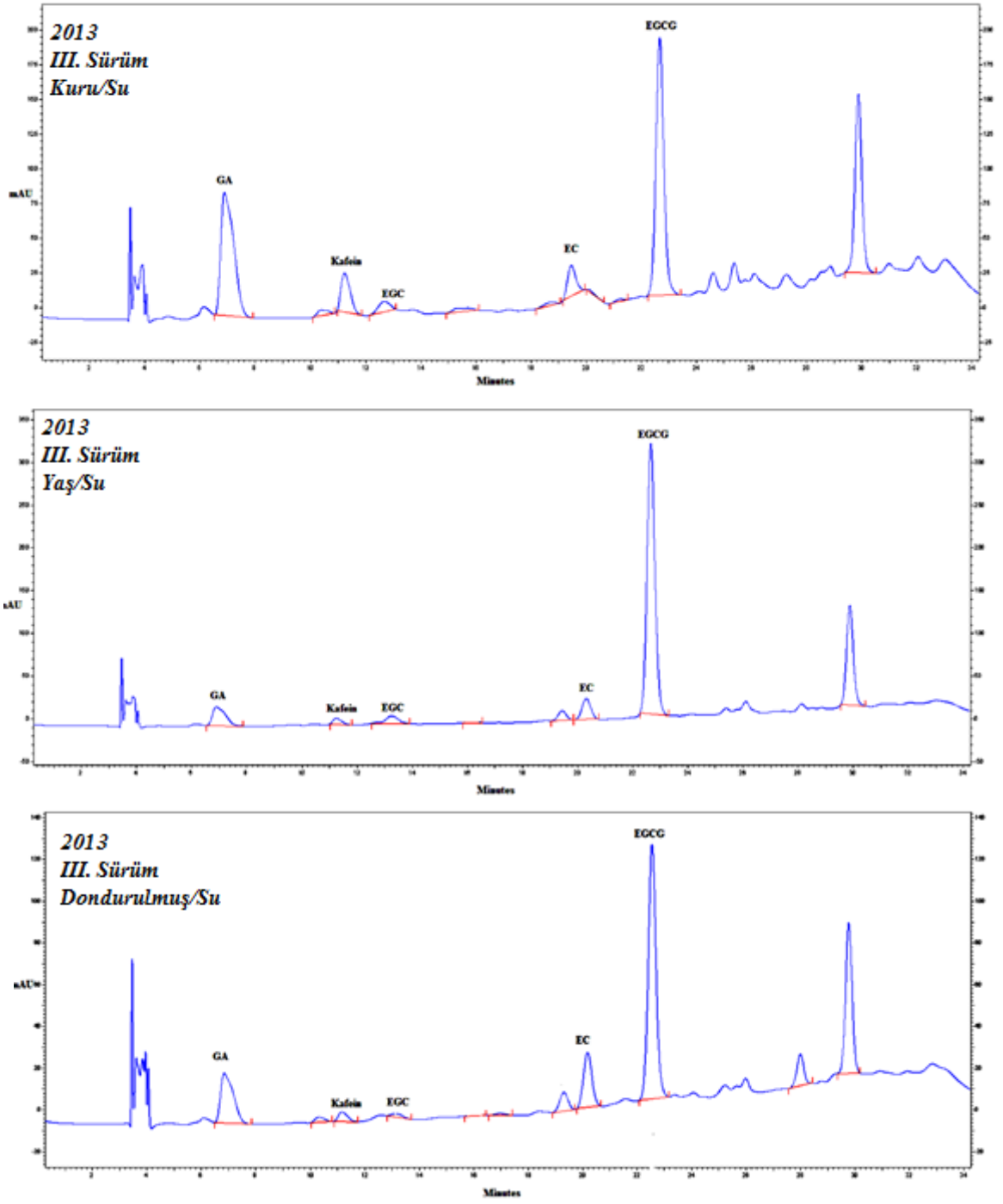
Şekil 3.21. 2013 Yılı ikinci sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çayların etil alkol-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



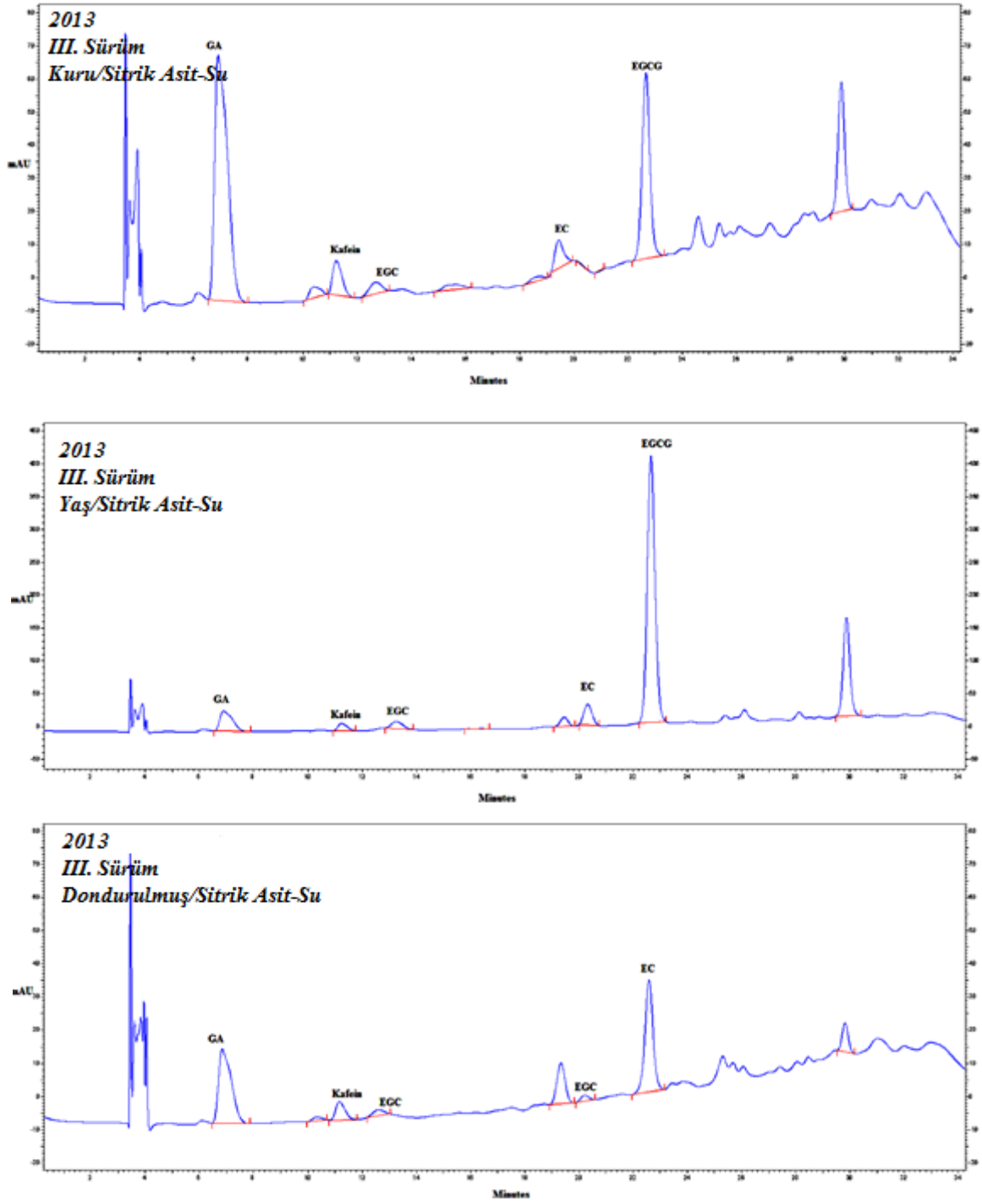
Şekil 3.22. 2013 Yılı ikinci sürüm atığın su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerindeki kateşin ekstraktının HPLC kromatogramları



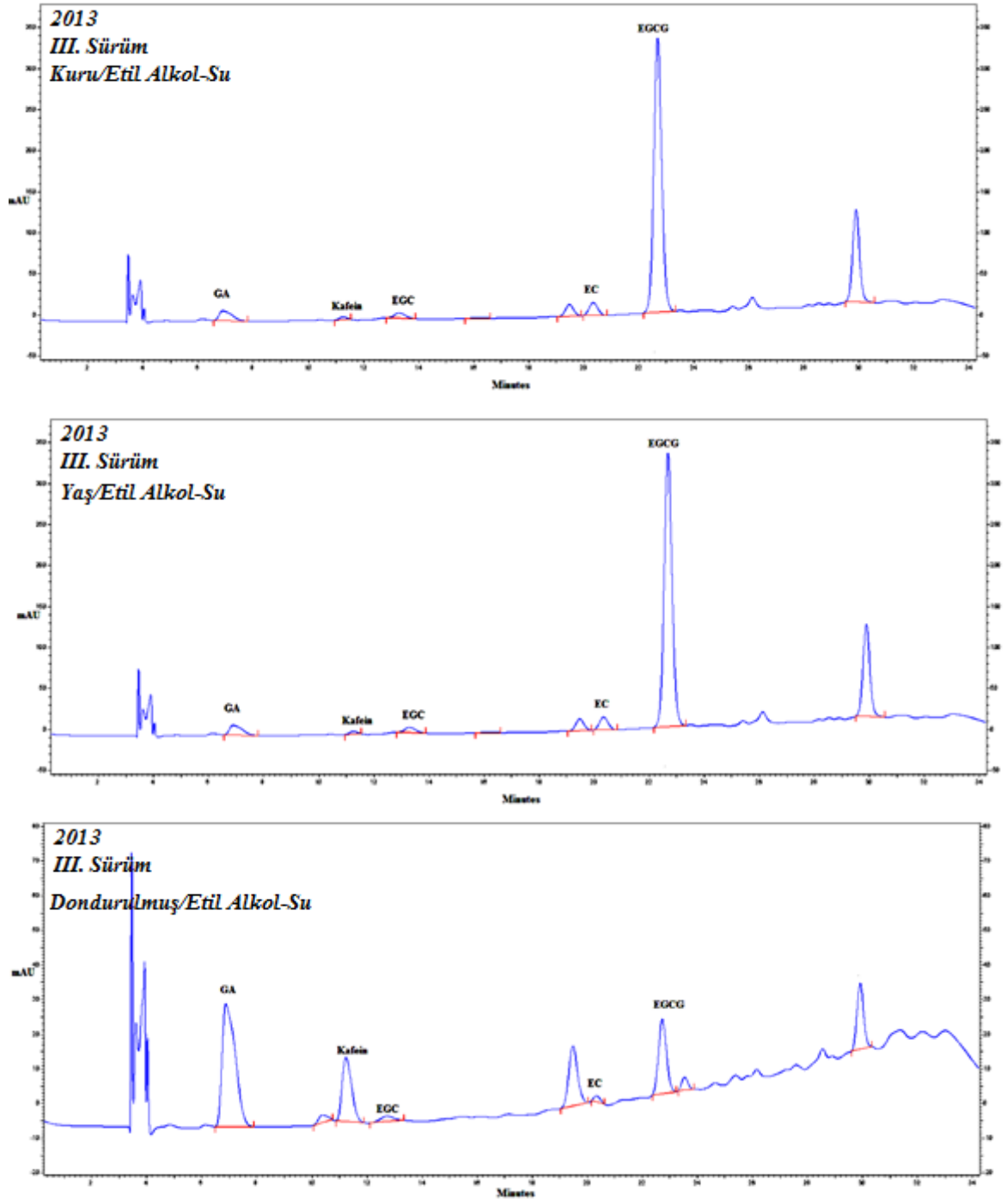
Şekil 3.23. 2013 Yılı ikinci sürüm kafein tozunun su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerindeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



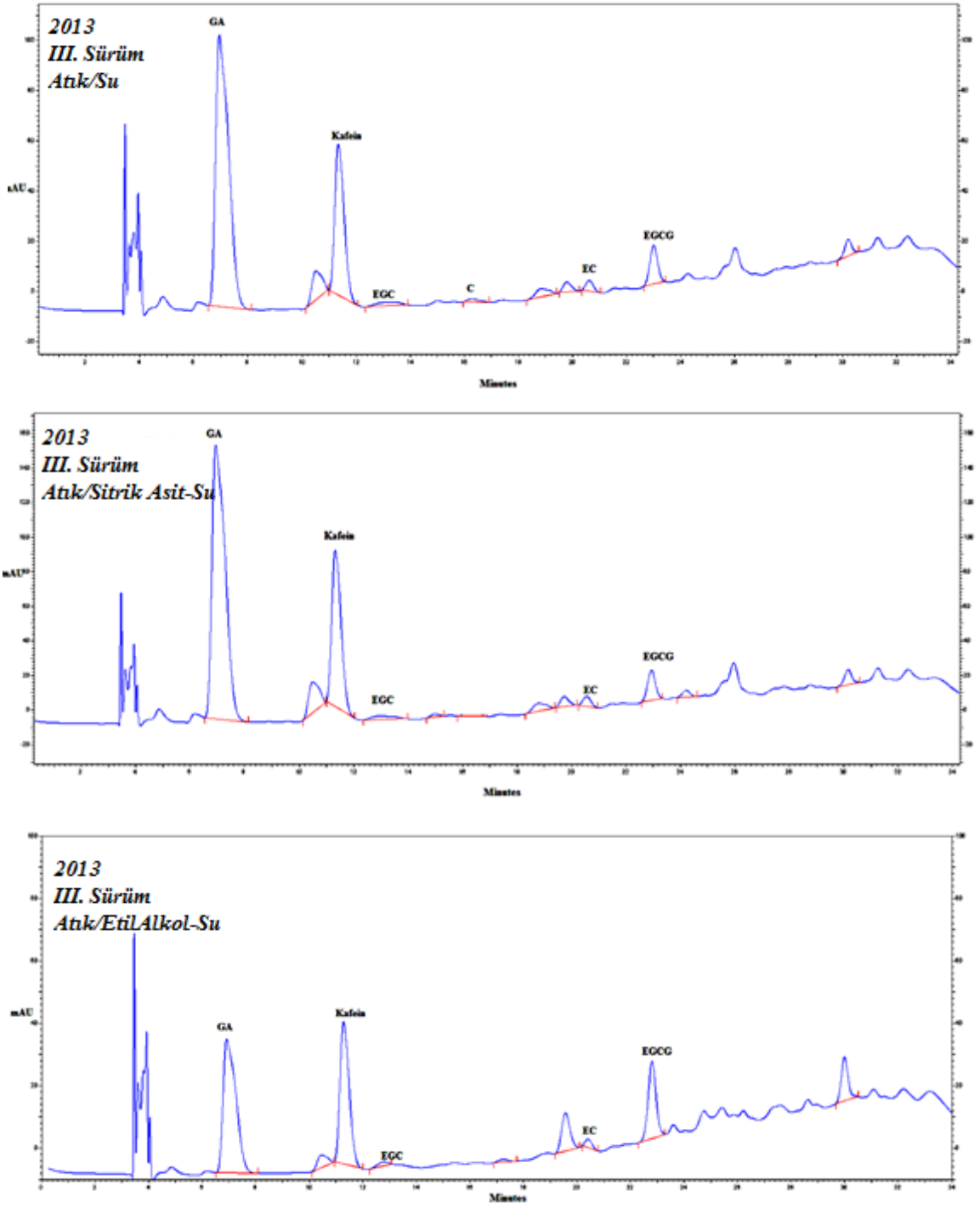
Şekil 3.24. 2013 Yılı üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların, su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



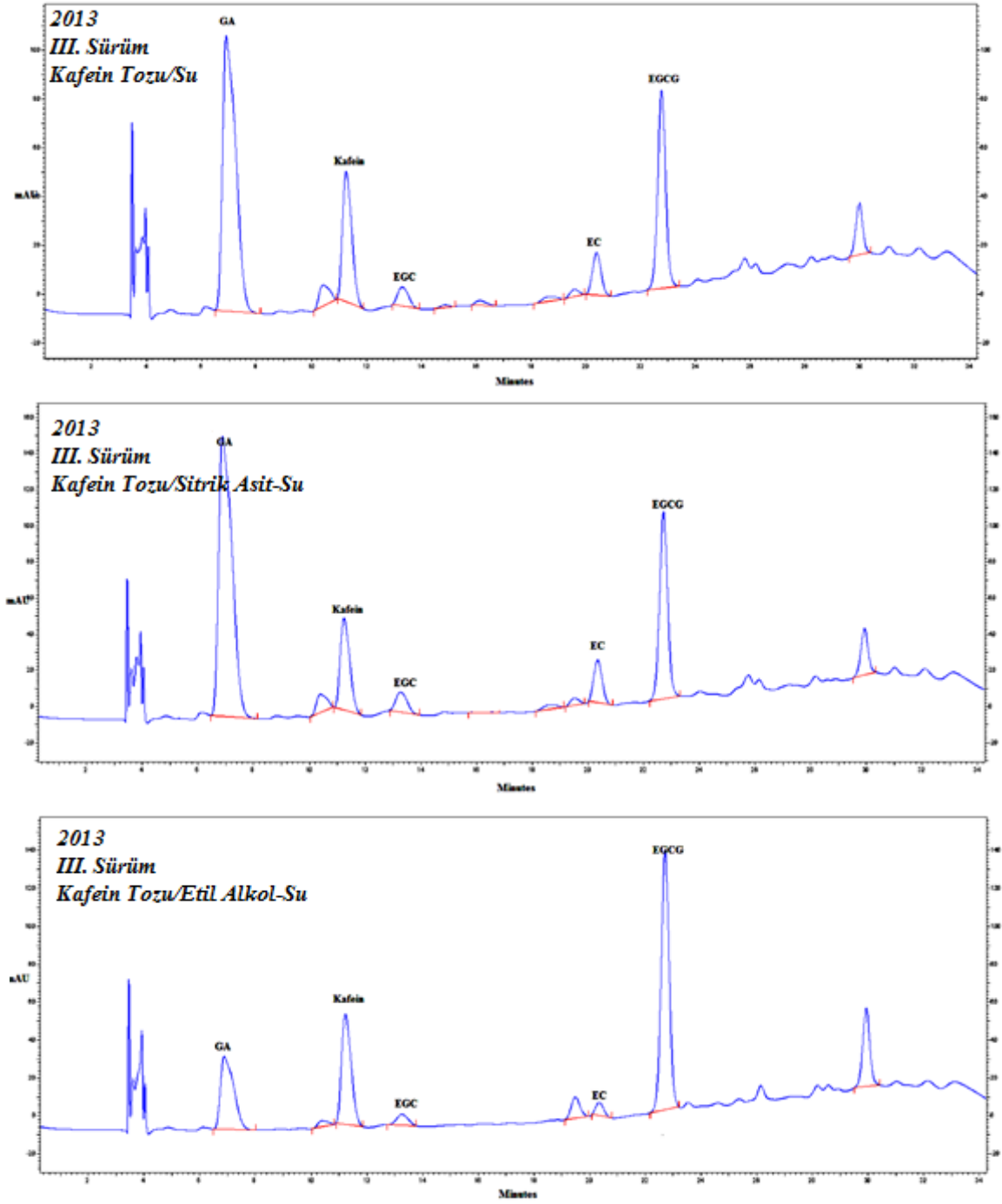
Şekil 3.25. 2013 Yılı üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların sitrik asit-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



Şekil 3.26. 2013 Yılı üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların etil alkol-su çözücüsündeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları



Şekil 3.27. 2013 Yılı üçüncü sürüm atığın su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerindeki kafein ekstraktlarının HPLC kromatogramları

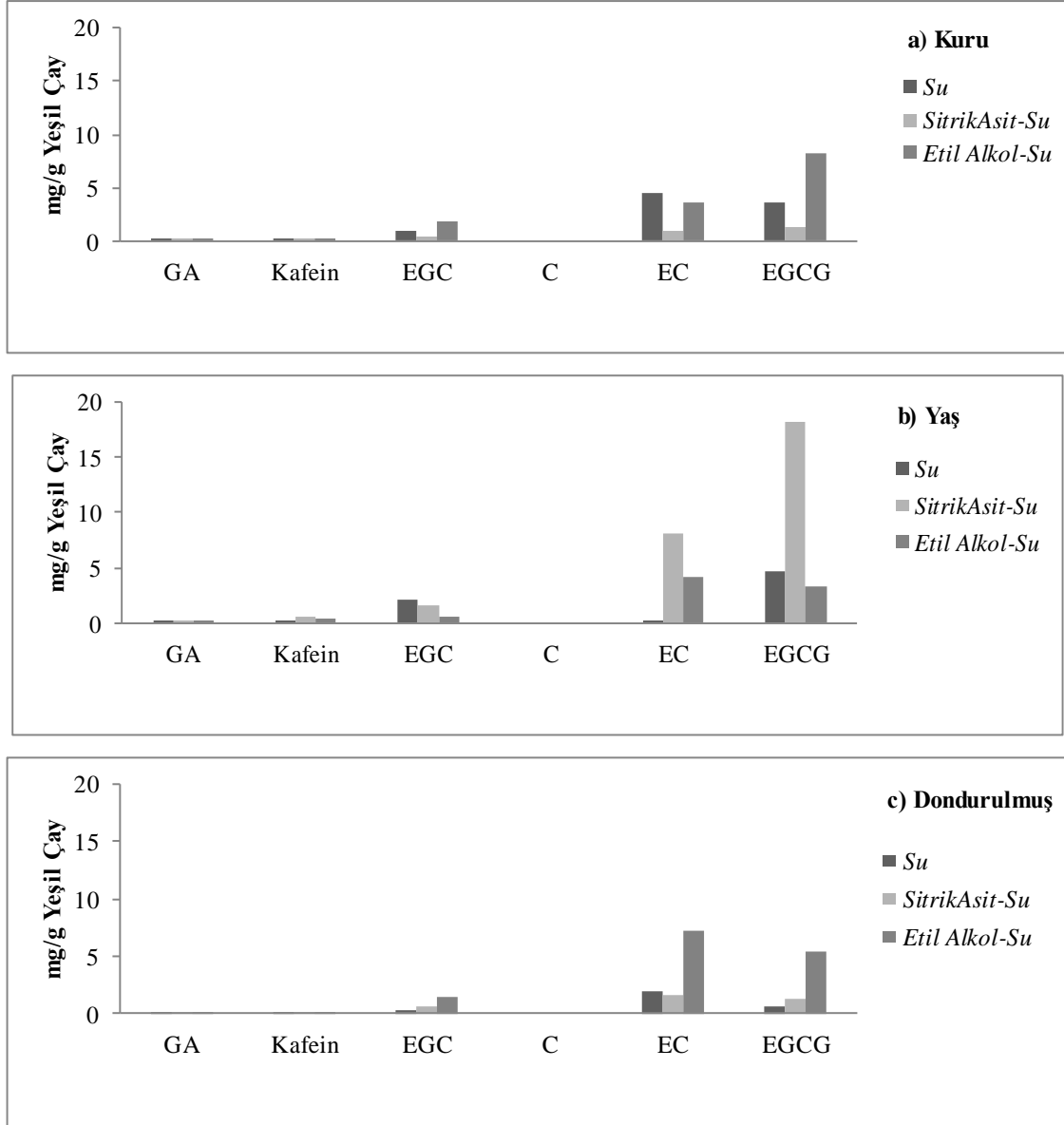


Şekil 3.28. 2013 Yılı üçüncü sürüm kafein tozunun su, sitrik asit-su, etil alkol-su çözücülerindeki kateşin ekstraktlarının HPLC kromatogramları

3.1.1.5. Kateşin Ekstraktlarının İçerikleri

2013 yılına ait yaş çay, çay atığı, kafein tozlarının mikrodalga ekstraksiyonu sonucu elde edilen kateşin ekstraktlarının içerdiği her bir kateşin türevinin miktarları HPLC

kromatogramlarından hesaplanarak Şekil 3.29-3.37’de verilmiştir. Şekillerde verilen değerler 1 g örnekten ekstre edilen kateşin türevinin mg olarak kütlesini yansıtmaktadır.

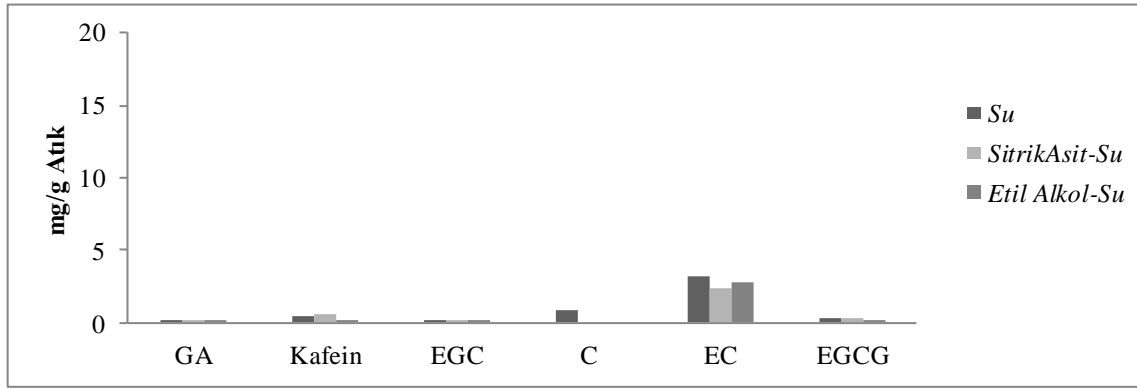


Şekil 3.29. 2013 Yılı birinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin farklı çözücülerle 1 g örnekten ekstre edilen kateşin miktarları

Birinci sürüm yaş çayın yaş olarak sitrik asit-su ile ekstraksiyonunda yüksek oranda EGCG (18,23 mg), EC (8,17 mg) ve EGC (1,61 mg) elde edildiği açıktır. Şekil 3.4’den görüleceği üzere yaş çayın kuru olarak ekstraksiyonunda yüksek ekstrakt verimi elde edilmesine rağmen bu ekstrakt içindeki kateşinlerin miktarı daha düşüktür. Kuru örneklerin daha yüksek oranda kateşin içermesi beklenirken hemen hemen yaş çay örnekleri kadar kateşin içermesi ilginçtir. Bunun sebebi kurutulmuş örneklerin su içeriğinin

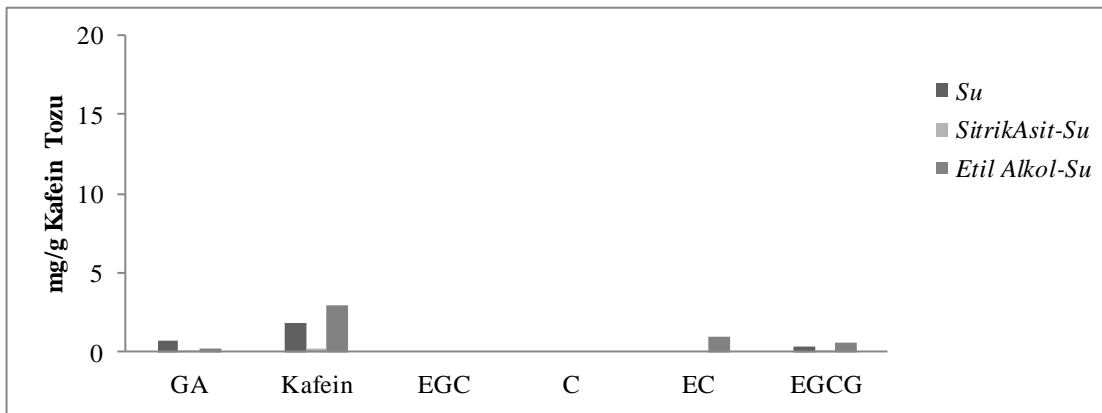
düşük olması ile açıklanabilir. Mikrodalga ışınları materyallerin içindeki su moleküllerinin titreşimi ile ısınmasını sağlamaktadır. Kuru örneklerde su miktarı düştüğünden ve hücre çeperleri daha sert olduğundan kateşinlerin ekstraksiyonunu engellemektedir. Etil asetat ekstraktı kateşinlerin beraberinde diğer materyalleri de içermektedir.

Birinci sürüm atıktan elde edilen kateşin ekstraktlarının içerdiği kateşin miktarları Şekil 3.30'da görülmektedir. Yaş çay örnekleriyle daha kolay karşılaştırılması amacıyla grafik ölçeği aynı tutulmuştur.



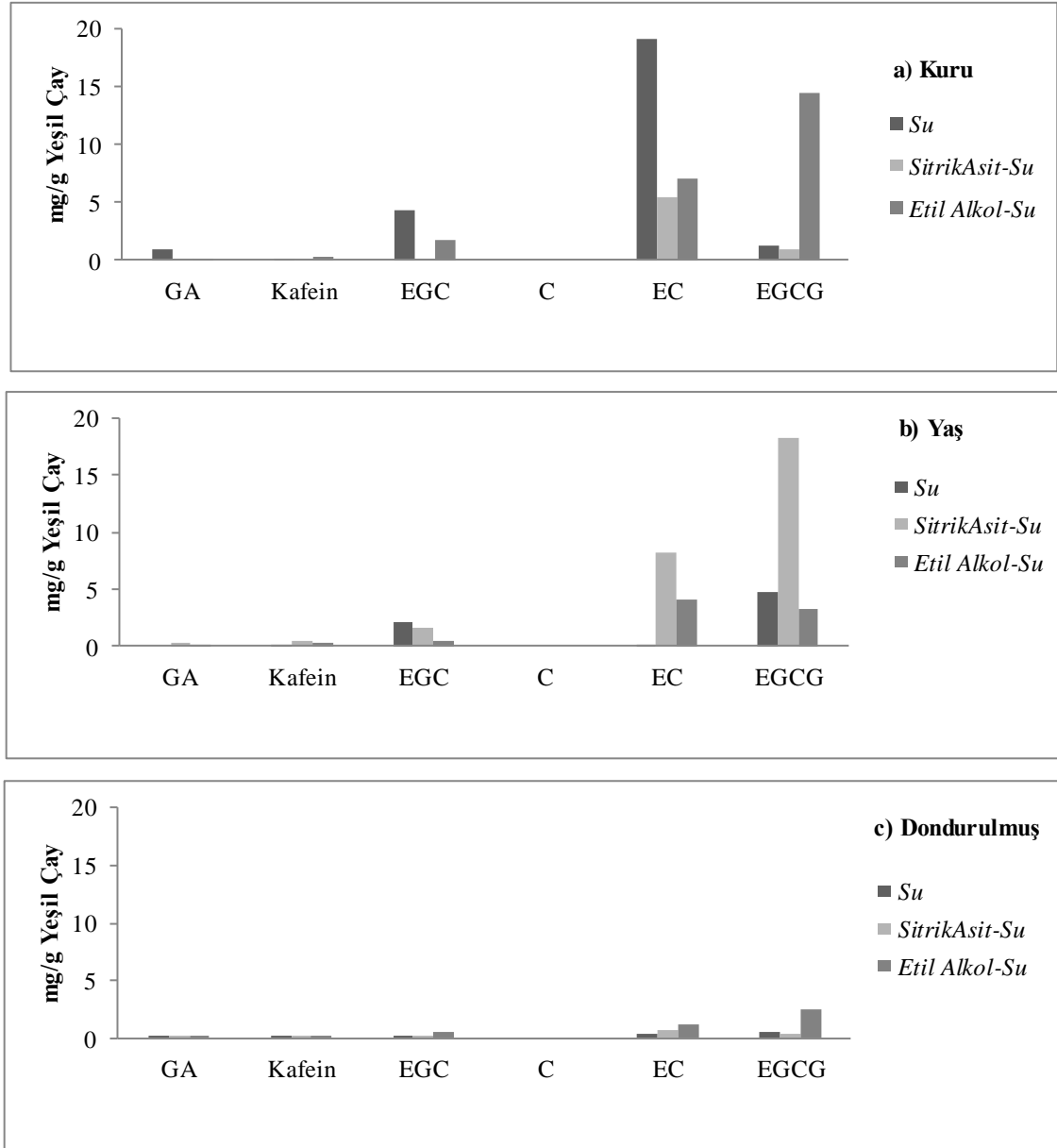
Şekil 3.30. 2013 Yılı birinci sürümde farklı çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları

Atığın kateşin içerikleri ekstrakt verimlerine paralel olacak şekilde düşük bulundu. En belirgin bileşiğin ise EC olduğu görülmektedir. Farklı çözücüler kullanılmasının önemli bir fark getirmediği de açıktır.



Şekil 3.31. 2013 Yılı birinci sürümde farklı çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları

Aynı sürüm örneklerinde kafein tozundan elde edilen kateşin ekstraktı %1,00-2,50 aralığında değişmektedir (Şekil 3.31). Ekstrakt kütlelerinin büyük bir kısmını tam izole edilemeyen kafein oluşturmaktadır. İkinci sürüm yaş çay örneklerinin kateşin içerikleri Şekil 3.32’de görülmektedir.

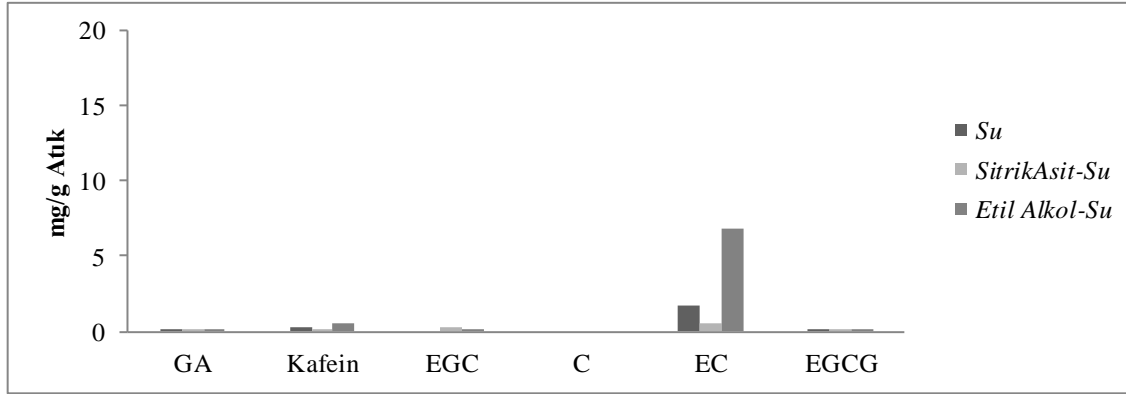


Şekil 3.32. 2013 Yılı ikinci sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin farklı çözücülerle 1 g örnekten ekstre edilen kateşin miktarları

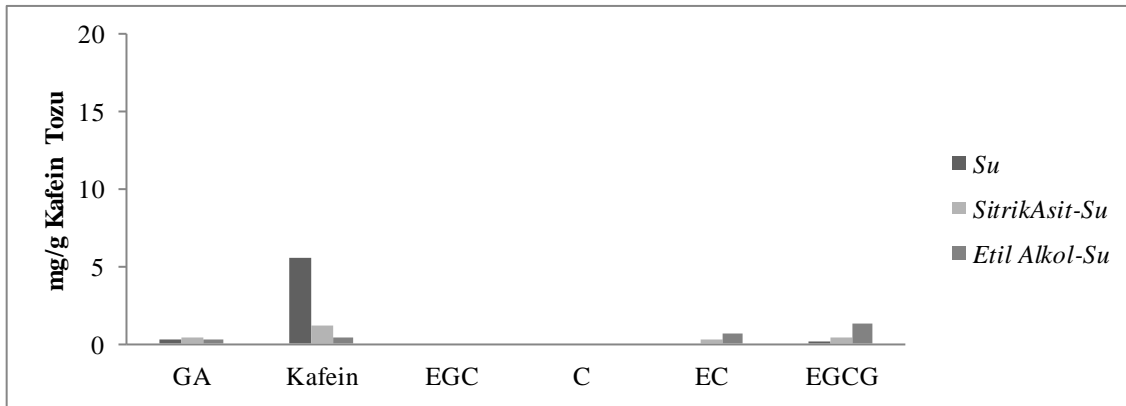
Yaş örneklerden elde edilen kateşin ekstraktının kuru veya dondurulmuş örneklere göre çok daha yüksek EGCG ve EC içerdiği özellikle de sitrik asit-su çözücüsünün etkin

olduğu görülmektedir. Kurutulmuş ve dondurulmuş örneklerden su ve etil alkol-su çözücülerinin daha yüksek EGCG, EC ve EGC'nin ekstre edebildiği de söylenebilir.

İkinci sürüm çay atığının içeriği Şekil 3.33'de ve kafein tozunun içeriği ise Şekil 3.34'de verilmektedir.



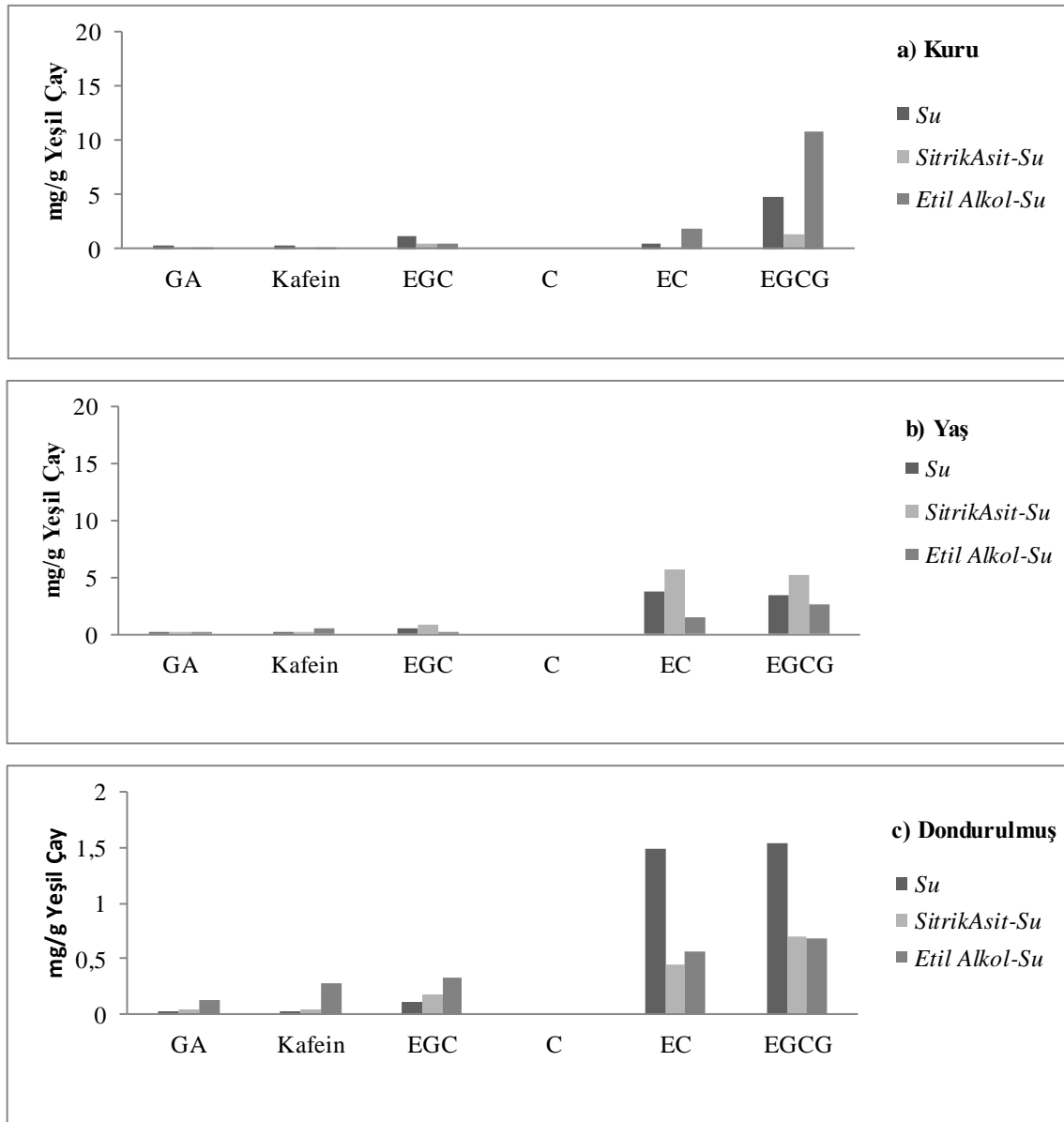
Şekil 3.33. 2013 Yılı ikinci sürümde farklı çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları



Şekil 3. 34. 2013 Yılı ikinci sürümde farklı çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları

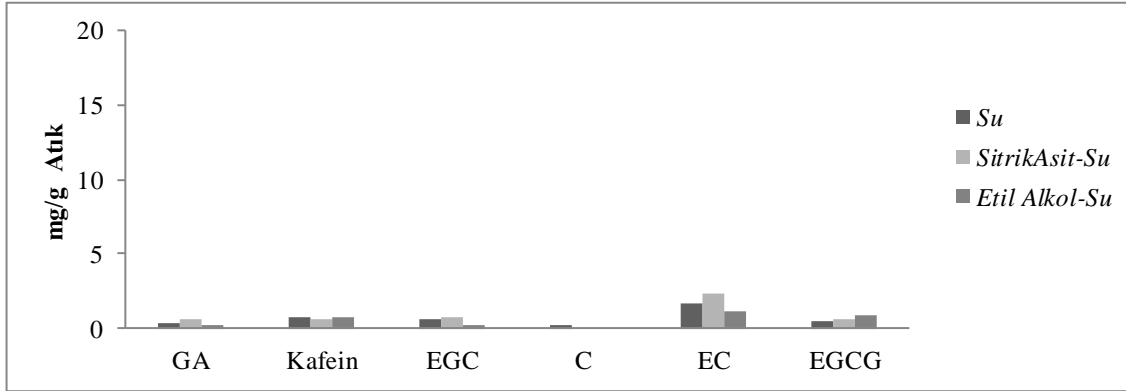
İkinci sürüm çay atığında EC içeriği dikkat çekerken (etil alkol-su ile 6,79 mg/g), kafein tozunda kateşin yerine kalıntı kafeinin ekstre edildiği gözlemlendi.

Son olarak üçüncü sürüm ekstraktlarının içerik değerlendirilmeleri de yapılarak Şekil 3.35-3.37'de verilmiştir.



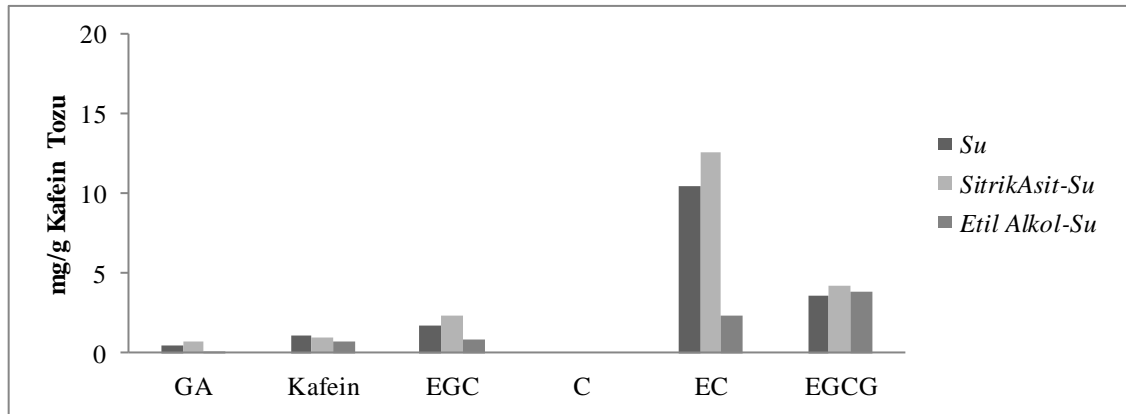
Şekil 3.35. 2013 Yılı üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin farklı çözücülerle 1 g örnekten ekstre edilen kateşin miktarları

Üçüncü sürüm örneklerde de yaş örneklerin EC ve EGCG içerikleri yüksek bulundu. Sitrik asit-su çözücüsüyle önemli ölçüde EC (5,72 mg/g) ve EGCG (5,22 mg/g) ekstre edilebilirken kuru örneklerde su ve etil alkol-su ile EGCG yüksek oranda ekstre edilebilmektedir. Birinci ve ikinci sürüm örneklemeyle uyumlu şekilde 1 gram kuru yaş çaydan etil alkol-su çözücüsü ile 10,86 mg EGCG ekstre edilebilmektedir. Üçüncü sürüm çay atığı ve kafein tozlarının içerikleri sırasıyla Şekil 3.36 ve 3.37’de görülmektedir.



Şekil 3.36. 2013 Yılı üçüncü sürümde farklı çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları

Üçüncü sürüm atıklarının sitrik asit-su ekstraktı düşük oranda EC ve EGCG içermektedir. Diğer türler ise yok denecek kadar azdır.



Şekil 3.37. 2013 Yılı üçüncü sürümde farklı çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları

Üçüncü sürüm çay atıklarından düşük verimle kateşin ekstraktı elde edilmiş olup tüm kateşin türevleri düşük oranda bulundu. Diğer sürümlerden farklı olarak üçüncü sürümde sitrik asit-su ile yüksek oranda EC (12,62 mg/g) ve kısmen yüksek oranda EGCG ekstre edilmiştir.

Yaş çay örneklerinden elde edilen ekstraktların HPLC analizi ile belirlenen içerik hesaplamaları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. 2013 Yılı yaş çay ekstraktlarının içerikleri

I. Sürüm									
İçerik (%)	Kuru			Yaş			Dondurulmuş		
	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su
GA	0,03	0,01	-	-	0,03	0,01	-	-	-
Kafein	0,03	0,01	0,01	0,01	0,05	0,03	0,02	0,01	-
EGC	0,10	0,04	0,18	0,21	0,16	0,05	0,02	0,06	0,14
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC	0,46	0,21	0,36	0,01	0,60	0,42	0,20	0,16	0,73
EGCG	0,36	0,13	0,83	0,47	0,91	0,34	0,07	0,13	0,54
TKİ	0,92	0,37	1,37	0,70	1,13	0,80	0,81	0,36	1,41
KE	2,67	1,84	2,47	1,18	1,13	2,47	1,25	1,43	1,95
EİTK	34,31	20,29	55,50	58,70	99,82	32,52	64,51	24,90	72,66
YÇETK	0,92	0,37	1,37	0,70	1,13	0,80	0,81	0,36	1,41
II. Sürüm									
İçerik (%)	Kuru			Yaş			Dondurulmuş		
	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su
GA	0,09	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
Kafein	0,02	0,01	0,03	-	0,01	0,06	-	0,01	0,01
EGC	0,43	0,01	0,17	0,01	0,09	0,02	0,01	0,03	0,05
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC	1,92	0,55	0,70	0,01	0,28	0,15	0,04	0,07	0,12
EGCG	0,13	0,10	1,46	0,08	0,35	0,26	0,06	0,03	0,25
TKİ	1,95	0,64	2,33	0,10	0,71	0,43	0,09	0,13	0,42
KE	2,63	1,55	2,76	1,61	1,99	2,42	0,96	1,67	2,58
EİTK	74,31	41,05	84,40	6,22	35,85	17,75	9,40	7,90	16,13
YÇETK	1,95	0,64	2,33	0,10	0,71	0,43	0,09	0,13	0,42
III. Sürüm									
İçerik (%)	Kuru			Yaş			Dondurulmuş		
	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su
GA	0,02	0,02	-	-	0,01	-	-	-	0,01
Kafein	0,03	0,01	0,01	-	-	0,01	-	0,01	0,03
EGC	0,11	0,05	0,05	0,06	0,08	0,09	0,01	0,02	0,03
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC	0,05	0,01	0,18	0,38	0,47	0,60	0,15	0,05	0,06
EGCG	0,48	0,13	1,09	0,35	0,46	0,94	0,15	0,07	0,07
TKİ	0,63	0,18	1,26	0,72	1,01	1,64	0,30	0,13	0,16
KE	1,93	1,67	2,61	0,84	1,09	2,15	0,96	1,47	2,41
EİTK	32,82	10,51	48,29	86,21	92,48	76,410	31,32	9,04	6,56
YÇETK	0,63	0,18	1,26	0,73	1,01	1,64	0,30	0,13	0,16

TKİ: Toplam kateşin içerik yüzdesi

KE: Kateşin ekstrakt yüzdesi

EİTK: Ekstraktın içerdiği toplam kateşin yüzdesi

YÇETK: Yeşil çay örneğinden ekstre edilen toplam kateşin yüzdesi

SA: Sitrik Asit

EA: Etil alkol

Tablo, yaş çay örneklerinin sıcak su, sitrik asit-su, etil alkol-su ekstraksiyonuna tabi tutulduktan sonra etil asetatla ayrılan kateşinlerin saflık oranlarını göstermektedir. Elde edilen ekstrakt içerikleri bakımından analiz edildiğinde sıvı-sıvı ekstraksiyonla elde edilen ekstraktın tümünün kateşin türlerinden oluşmadığı anlaşılmaktadır. Tabloyu daha iyi anlamak amacıyla sunulan verileri şu şekilde değerlendirilmelidir. Örneğin ilk sütünde verilen I. sürüm kurutulmuş yaş çay örneğinin su çözücüsü ile yapılan mikrodalga ekstraksiyonunda %2,67 verimle kateşin ekstraktı elde edilmiştir. Bu ekstraktın sadece % 34,31'lik kısmı (EİTK) kateşinlerden oluşmaktadır. Buradan yola çıkarak kurutulmuş yaş çaydan %0,92 verimle (YÇETK) kateşinler ekstre edilmektedir. Bu değerler ne kadar yüksekse ekstraksiyon o kadar başarılıdır. Yaş çay örneklerinin taze olarak işlenmesi sitrik asit-su çözeltilerinde %99,82 (I. sürüm), %35,85 (II. sürüm) ve %92,48 (III. sürüm) kateşinden oluşan ekstraktlar vermektedir. Her üç sürümünde kurutulmuş yaş çay örneklerinin etil alkol-su ile oldukça yüksek oranda kateşin izole edilebilmektedir. Dondurulmuş örnekler de hem ekstrakt verimleri hem de bu ekstrakt içerikleri oldukça düşüktür. Dondurularak saklanması enzimatik tepkimelerin devam ettiği ve kateşin içeriğinin çok büyük oranda düştüğü söylenebilir. Çay atığı ve kafein tozu içerik değerlendirilmesi Tablo 3.3 ve 3.4' de verilmiştir.

Tablo 3.3. 2013 Yılı çay atığı ekstraktlarının içerikleri

ATIK									
İçerik (%)	I. SÜRÜM			II. SÜRÜM			III. SÜRÜM		
	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-S
<i>GA</i>	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,04	0,06	0,02
<i>Kafein</i>	0,05	0,05	0,02	0,03	0,02	0,05	0,08	0,07	0,08
<i>EGC</i>	0,02	0,02	-	-	0,03	0,01	0,06	0,07	0,02
<i>C</i>	0,08	-	-	-	-	-	0,02	-	-
<i>EC</i>	0,31	0,24	0,27	0,17	0,05	-	0,16	0,23	0,11
<i>EGCG</i>	0,03	0,03	0,01	0,02	0,01	0,01	0,05	0,06	0,09
<i>TKİ</i>	0,44	0,28	0,28	0,29	0,09	0,69	0,29	0,36	0,22
<i>KE</i>	1,82	1,02	1,28	1,50	1,55	1,86	2,45	2,49	2,60
<i>EİTK</i>	24,34	26,88	22,04	19,20	5,67	36,80	11,61	14,56	8,26
<i>AETK</i>	0,44	0,28	0,28	0,29	0,09	0,69	0,29	0,36	0,22

AETK: Çay atığından ekstre edilebilen toplam kateşin yüzdesi

Tüm sürümlerde ve tüm çözücülerde son derece düşük saflıkta ekstraktlar elde edildiği açıktır.

Tablo 3.4. 2013 yılı kafein tozu ekstraktlarının içerikleri

KAFEİN TOZU									
İçerik (%)	I. SÜRÜM			II. SÜRÜM			III. SÜRÜM		
	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su
<i>GA</i>	0,07	0,01	0,02	0,03	0,04	0,03	0,05	0,07	0,01
<i>Kafein</i>	0,18	0,01	0,30	0,06	0,12	0,05	0,11	0,10	0,08
<i>EGC</i>	-	-	-	-	-	-	0,18	0,23	0,08
<i>C</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>EC</i>	-	-	0,10	0,00	0,03	0,07	1,04	1,26	0,24
<i>EGCG</i>	0,04	-	0,07	0,02	0,04	0,13	0,36	0,42	0,38
<i>TKİ</i>	0,04	-	0,17	0,02	0,07	0,17	1,58	1,92	0,70
<i>KE</i>	2,14	1,14	2,43	1,315	1,44	2,12	3,31	3,05	2,09
<i>EİTK</i>	1,78	0,26	6,80	1,52	4,79	8,09	47,70	62,95	33,64
<i>KETK</i>	0,04	-	0,17	0,02	0,07	0,17	1,58	1,92	0,70

KETK: Kafein tozundan ekstre edilebilen toplam kateşin yüzdesi

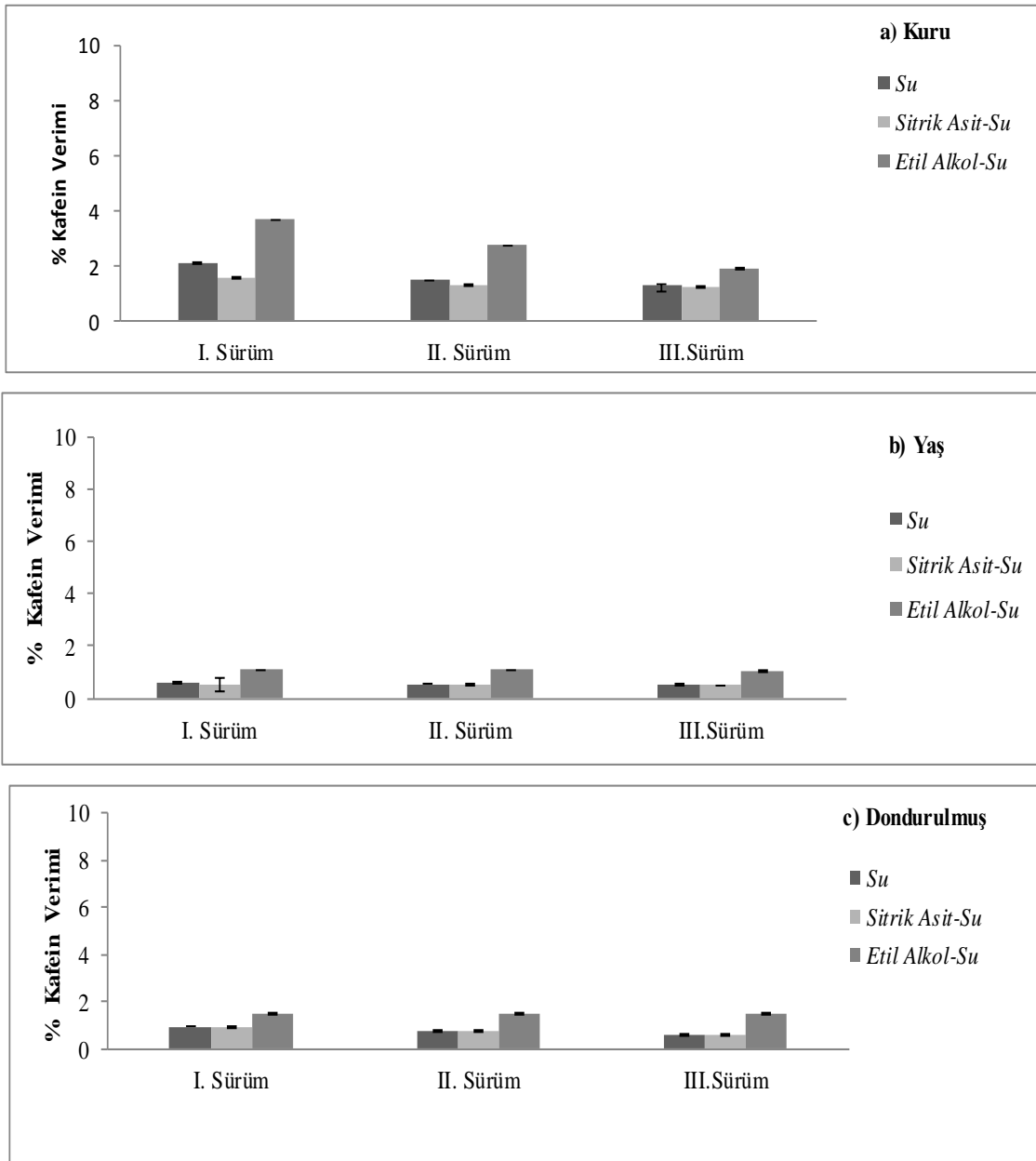
Kafein tozu örneklerinin kateşin içeriklerine göre (Tablo 3.4) dikkate değer saflıkta kateşin ekstraktları sadece III. sürümden elde edilebilmektedir.

3.1.2. 2014 Yılı Bulguları

2014 yılı örneklemelerinden elde edilen kateşin ekstrakt verimlerinde bir önceki yıla göre bazı benzerlik ve farklılıklar gözlemlendi. 2013 Yılı örneklerinin HPLC kromatogramları Bölüm 3.1.1.4'de verildiğinden benzer kromatogramlar 2014 yılı örnekleri için verilmedi. Bu bölümde ekstrakt verimleri ve kromatogramlardan elde edilen içerikler sunulmuştur.

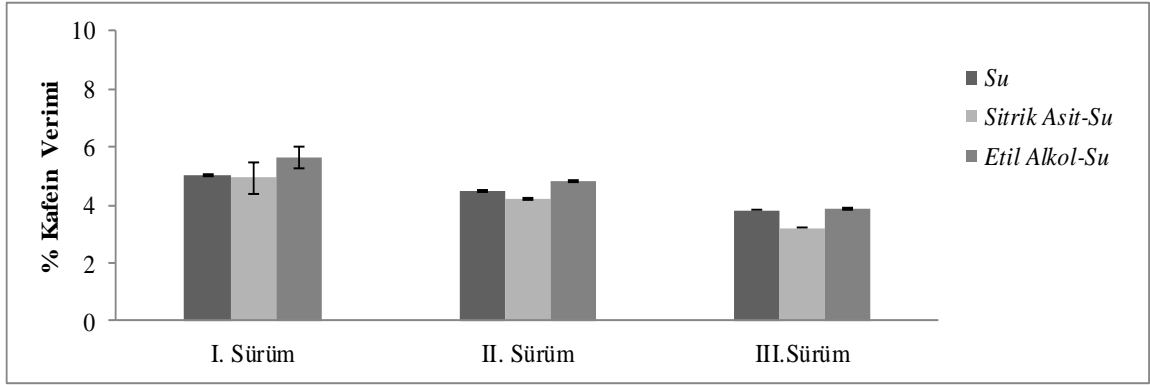
3.1.2.1. Ekstakt Verimleri

2013 yılı örnekleme ve ekstraksiyon şartları 2014 yılı sürümleri içinde tekrar edildi. Elde edilen verimler aşağıdaki şekillerde sunulmuştur. 2014 Yılı'nın birinci, ikinci, üçüncü sürüm yaş çay (yaş, kuru, dondurulmuş) örneklerinin kafein verimleri Şekil 3.38'de görülmektedir.



Şekil 3.38. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların farklı çözücülerdeki % kafein verimleri

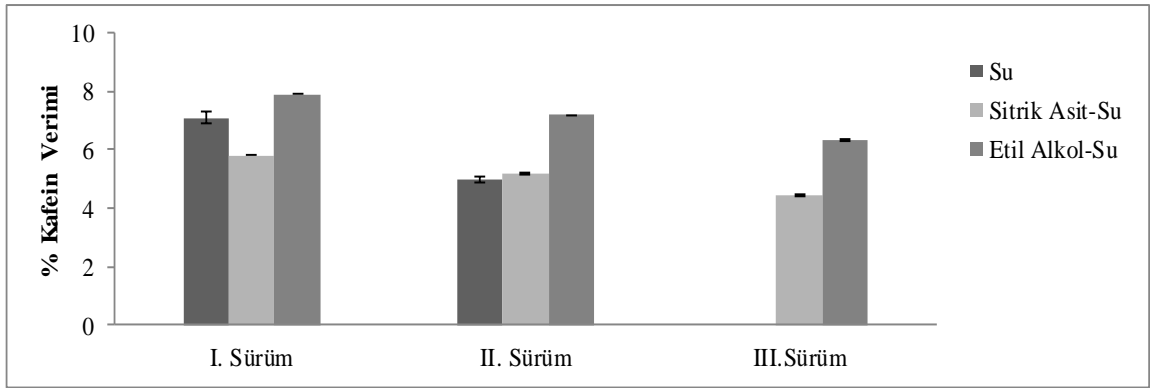
Kafein verimleri %0,51-3,68 aralığında değişmektedir. Kuru saklanan örneklerden kütlece daha yüksek verimli kafein ekstraktı elde edilmiştir. Çözücü yönünden değerlendirildiğinde etil alkol-su çözücüsünün kullanımı su ve sitrik asit-su çözücülerine göre daha yüksek kafein verimlerine neden olmaktadır. Çay atıklarının farklı çözücülerdeki kafein ekstraksiyon verimleri Şekil 3.39'da kafein tozu verimleri ise Şekil 3.40'da verilmiştir.



Şekil 3.39. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm çay atıklarının farklı çözücülerdeki % kafein verimleri

Bu örneklerde elde edilen kafein ekstraktının kütleleri yaş çaya göre önemli oranda yüksek bulundu. Birinci, ikinci ve üçüncü sürüm atıkların etil alkol-su çözücüsündeki kafein verimleri sırasıyla %5,63, %4,79 ve %3,86 olarak bulundu.

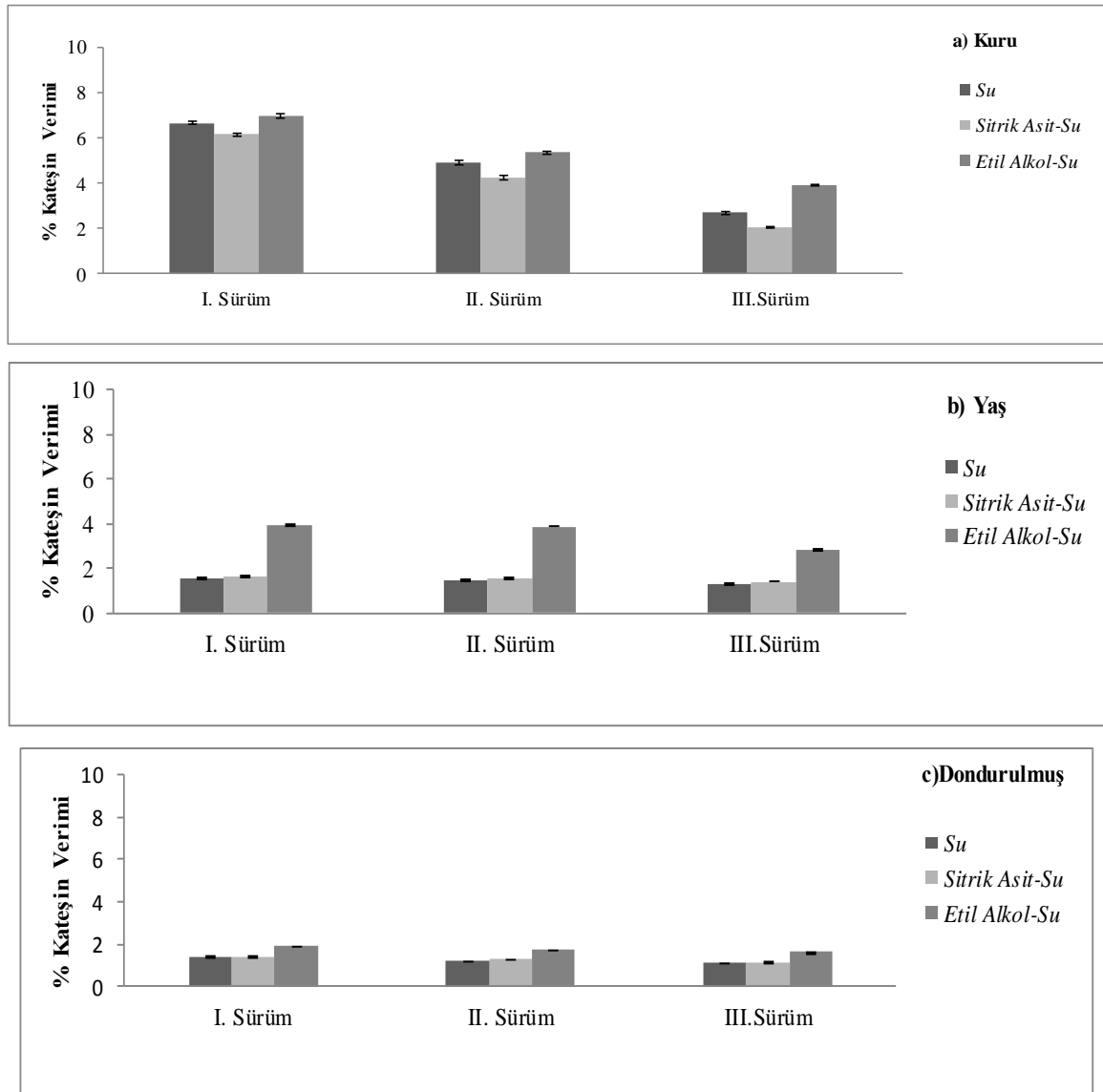
Benzer şekilde her üç sürüm dönemlerinde fabrikada işlenen çaylardan elde edilen kafein tozu örneklerinden önemli oranda kafein ekstraktı elde edildi (Şekil 3.40).



Şekil 3.40. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kafein tozlarının farklı çözücülerdeki % kafein verimleri

Kafein içeriği birinci sürüm örneklerinde daha yüksek görünmektedir. En yüksek kafein verimi birinci sürümün etil alkol-su çözücüsünde bulundu.

2014 yılı örnekleme döneminde üç farklı sürüm ve üç farklı çözücü için elde edilen kateşin ekstrakt verimleri hesaplanarak Şekil 3.41-3.43'de verilmiştir.

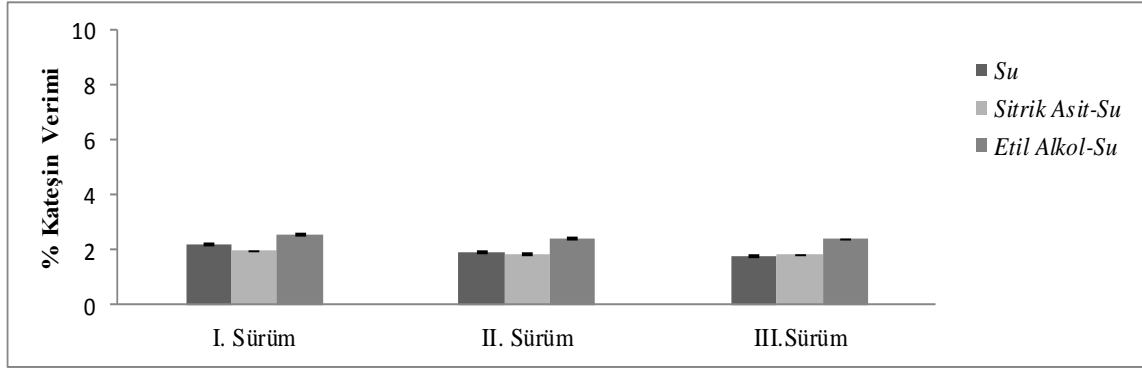


Şekil 3.41. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların farklı çözücülerdeki % kateşin verimleri

Kateşin ekstraktlarının % verimleri yaş için %1,30-3,94; kuru için %2,60-6,94 ve dondurulmuş için %1,09-1,89 aralığında değişmektedir. Kateşin verimleri örnek yapısı ve sürümler arasında net bir farklılık gözlemlendi. Özellikle birinci sürüm örneklerinde hemen hemen tüm çözücülerde daha yüksek kateşin ekstraktı elde edildi. Su ve sitrik asit-su çözücülerini benzer ekstraksiyon verimleri sağladı. Diğer taraftan yaş çayın taze, kuru veya dondurulmuş olarak ekstraksiyonunda yine kurutulmuş örneklerinin üstünlüğü mevcuttur.

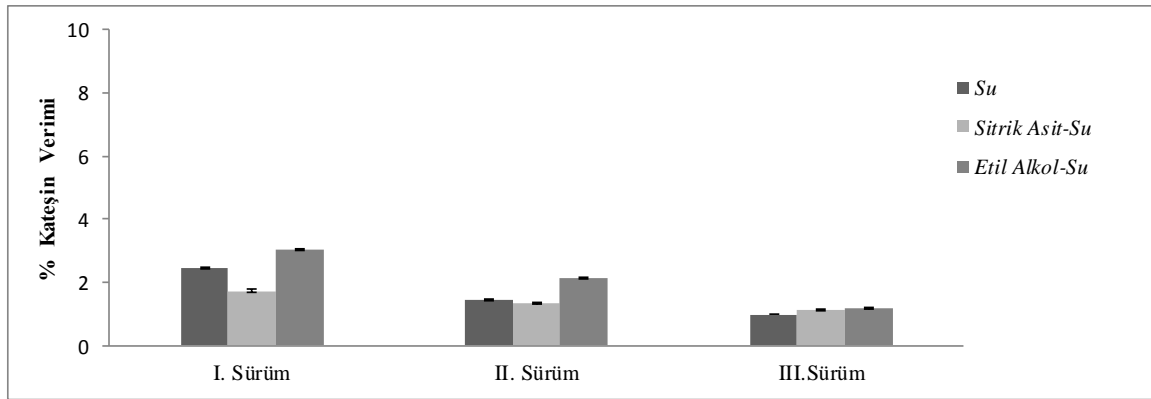
Çay atıklarından elde edilen kateşin verimleri Şekil 3.42'de görülmektedir. Atıklar %1,81-2,56 aralığında kateşin ekstrakt verimi sağlamıştır. Sürümler arasında çok anlamlı

farklar gözlenmemiştir. En yüksek kateşin birinci sürümün etil alkol- su çözücüsünde (%2,56) elde edildi.



Şekil 3.42. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm çay atıklarının farklı çözücülerdeki % kateşin verimleri

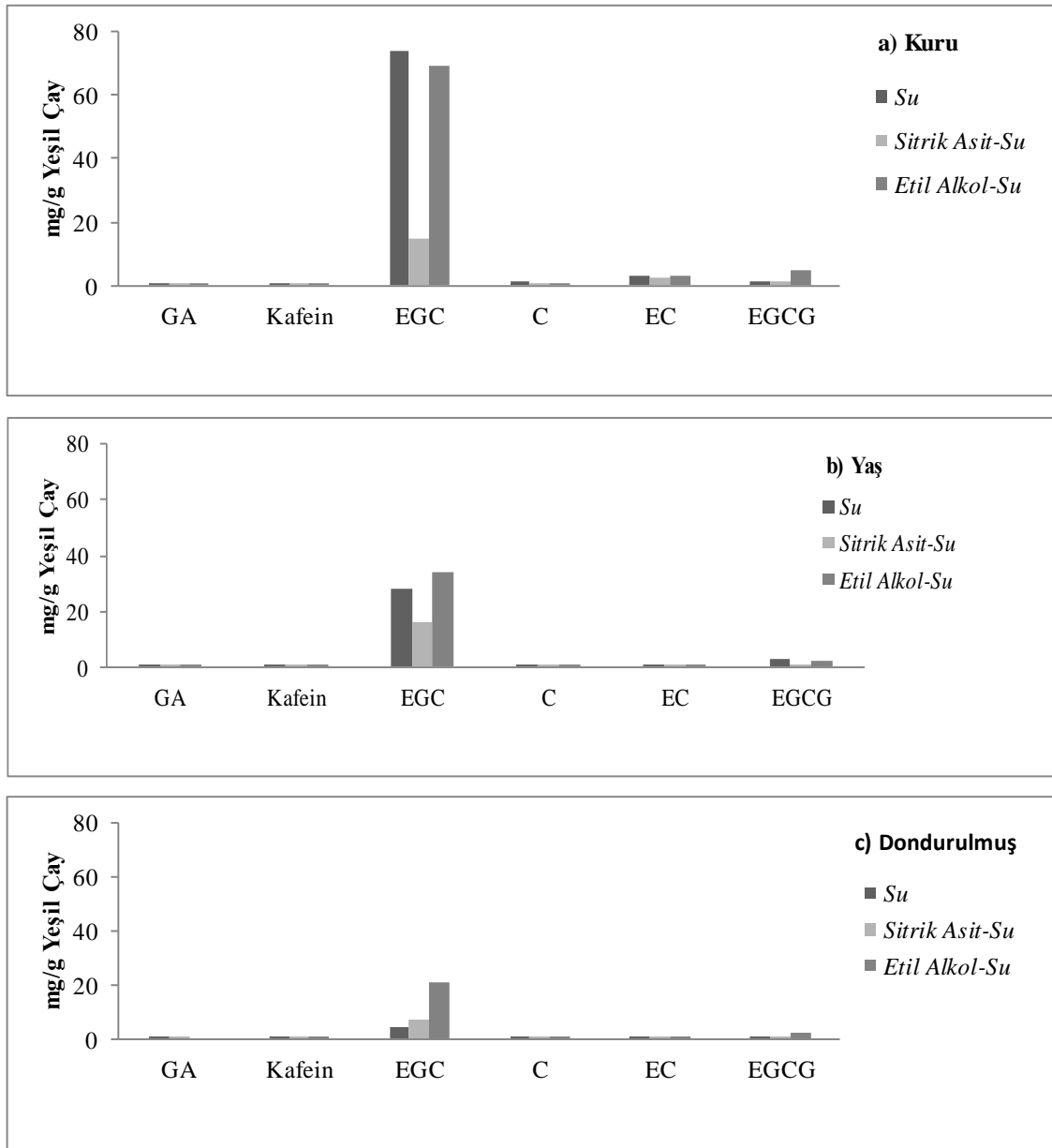
Kafein tozundan elde edilen kateşin verimleri Şekil 3.43'de verilmiştir. Kafein tozundan da önemli oranda kateşin ekstraktı elde edildi. Birinci sürüm örneklerinin daha yüksek ekstrakt verimleri sağladığı ve her üç sürümde de etil alkol-su çözücüsünün etkin olduğu (sırasıyla %3,02, %2,12, %1,18) Şekil 3.43'de görülmektedir.



Şekil 3.43. 2014 Yılı birinci, ikinci ve üçüncü sürüm kafein tozlarının farklı çözücülerdeki % kateşin verimleri

3.1.2.2. Kateşin Ekstraktlarının İçerikleri

2014 yılına ait yaş çay, çay atığı, kafein tozlarının mikrodalga ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların içerdiği her bir kateşin türevinin miktarı hesaplanarak Şekil 3.44-3.52'de verilmiştir.

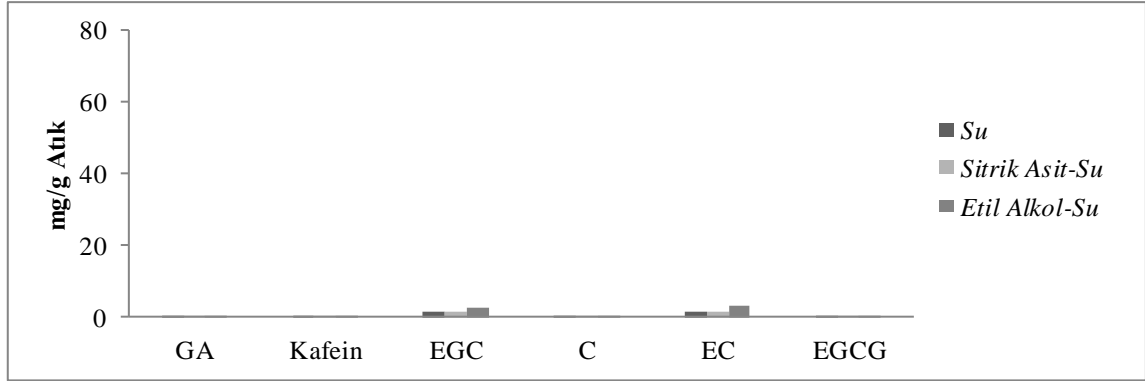


Şekil 3.44. 2014 Yılı birinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin farklı çözücülerle 1 g örnekten ekstre edilen kateşin miktarları

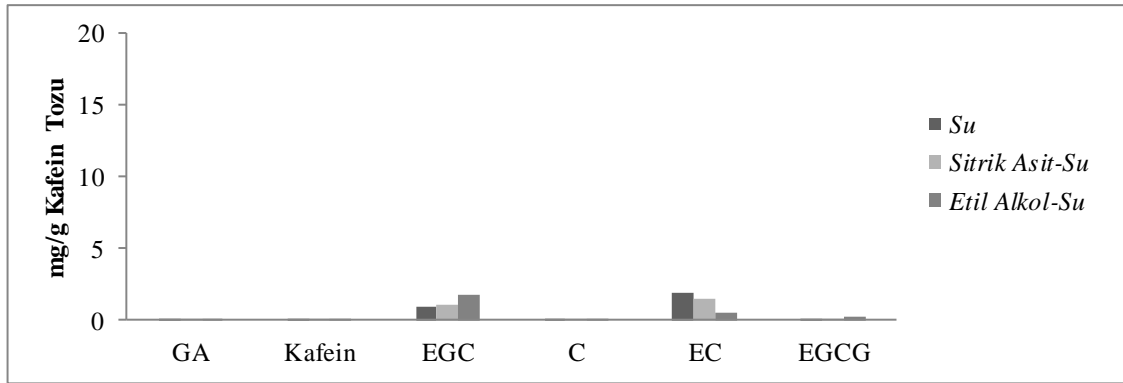
2014 örneklerinin yaş çaydan elde edilen kateşin verimleri Şekil 3.44'de verilmektedir. Birinci sürümde maksimum oranda kateşin ekstrakt verimleri elde edilmiş olup bu ekstraktın içeriği de çoğunlukla EGC'den oluşmaktadır. 1 Gram taze yaş çaydan su çözücüsüyle ekstraksiyon yapıldığında 27,86 mg EGC, etil alkol-su çözücüsüyle ekstraksiyon yapıldığında ise 33,91 mg EGC ekstre edilmektedir.

Oysaki 1 gram kurutulmuş yaş çaydan aynı çözücülerle iki katından fazla EGC ekstre edilmektedir. 2013 Sürümlerine benzer şekilde su ve etil alkol-su çözücülerini etkin bir ayırım sağlarken dondurulmuş örneklerde daha düşük kateşin içerikleri ayrılmıştır.

Şekil 3.45 ve 3.46'dan görüleceği gibi çay atığı ve kafein tozu içerikleri çok düşüktür.

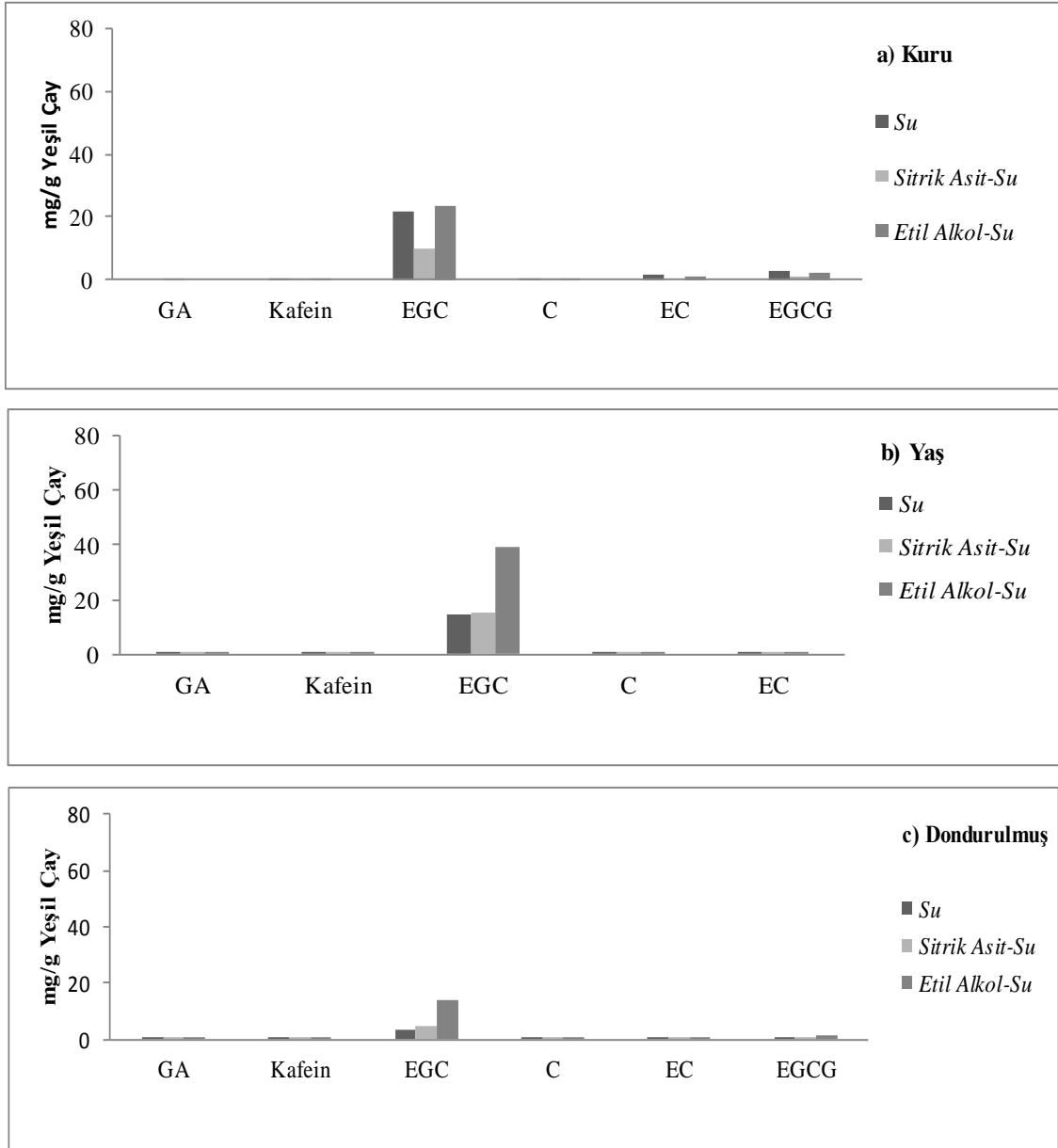


Şekil 3.45. 2014 Yılı birinci sürümde farklı çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları



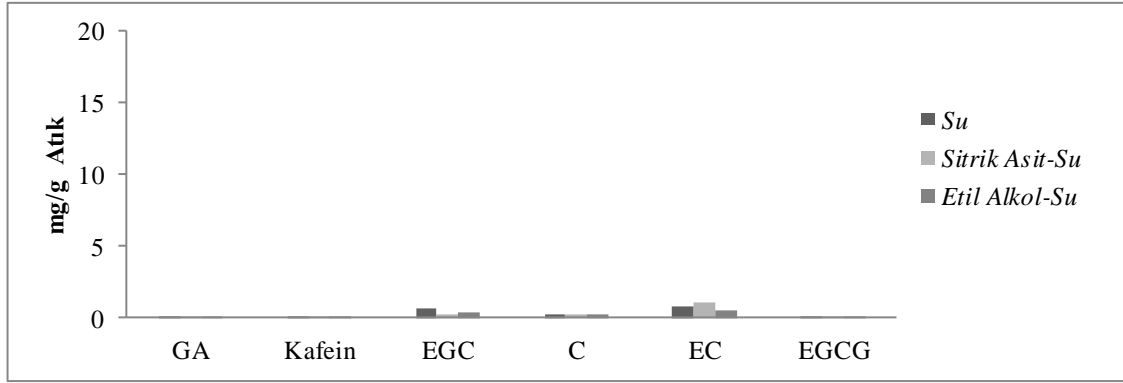
Şekil 3.46 2014 Yılı birinci sürümde farklı çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları

İkinci sürüm örneklerinin kateşin ekstrakt içerikleri Şekil 3.47-3.49'da verilmiştir.

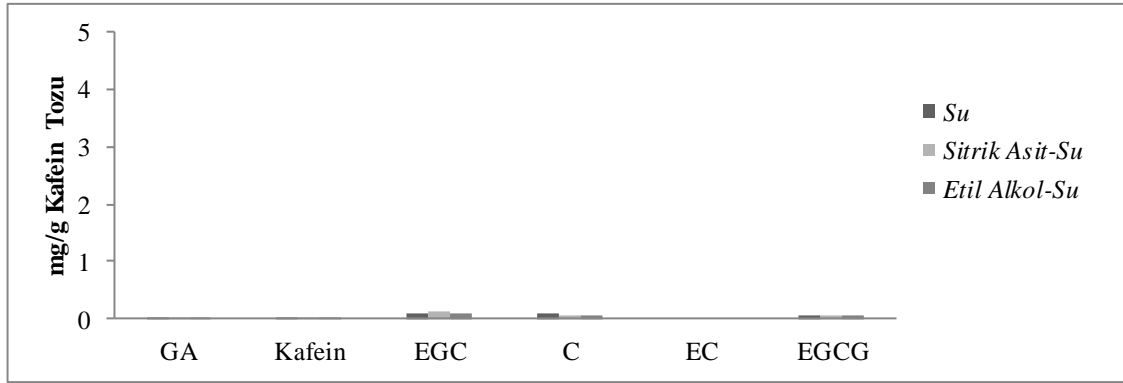


Şekil 3. 47. 2014 Yılı ikinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin farklı çözücülerle 1 g örnekten ekstre edilen kateşin miktarları

İkinci sürüm yaş çay örneklerinin yaş olarak ekstraksiyonu EGC yönünden zengin ekstrakt vermektedir. Her üç örnek tipinde de etanol-su çözücüsü ile yüksek oranda kateşin türevlerini içeren ekstrakt edilmektedir. Özellikle 1 gram yaş çay örneğinden 45,46 mg EGC ekstre edildi.



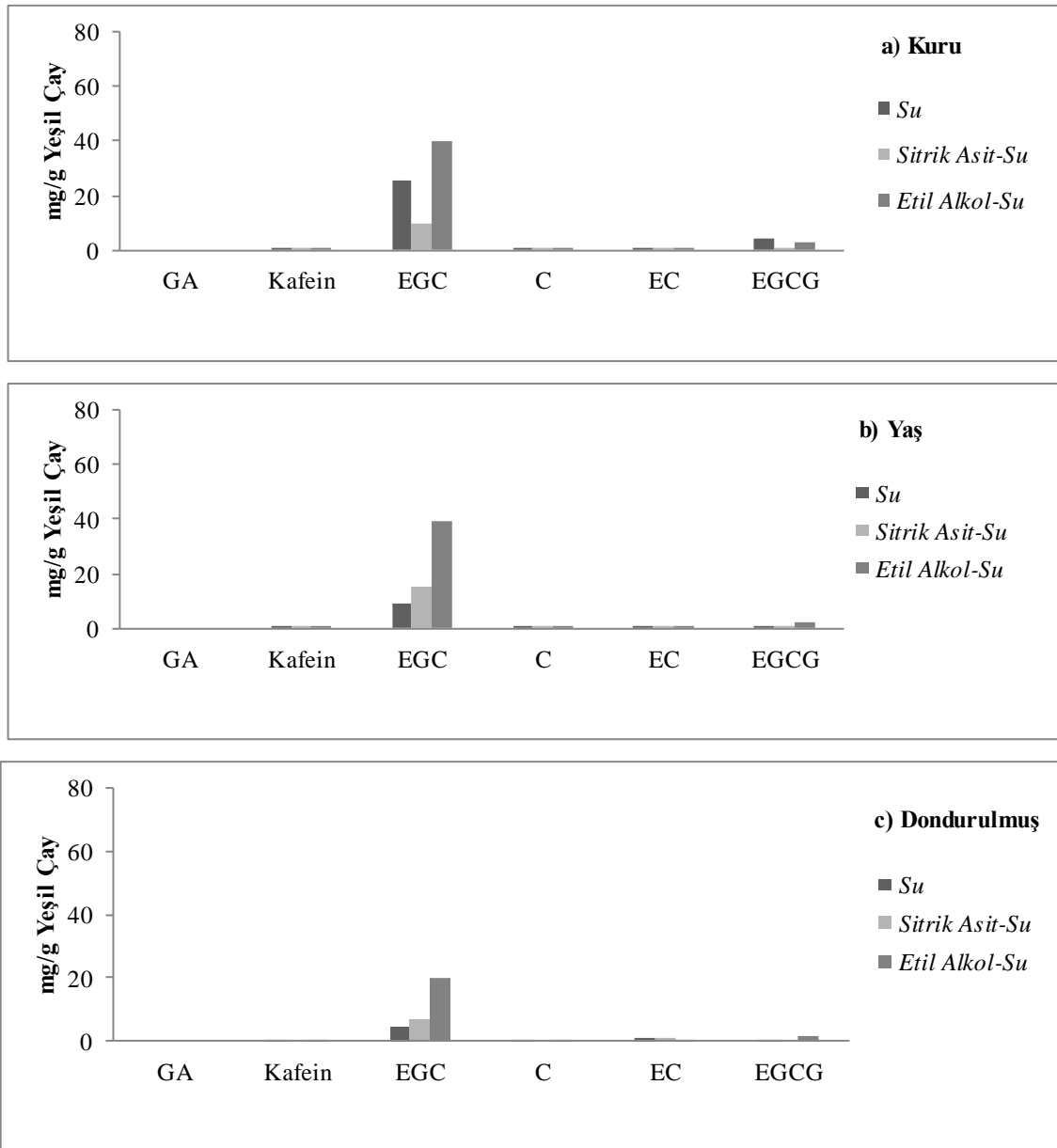
Şekil 3.48. 2014 Yılı ikinci sürümde farklı çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları



Şekil 3.49. 2014 Yılı ikinci sürümde farklı çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları

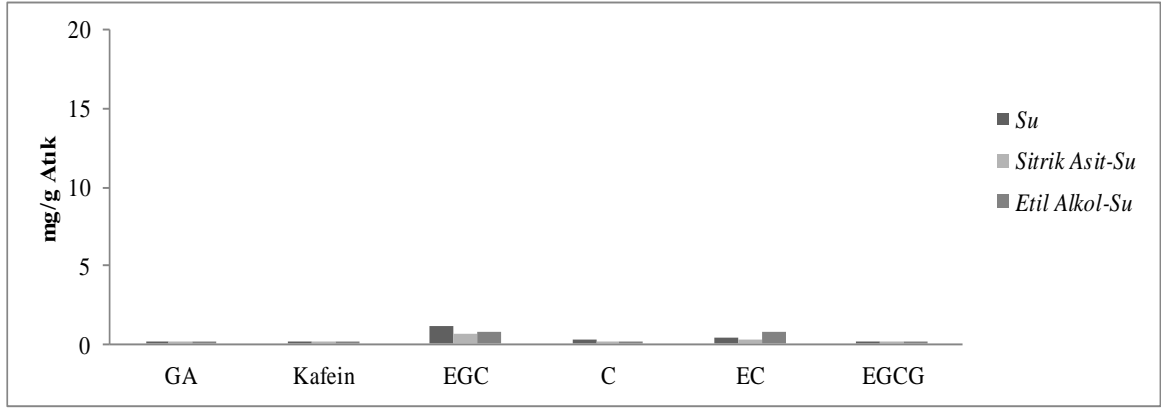
Kurutulmuş ve dondurulmuş örneklerde daha düşük EGC ve bir miktar EC ve EGCG' de belirlendi. Birinci sürüme benzer şekilde çay atığı ve kafein tozu örneklerinin kateşin içerikleri yok denecek kadar düşüktür (Şekil 3.48 ve 3.49).

Şekil 3.50'de üçüncü sürüm yaş çay örneklerinin Şekil 3.51'de çay atıklarının Şekil 3.52'de ise kafein tozu örneklerinin kateşin içerikleri verilmiştir.

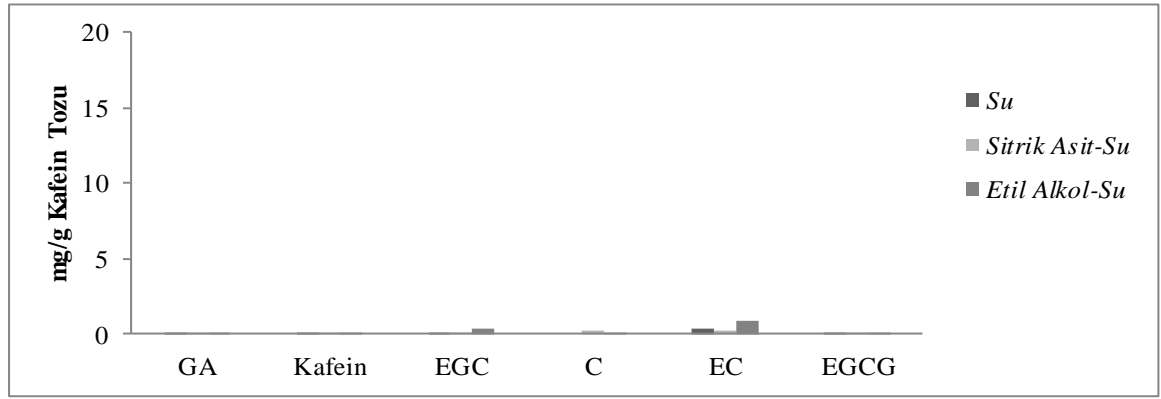


Şekil 3.50. 2014 Yılı üçüncü sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların farklı çözücülerle 1 gram örnekten ekstre edilen kateşin miktarları

Bu sürümde de 2014 yılı örneklerinin genel karakteri olarak EGC içeriği oldukça yüksek ancak EGCG ve diğer türler neredeyse yok denecek kadar azalır. Atık çay ve kafein tozu yok denecek kadar düşük oranda kateşin türevlerini içermektedir (Şekil 3.51 ve 3.52)



Şekil 3.51. 2014 Yılı üçüncü sürümde farklı çözücülerle 1 g çay atığından ekstre edilen kateşin miktarları



Şekil 3. 52. 2014 Yılı üçüncü sürümde farklı çözücülerle 1 g kafein tozundan ekstre edilen kateşin miktarları

Birinci, ikinci, üçüncü sürüm yaş çaylar, atıkları ve kafein tozlarının mikrodalga ekstraksiyonu sonucunda elde edilen kateşin ekstraktlarının HPLC analizi ile belirlenen bileşenlerinin yüzde oranları Tablo 3.5-3.7' de görülmektedir.

Tablo 3.5. 2014 Yılı yaş çay ekstraktlarının içerikleri

I. Sürüm									
İçerik (%)	Kuru			Yaş			Dondurulmuş		
	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su
GA	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
Kafein	0,01	-	0,02	-	0,01	0,01	0,01	-	0,01
EGC	6,21	1,49	6,95	2,79	1,61	3,97	0,41	0,68	1,61
C	0,10	0,05	0,04	0,01	0,04	0,06	-	0,01	-
EC	0,18	0,27	0,33	0,11	0,03	0,09	0,10	0,12	0,10
EGCG	0,10	0,15	0,48	0,28	0,10	0,25	0,06	0,04	0,21
TKİ	6,59	1,96	6,90	1,49	1,59	3,89	0,57	0,80	1,80
KE	6,60	6,20	6,90	1,50	1,60	3,90	1,40	1,40	1,90
EİTK	99,85	31,56	100	99,40	99,38	99,74	40,79	57,00	94,74
YÇETK	6,59	1,96	6,90	1,49	1,59	3,89	0,57	0,80	1,80
II. Sürüm									
İçerik (%)	Kuru			Yaş			Dondurulmuş		
	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su
GA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kafein	0,01	0,04	0,01	-	-	-	-	-	0,01
EGC	4,55	0,98	2,37	1,24	1,54	2,72	0,36	0,44	1,37
C	0,01	0,03	-	-	-	0,01	-	0,01	0,02
EC	0,18	-	0,11	0,02	0,02	0,05	0,08	0,06	0,05
EGCG	0,26	0,07	0,20	0,12	0,20	0,31	0,04	0,02	0,13
TKİ	4,44	1,08	2,48	1,39	1,56	3,08	0,48	0,53	1,57
KE	4,90	4,30	5,40	1,40	1,60	3,10	1,2	1,30	1,70
EİTK	90,67	25,21	45,91	99,29	97,63	99,36	40,00	40,62	92,53
YÇETK	4,44	1,08	2,48	1,39	1,56	3,08	0,48	0,53	1,57
III. Sürüm									
İçerik (%)	Kuru			Yaş			Dondurulmuş		
	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su
GA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kafein	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
EGC	2,17	0,98	3,55	0,89	1,28	2,56	0,44	0,72	1,32
C	-	0,04	0,01	-	-	-	0,01	0,01	0,01
EC	0,08	0,06	0,04	0,06	0,02	0,03	0,09	0,08	0,04
EGCG	0,43	0,10	0,30	0,08	0,09	0,20	0,03	0,03	0,14
TKİ	2,68	1,17	3,90	1,03	1,39	2,79	0,57	0,83	1,50
KE	2,70	2,10	3,90	1,30	1,40	2,80	1,00	1,10	1,60
EİTK	99,26	55,71	100	78,85	99,29	99,64	57,20	75,64	93,75
YÇETK	2,68	1,17	3,90	1,03	1,39	2,79	0,57	0,83	1,50

TKİ: Toplam kateşin içerik yüzdesi

KE: Kateşin ekstrakt yüzdesi

EİTK: Ekstraktın içerdiği toplam kateşin yüzdesi

YÇETK: Yeşil çay örneğinden ekstre edilen toplam kateşin yüzdesi

Tablo 3.5’de görüleceği gibi 2014 yılının yaş çay örneklerinde tüm sürümlerde taze örneklerle neredeyse tamamı kateşinlerden oluşan ekstraktlar elde edilmiştir. Kurutulmuş yaş çayların ise su ve etil alkol-su çözücülerıyla çok başarılı ekstraksiyon yapıldığı söylenebilir. Beklendiği üzere çay atığı ve kafein tozu örneklerinden içeriğinde çok çok düşük oranda kateşin türevlerini içeren ekstraktlar elde edildiği açıktır.

Tablo 3.6. 2014 Yılı çay atığı ekstraktlarının içerikleri

ATIK									
	I. SÜRÜM			II. SÜRÜM			III. SÜRÜM		
İçerik (%)	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su
GA	-	-	0,01	0,01	-	-	-	-	-
Kafein	0,01	-	-	-	-	-	-	-	0,02
EGC	0,17	0,16	0,26	0,07	0,02	0,03	0,11	0,07	0,08
C	0,03	-	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01
EC	0,15	0,13	0,02	0,08	0,11	0,05	0,04	0,04	0,08
EGCG	0,01	0,01	-	0,01	-	-	0,02	-	-
TKİ	0,36	0,30	0,32	0,18	0,16	0,10	0,20	0,14	0,17
KE	2,20	2,00	2,60	1,90	1,80	2,40	1,80	1,80	2,30
EİTK	16,41	15,10	12,23	9,63	8,89	4,17	11,06	7,89	7,22
YÇETK	0,36	0,30	0,32	0,18	0,16	0,10	0,20	0,14	0,17

Tablo 3.7. 2014 Yılı kafein tozu ekstraktlarının içerikleri

KAFEİN TOZU									
	I. SÜRÜM			II. SÜRÜM			III. SÜRÜM		
İçerik (%)	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su	Su	SA-Su	EA-Su
GA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kafein	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
EGC	0,10	0,11	0,17	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,06
C	0,01	-	-	0,01	0,01	0,01	-	-	-
EC	0,19	0,15	0,06	-	-	-	0,04	0,07	0,09
EGCG	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	-	-	-
TKİ	0,30	0,26	0,26	0,03	0,02	0,02	0,05	0,13	0,16
KE*	2,50	1,70	3,00	1,40	1,30	2,10	1,00	1,10	1,20
EİTK**	12,16	15,41	8,53	1,86	1,77	1,05	4,90	11,36	13,00
YÇETK	0,30	0,26	0,26	0,02	0,02	0,02	0,05	0,13	0,16

Atık çay ve kafein tozu örneklerinden mikrodalga ekstraksiyonu sonrası etil asetat ekstraksiyonuyla azımsanamayacak oranda kateşin ekstraktı elde edilmiş olmasına rağmen (Şekil 3.42 ve 3.43) bu ekstraktlar kateşin türevlerinden oluşmamaktadır. Bu ekstraktların

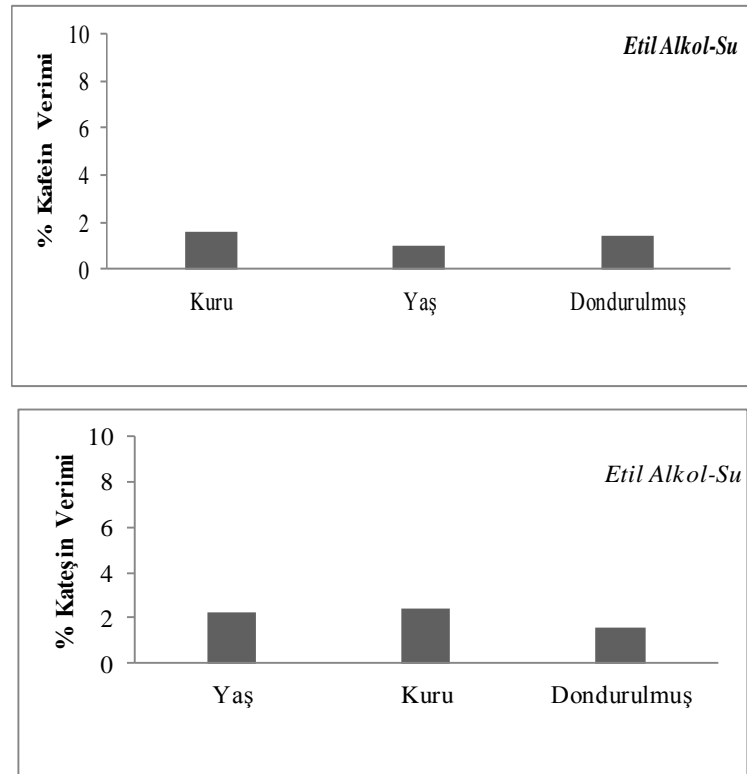
kısmen kalıntı kafeinin yanısıra kateşin dışı makro molekülleri ve çözünür sellülozik materyalleri içerdiği düşünülmektedir.

3.2. SFE Ekstraksiyonu Bulguları

Bölüm 2.5.2’de detayları verilen süperkritik akışkan ekstraksiyonuna (SFE) yöntemi 2014 yılı örneklerinin bazılarında uygulandı. Bu yöntemin özü mikrodalga ekstraksiyonuyla çay örneğinden ayrılan kafein ve kateşin ekstraktlarını ikinci bir ekstraksiyona tabi tutarak kafein ve kateşini birbirinden ayırmaktır. Bu amaçla ME’de yüksek verim sağlayan ekstraktlar SFE ile ayrılmaya çalışıldı. Tablo 3.5’den görüleceği gibi en yüksek ekstrakt verimleri I. sürüm yeşil çay örneklerinden etil alkol-su çözücüsüyle elde edilmiştir. Bu çözücü ile kuru yeşil çaydan %6,90 verimle kateşin ekstraktı ve %3,90 kafein ekstraktı elde edilmişti. Birinci sürüm yaş kuru ve dondurulmuş yaş çay örnekleri etanol-su çözücüsüyle 600 W güçde, 80 °C sıcaklıkta ve 4 dakikalık sürede ekstre edildi. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra dondurarak kurutma yoluyla suyu uçuruldu ve kalıntı SFE’ye tabi tutuldu. Önce 250 bar, 60 °C’de 3 saatlik CO₂-SFE işlemiyle kafein ayrıldı. Daha sonra 0,5 mL/dk etanol modifiyeriyle aynı şartlarda kateşinler ekstre edildi.

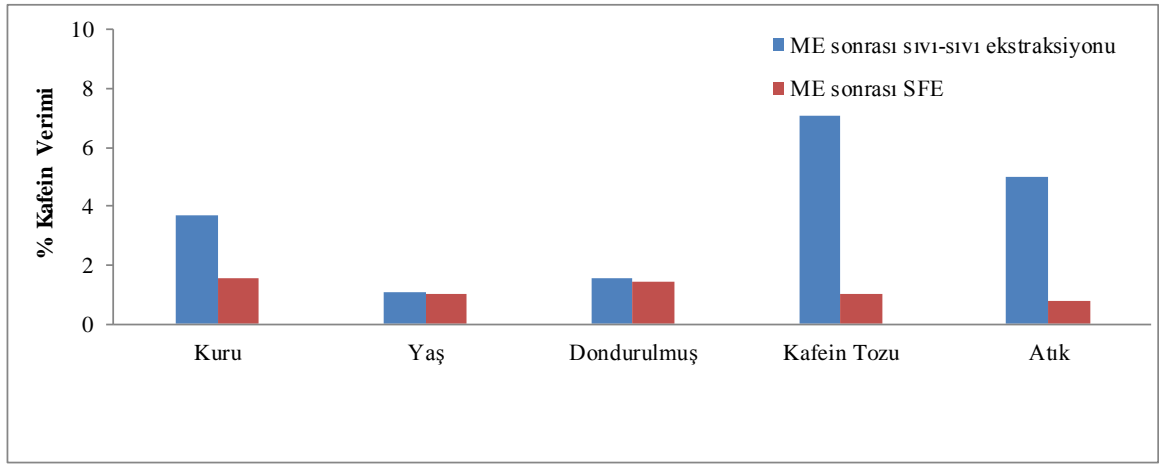
3.2.1. SFE ile Yeşil Çaydan Kafein ve Kateşinlerin Ayrımı

SFE ile ayrılan kafein ve kateşin ekstrakt verimleri Şekil 3.53’de verilmiştir. Burada mikrodalga ekstraksiyonu için etanol-su kullanılmış olup bu ekstrakt SFE ile ayrılmıştır.



Şekil 3.53. 2014 Yılı birinci sürüm kuru, yaş ve dondurulmuş yaş çay örneklerinin etil alkol-su ile ME sonrası SFE ile elde edilen ekstrakt verimleri

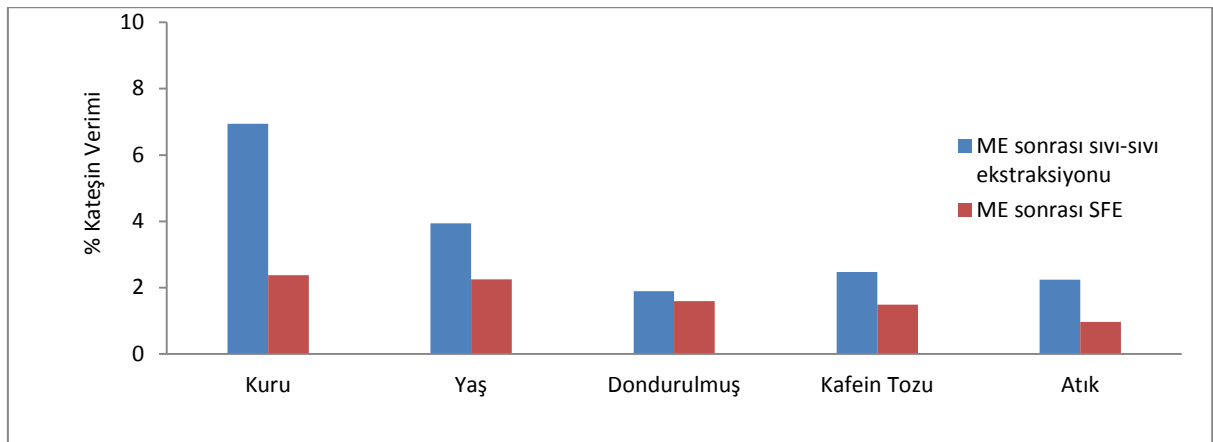
Yaş çay örneklerinden SFE ile kafeinin tamamı uzaklaştırılırken %2 oranında kateşin ayrılabilmiştir. 2014 Birinci sürüm kuru, yaş ve dondurulmuş yaş çay örneklerinin ME sonrasında kloroform ekstraksiyonunda elde edilen kafein verimleri Şekil 3.38'de görülmektedir. Kloroform ile yapılan ekstraksiyonda kuru örneklerden %3,68, yaş örneklerden %1,10 ve dondurulmuş örneklerden %1,52 verimle kafein izolasyonu yapılmıştı. Aynı yolla ME yapılan örneğin SFE ile ayrılan kafein verimleri Şekil 3.53'den görülebileceği gibi kuru, yaş, dondurulmuş yaş çay örneklerinde sırasıyla %1,56, %0,99, %1,42'dir. ME sonrası kloroform ekstraksiyonu ve SFE (Şekil 3.38 ve Şekil 3.53'de sunulan) kafein ekstrakt verimleri Şekil 3.54'de karşılaştırmalı olarak verildi.



Şekil 3.54. 2014 Yılı birinci sürüm örneklerinin ME sonrası sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve ME sonrası SFE ile elde edilen kafein verimleri

SFE ile kafeinlerin ayrılması oldukça iyi veriler sağlamıştı. Özellikle yaş ve dondurulmuş örnekler için ideal sonuçlar sunmaktadır. Bu da göstermektedir ki etanol-su çözücüsüyle 4 dakikalık süreçte yaş çay örneklerinden kafein ve kateşinler ekstre edildikten sonra bu ekstraktın kafein içeriği SFE ile başarılı bir şekilde ayrılabilir. Daha yüksek kafein içeriği olan örnekler için 3 saatlik süreci daha uzun tutarak bir optimizasyon yapılabilir.

Liyofilize edilmiş ekstraktlardan SFE ile kafeinin ayrılması oldukça başarılı olmasına karşın kateşinlerin ayrımı daha düşük oranda gerçekleştirilmiştir. Her iki yolla elde edilen (Şekil 3.41 ve Şekil 3.53’de sunulan) kateşin ekstrakt verimleri karşılaştırmalı olarak Şekil 3.55’de görülmektedir.

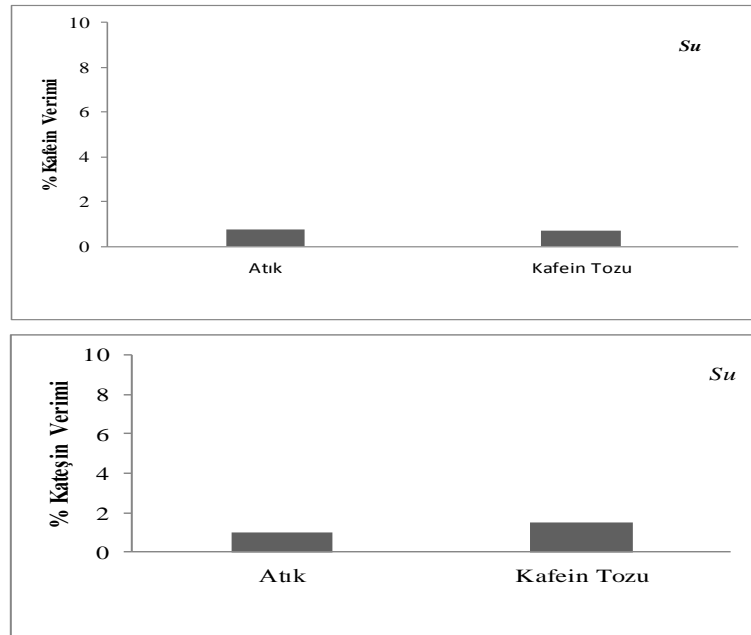


Şekil 3. 55. 2014 Yılı birinci sürüm örneklerinin ME sonrası sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve ME sonrası SFE ile elde edilen kateşin verimleri

Görüleceği üzere SFE ile yüksek oranda kateşin ekstraksiyonu verimlerine ulaşamamıştır. Bunun en önemli nedeninin modifiyerli SFE sistemi için uygulanan 3 saatlik sürecin uygun olmadığı düşünülmektedir.

3.2.2. SFE ile Atık ve Kafein Tozundan Kafein ve Kateşinlerin Ayrımı

Atık çay ve kafein tozu örnekleri önce su çözücüsü ile mikrodalga yöntemiyle ekstre edilmiş daha sonra bu ekstrakt içindeki kafein ve kateşinler SFE ile birbirinden ayrılmıştır. Atıkların seçilmesinin nedeni yüksek oranda kafein içermeleridir. Kloroform ile atık çaydan %4,50 verimle kafein ayrılırken kafein tozundan %7,10 verimle kafein elde edilmişti (Şekil 3.39 ve 3.40). 2014 Yılı birinci sürüm siyah çay atığı ve kafein tozundan ME sonrası SFE ile ayrılan kafein ve kateşinlerin % verimleri Şekil 3.56'da verilmiştir.



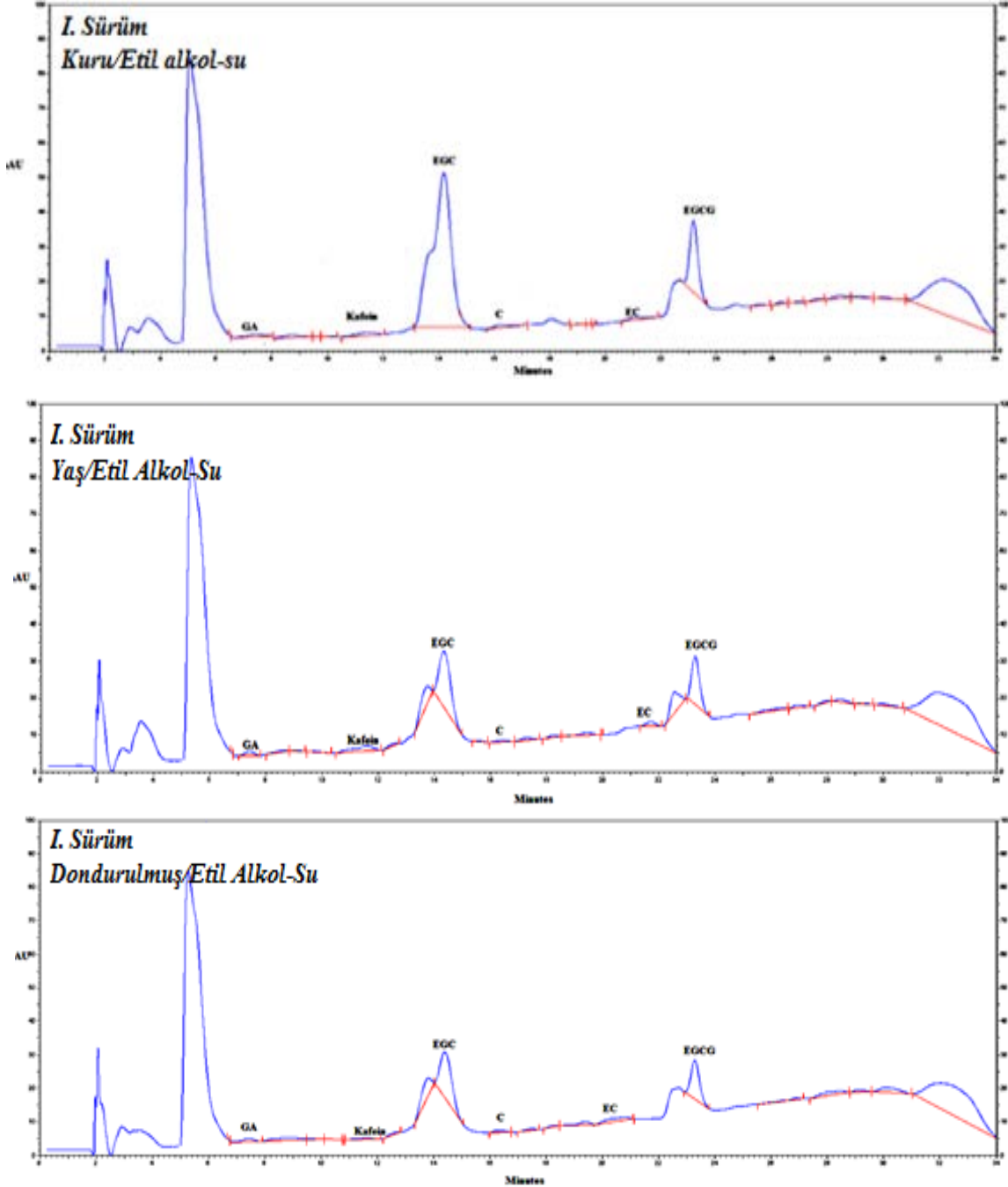
Şekil 3.56. 2014 Yılı birinci sürüm siyah çay atığı ve kafein tozu örneklerinin ME sonrası SFE ile elde edilen ekstrakt verimleri

Optimize edilmiş 250 bar, 60 °C ve 3 saatlik CO₂-SFE ile kafein ayrımı sonucunda atık ve kafein tozu ekstraktlarının kafein verimleri %1'in altındadır. Kafein oranının %2'den yüksek olduğu durumlarda kullanılan SFE şartları yeterli olmamaktadır.

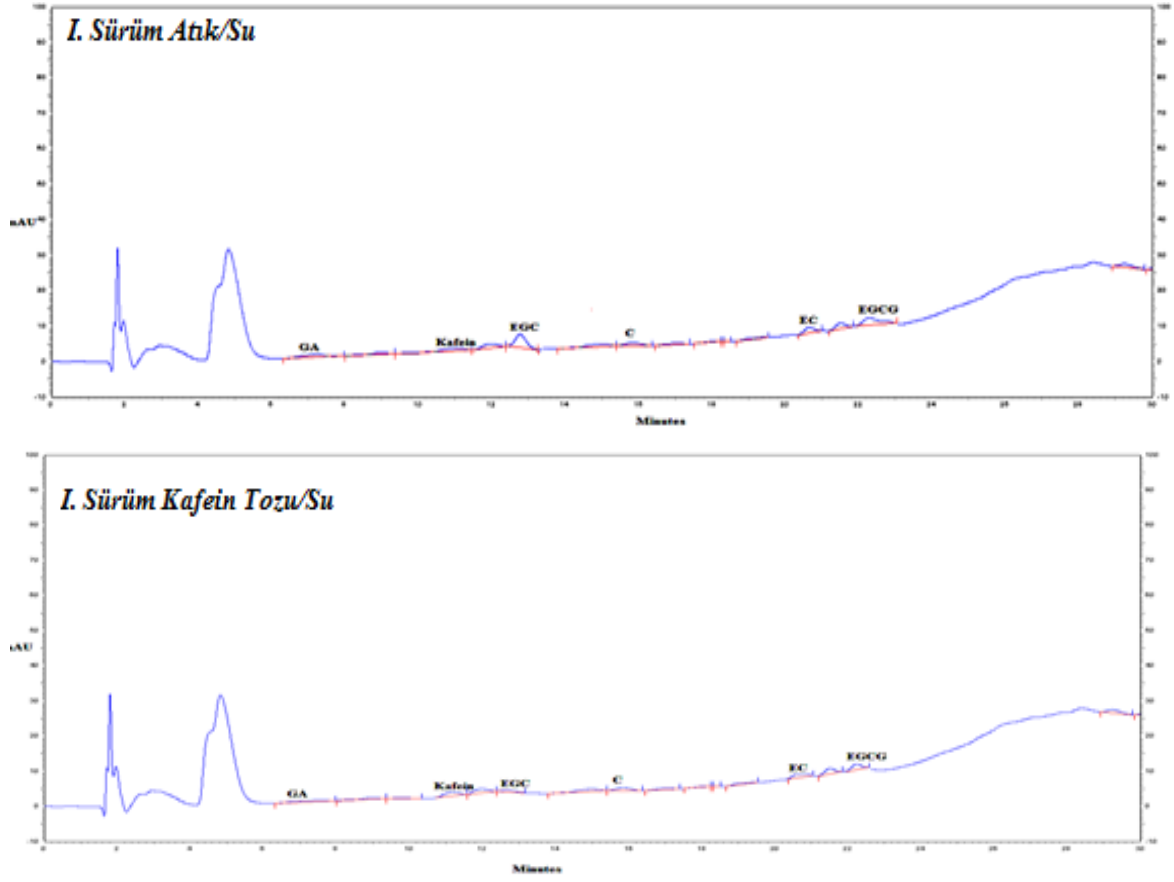
SFE ile elde edilen ve Şekil 3.56'da verilen kateşin verimleri %1,01 ve %1,56'dır. Bu veriler sıvı-sıvı ekstraksiyonuyla elde edilen verimlere yakındır.

3.2.3. SFE Ekstraktlarının HPLC Analizleri ve Katesin İçerikleri

SFE ile elde edilen ekstraktların HPLC analizleri yapılarak daha önceki bölümlerde olduğu gibi katesinlerin miktarları belirlendi. Kuru, yaş, dondurulmuş yaş çayların SFE'dan elde edilen ekstraktının HPLC kromatogramı Şekil 3.57'de, çay atığı ve kafein tozu örneklerinin HPLC kromatogramları ise Şekil 3.58'de verilmiştir.

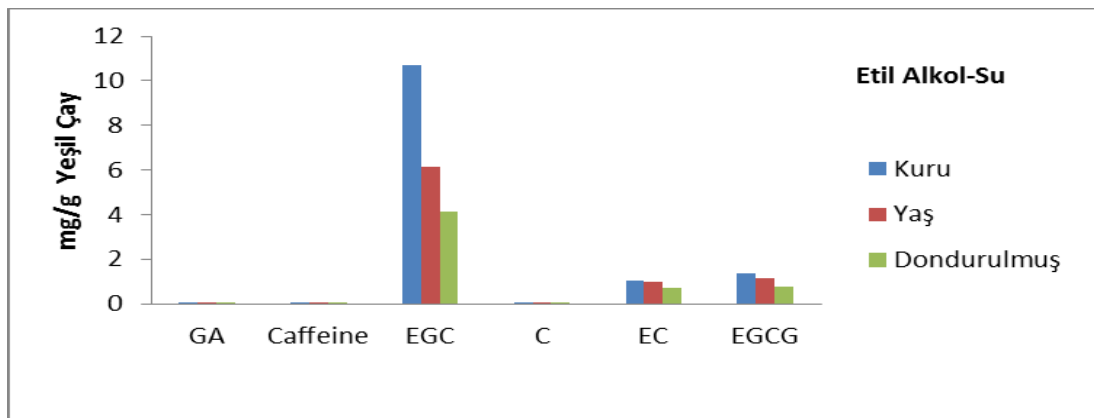


Şekil 3.57. 2014 Yılı birinci sürüm kuru, yaş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin SFE ile ayrılan katesin ekstraktlarının HPLC kromatogramları

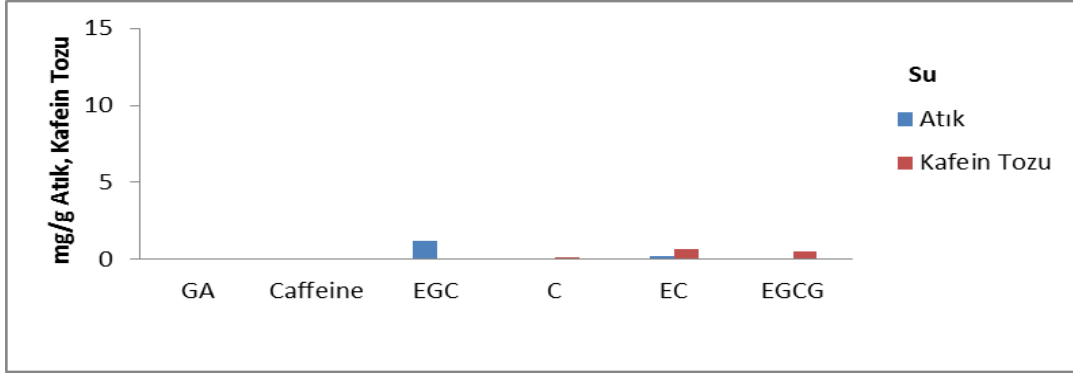


Şekil 3.58. 2014 Yılı birinci sürüm atık ve kafein tozu örneklerinin SFE ile ayrılan kateşin ekstraktlarının HPLC kromotogramları

HPLC kromatogramlarından hesaplanan kateşin içerikleri Şekil 3.59-3.60'da verilmiştir.



Şekil 3.59. 2014 Yılı birinci sürüm yaş çay örneklerinin SFE ile kateşin bileşenlerin miktarları



Şekil 3.60. 2014 Yılı birinci sürüm atık ve kafein tozu örneklerinin SFE ile kateşin bileşenlerin miktarları

2014 Yılı birinci sürümün EGC, EGCG, EC ekstrakte edilmiştir. Kuru, yaş, dondurulmuş yaş çaylarda sırasıyla 10,71 mg, 6,16 mg, 4,16 mg EGC mevcuttur. EGCG ve EC miktarları birbirine yakın iken en az miktarda C bulunmuştur. Birinci sürümün çay atığı ve kafein tozu örneklerine yapılan SFE sonrası HPLC analizinde eser düzeyde EGC ve EC belirlenmiştir.

3.2.4. SFE Genel Değerlendirme

SFE ile ayrılan kateşin ekstraktlarının içerdiği toplam kateşin yüzdelerini ve örnekten ekstre edilebilen kateşin yüzdelerini gösteren veriler Tablo 3.8' de verilmiştir.

Tablo 3.8. 2014 yılı örneklerinin SFE ile elde edilen ekstraktların içerikleri

I. Sürüm	Etil Alkol-Su			Su		
	(%)	Yaş	Kuru	Dond	Atık	K.Tozu
	GA	-	-	-	-	-
Kafein	0,01	0,01	-	-	-	
EGC	0,62	1,07	0,42	0,12	0,01	
C	0,01	-	0,01	-	0,01	
EC	0,10	0,11	0,07	0,02	0,07	
EGCG	0,12	0,14	0,08	-	0,06	
TKİ	0,84	1,32	0,57	0,15	0,14	
KE*	2,25	2,38	1,60	0,97	1,48	
EİTK**	37,32	55,35	35,76	15,01	9,64	
YÇETK	0,84	1,32	0,57	0,15	0,14	

* 10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

** Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

SFE sonrası HPLC içerikleri incelendiğinde toplam kateşin yüzdesi kuru ve yaş örneklerinde birbirine yakın değerlerde olup kuru yaş çaydan %2,38 kateşin ekstraktı elde edilmiş ve bunun %55,35'ini kateşinler oluşturmaktadır. İçerik bakımından da istenen hedefe ulaşılamadığı açıktır. Yöntem üzerinde daha fazla çalışma yapmak gerekmektedir.

4. TARTIŞMA

4.1. Mikrodalga Ekstraksiyon Yönteminin Seçilmesi

Bu tez bir SAN-TEZ projesi kapsamında gerçekleştirildiğinden endüstriye yönelik uygulama hedeflerini taşımaktadır. Mikrodalga ekstraksiyonu kısa ekstraksiyon süresi, enerji tasarrufu ve çevresel etkileri yönünden iyi bir alternatif yöntemdir. Li vd., (2010) tarafından Çin yeşil çaylarıyla yapılan çalışmada 600 W gücünde bir mikrodalga ekstraktöründe 3 dakika süre ile 1:20 (g/mL) oranındaki çay örnekleri su çözücüsüne ekstre edilmiştir. En yüksek ekstraksiyon veriminin yaklaşık %15 olduğu ve ekstraktın EGCG içerdiği rapor edilmiştir. Pan vd., (2003) yeşil çay yapraklarından kafein ve polifenollerin mikrodalga ekstraksiyonunda aseton, metanol, etanol, su çözücülerini değişik derişimlerde kullanarak farklı çözücü etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada ön bir bekletme işlemiyle daha iyi verimler elde edildiği rapor edilmektedir.

Literatür verileri doğrultusunda yapılan bir seri deneysel çalışma sonucunda en yüksek verimleri sağlayan mikrodalga ekstraksiyon şartları belirlendi. Bu amaçla ön bir bekletme süresi sonrasında 600 W güçte çalışan kapalı bir sistemde 80 °C sıcaklığı geçmeden 4 dakikalık süreçlerde ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Çözücü etkilerini araştırmak amacıyla su, sitrik asit-su, ve etanol-su çözücülerini kullanarak ekstraksiyonlar gerçekleştirildi. Kafein ve kateşinlerin ekstraksiyonunda yaş çay örnekleri 2013 ve 2014 yılı çay toplama sürümlerinden alınarak yıllar arasında ve sürümler arasındaki değişimler izlenmeye çalışıldı. Sadece yaş çay örnekleri değil aynı örnekleme dönemlerinde alınan siyah atık çay ve kafein tozu örnekleride çalışıldı.

4.2. Kromatografik Analizler

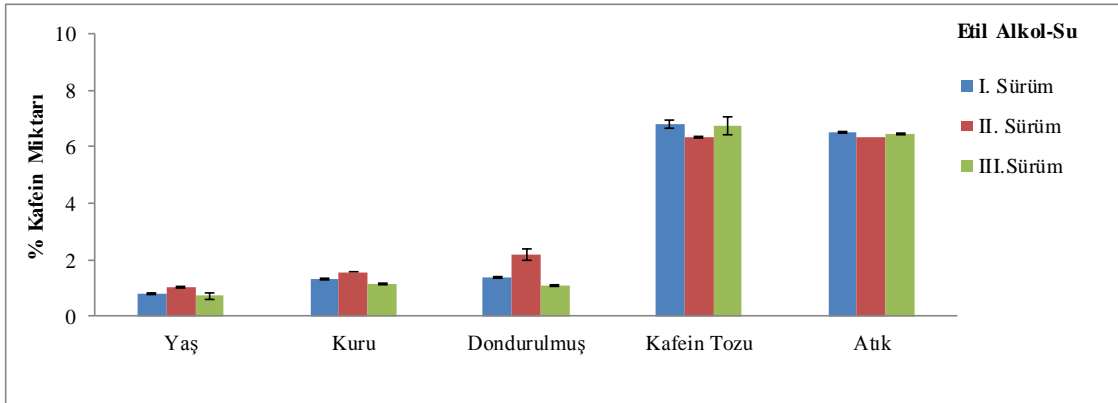
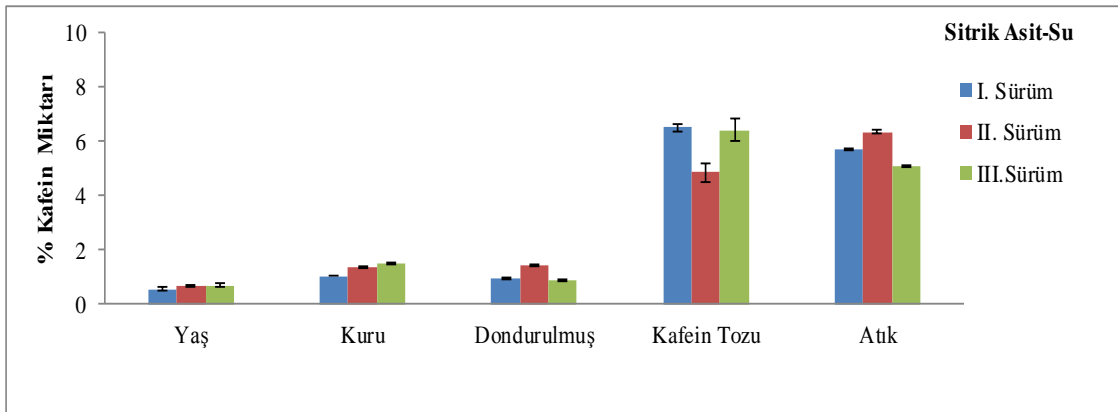
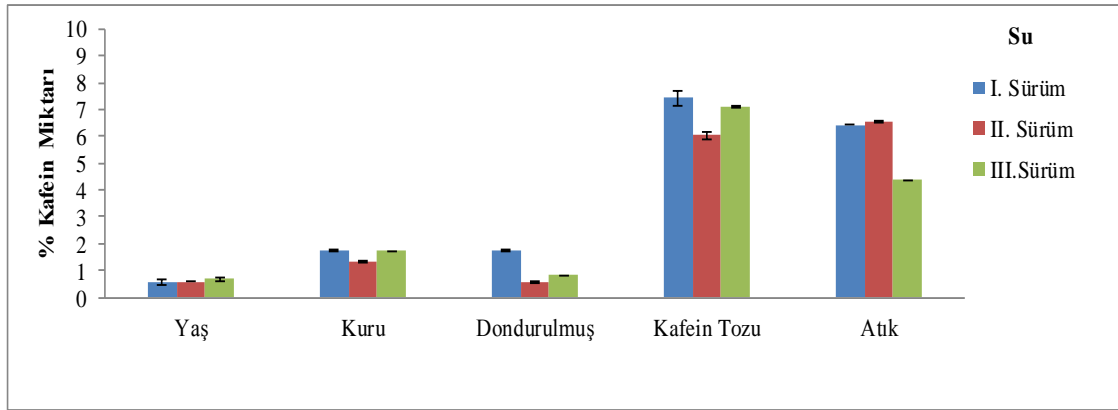
Uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ekstraktların kateşin içeriklerini nitel olarak belirlemek amacıyla Bölüm 3.1.1.2' de anlatılan TLC analizleri yapılmıştır. Bu analizlerden yararlanarak ileri analizlere geçmeden kabaca ekstraktın etkinliği belirlenebildi. Elde edilen kromatogramlar 3.7 ve 3.11'de verilmiştir. Tüm kateşin türevleri net olarak belirlenebilmektedir. TLC analizlerinde yaygın olarak kullanılan silikajel tabaka yerine poliamid sabit fazlı bir tabaka kullanıldı.

Ekstraktların içerik analizlerini gerçekleştirmek için önce yöntem optimizasyonu yapılmıştır. Standart fenolik bileşiklerin kromatogramı Şekil 3.18'de görülmektedir. Gradyentli yöntem 34 dakika içinde tüm analitlerin ayrılması sağlandı. Düşük derişimlerde alikonma zamanlarının ve pik alanının tekrarlanabilirliği kabul edilebilir değerlerde bulundu (Tablo 3.1). Ayrıca standartların kalibrasyonlarından doğrusal cevaplar ($R^2=0,99$) elde edildi. Tüm standartlar için BS değerleri 0,11 mg/L' nin ve ÖS değeri ise 0,31 mg/L' nin altında bulunmuştur ki bu değerler bitki materyallerinde fenolik bileşiklerin belirlenmesi için yeterlidir. Çalışılan tüm örneklerin kateşin ekstraktlarının içerikleri belirlenerek straksiyonun etkinliğini gösteren önemli veriler elde edildi. Tablo 3.2 ve 3.8'de sunulan verilerde ekstraktların saflığı ve ne oranda kateşin türevi içerdiği net olarak görülmektedir.

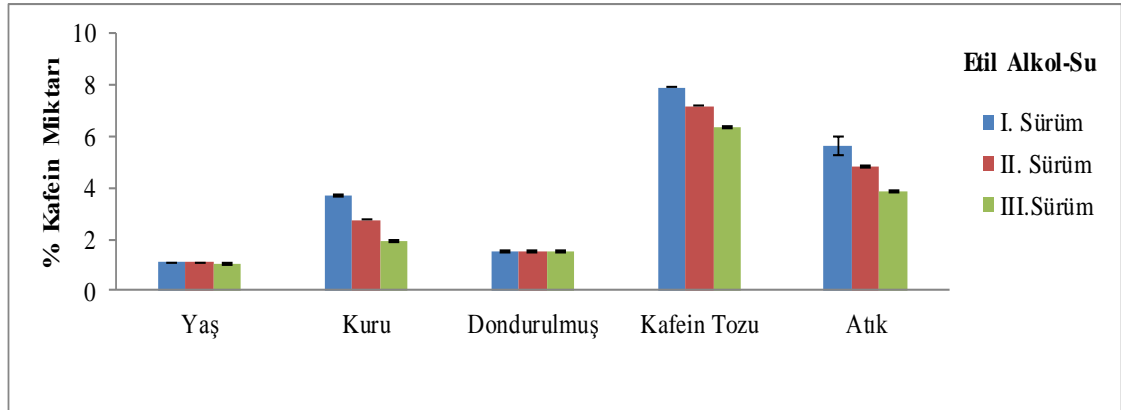
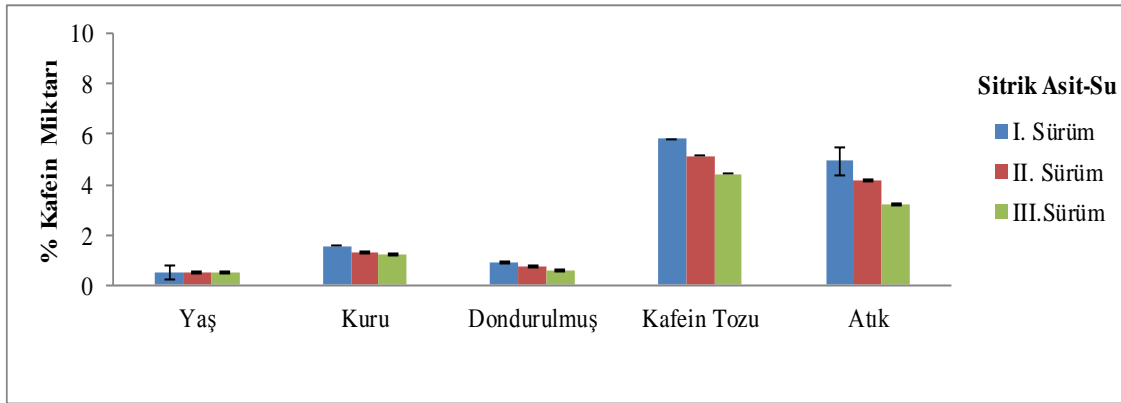
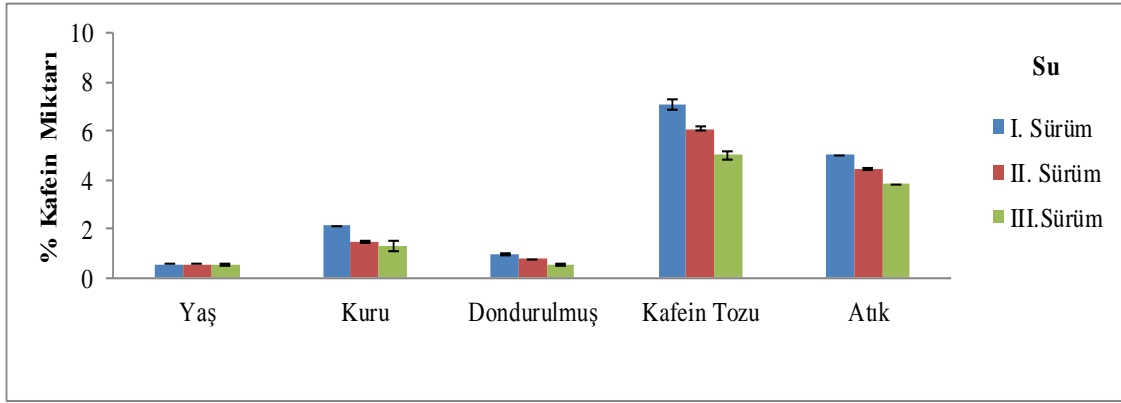
4.3. Çay Örneklerinin Yıllara ve Sürümlere Göre Mikrodalga Ekstraksiyon Verilerinin Değerlendirilmesi

İzleme çalışması yapılan 2013 ve 2014 örneklerinin içerik karşılaştırmaları yıllar arası değişimleri gösterecektir. Bu karşılaştırmayı sağlayan veriler Bölüm 3.1.1.4 ve 3.1.2.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

2013 örneklemede elde edilen veriler 2014 yılı örnekleriyle içerik bakımından farklılıklar sergilemiştir. Ancak her iki yıl örneklerinde de genel eğilim I. Sürümden III. Sürüme doğru azaldığı şeklindedir. Yıllar arası farkların iklim şartlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Dünya literatüründe genellikle Çin çaylarıyla yapılan çalışmalarda ortalama olarak %2-4 aralığında kafein bulunduğu belirtilmiştir. Ülkemizde yetiştirilen çayda da ortalama değerlere yakın kafein içeriği belirlendi. Ancak kateşin bileşiklerinin ayrılması ve ekstrakt verimleri açısından genel bir değerlendirme yapılırsa Türk yaş çay örnekleri %1-6 oranında kateşin içermektedir. Bu oran Çin çayı için rapor edilenlerin çok altındadır. Mikrodalga yöntemiyle daha kısa sürede ekstraksiyon yapılabilir ve elde edilen verimler geleneksel yöntemlerle elde edilenlere benzerdir. Net bir değerlendirme yapmak amacıyla 2013 yılı tüm örneklerden elde edilen kafein verimleri Şekil 4.1'de, 2014 verimleri ise Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1. 2013 Yılı örneklerinin farklı çözücülerdeki mikrodalga ekstraksiyonu kafein verimleri



Şekil 4.2. 2014 Yılı örneklerinin farklı çözücülerdeki mikrodalga ekstraksiyonu kafein verimleri

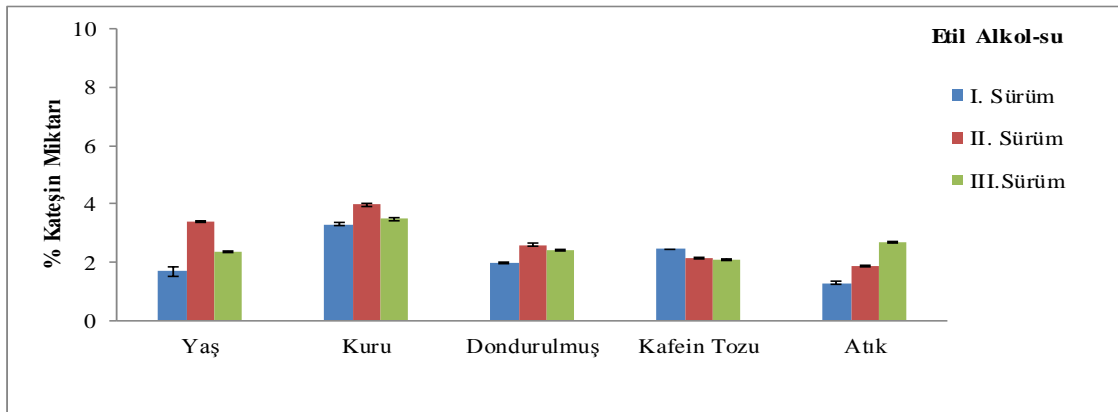
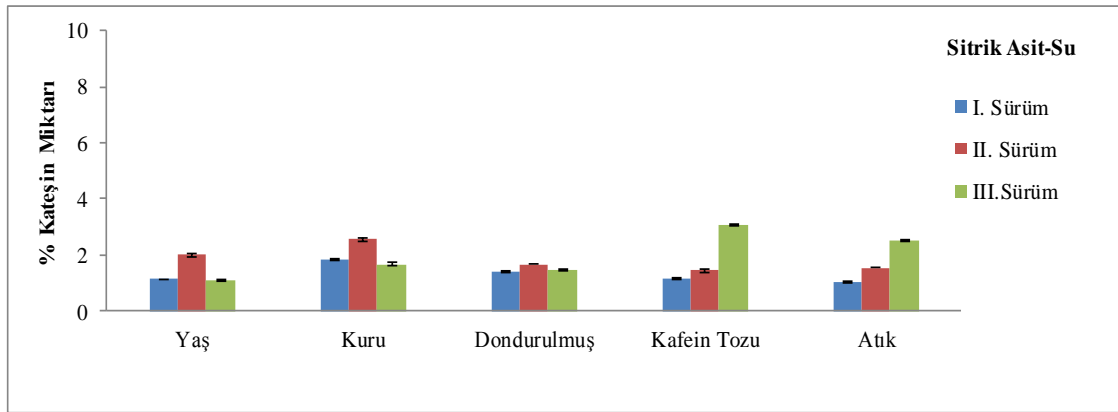
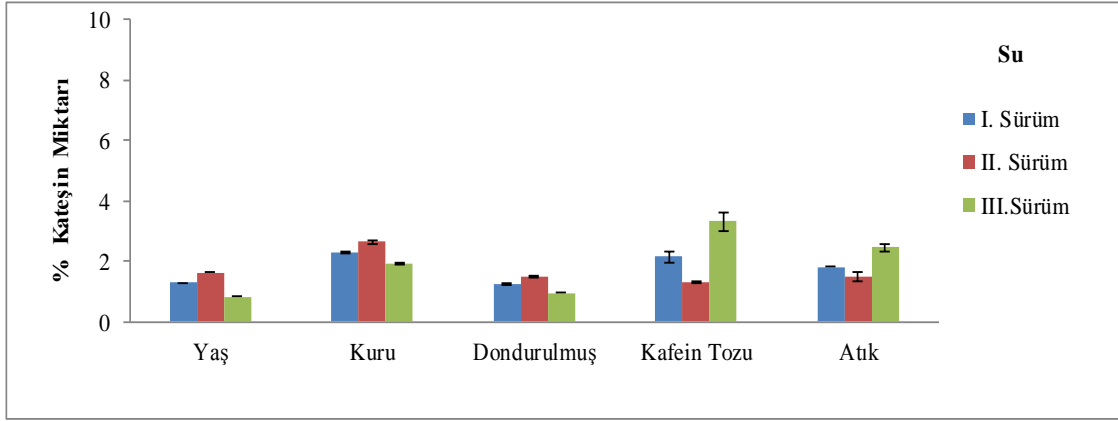
Bu verilerden şu sonuçlar çıkarılabilir:

- 1) Yaş çay örneklerinde kafein oranı %0,54-%2,18 aralığında değişmekte olup düşük kafein içerikli çaylar sınıfında değerlendirilebilir. Endüstriyel anlamda kafein izolasyonu için iyi kaynak değildir.
- 2) Yaş çayın kuru olarak ekstre edilmesi yaş ve dondurulmuş çaylardan daha yüksek kafein verimi sağlamıştır.

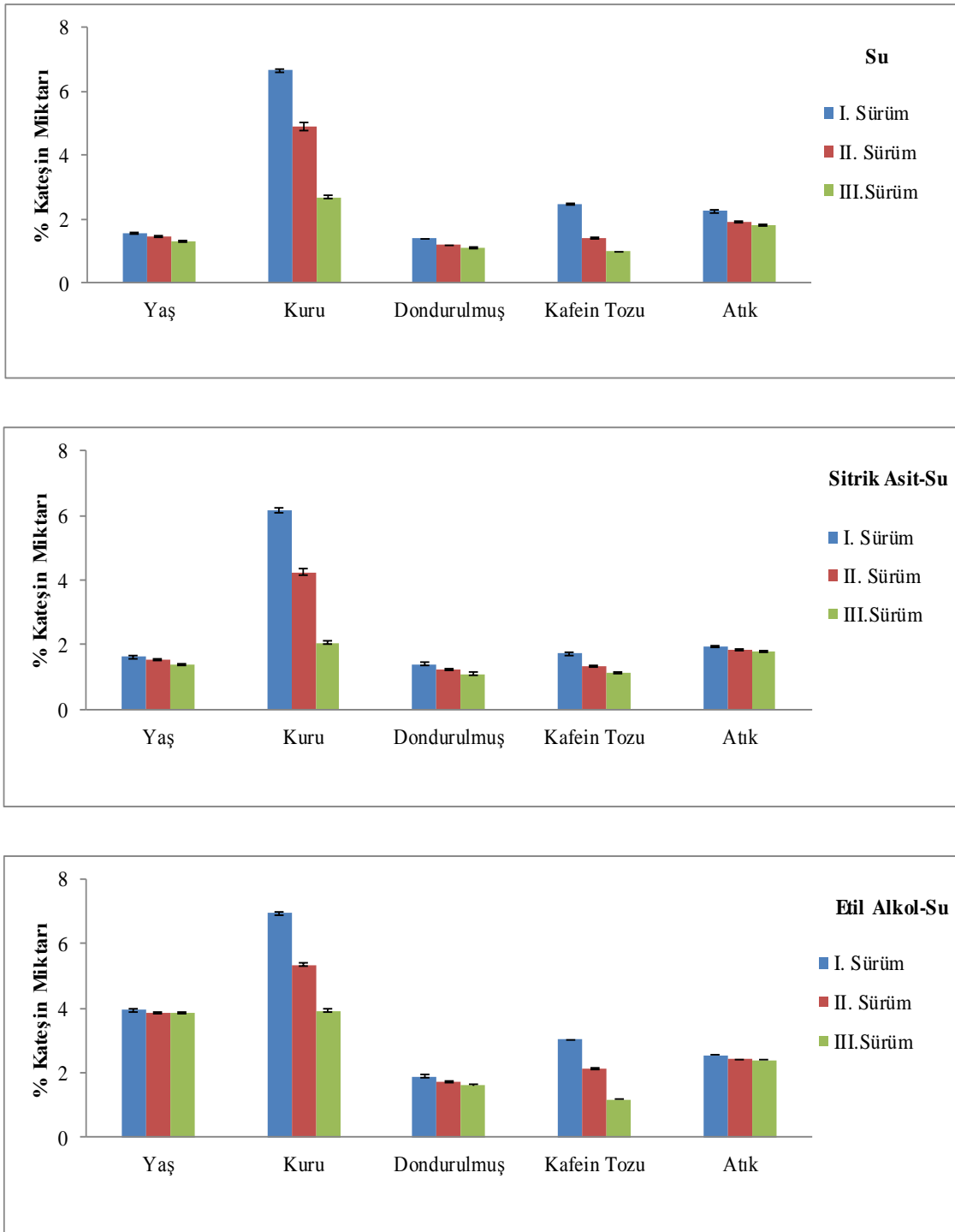
- 3) Atık çay ve kafein tozu hem 2013 hem de 2014 örneklemelerinde normalin çok üzerinde kafein verimi sağlamıştır. 2013 örneklerinde %6,5-%7,42 arasında kafein verimleri elde edilirken 2014 yılında bu değerler %5,82-%7,01 aralığındadır. Bu yönüyle değerlendirildiğinde çay atıkları çok değerli bir kafein kaynağı olarak görülmektedir.
- 4) Yaş çay ve atıklardan mikrodalga ekstraksiyonuyla kafeinlerin ayrılmasında çözücüler arasında önemli fark gözlemlenmedi.
- 5) 2013 yılı örneklerinde kafein verimleri açısından sürümler arasında ciddi farklılıklar gözlemlenmezken 2014 yılı örneklerinde I. sürümden III. sürüme doğru azaldığı belirlendi (Şekil 4.2).

Mikrodalga ekstraksiyonu ile kateşin verimlerinde oldukça dikkate değer veriler elde edilmiştir. Mikrodalga ile elde edilen sulu ekstraktın kloroform ekstraksiyonu oldukça saf kafein ayırdığından seçici olarak kafein ayrımı yapılmıştır. Oysaki kateşinleri ayırmak için kullanılan etil asetat seçici olmayıp beraberinde diğer bazı kimyasalları da ayırabilmektedir. Bu nedenle mikrodalga ekstraksiyonunda kullanılan çözücü ortamı katı örnekten kateşinleri ayırmada çok daha önemli hale gelmektedir.

Benzer bir yaklaşımla su, sitrik asit-su ve etanol-su çözücülerıyla yapılan kateşin ekstraksiyon verimlerinde karşılaştırılabilir. 2013 Yılı örneklerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirmesi Şekil 4.3'de 2014 değerlendirmesi ise Şekil 4.4'de görülmektedir.



Şekil 4.3. 2013 Yılı örneklerinin farklı çözücülerdeki mikrodalga ekstraksiyon kateşin verimleri



Şekil 4.4. 2014 Yılı örneklerinin farklı çözücülerdeki mikrodalga ekstraksiyon kateşin verimleri

Bu verilerden şu önemli sonuçlar çıkarılabilir:

- 1) Kateşin ekstrakt verimleri yıllar arasında ve sürümler arasında farklılıklar sergilemektedir. 2014 Yılı örneklerinden daha yüksek ekstrakt verimleri elde edilmiştir. Dolayısıyla kateşinlerin üretimi iklim şartlarıyla ilişkilidir.

- 2) Sürümler arasında da net bir eğilim yoktur. Örneğin 2013 yılı örneklerinde özellikle yaş çay örneklerinde II. sürümde yüksek kateşin verimleri elde edilirken 2014 yılında I. sürüm örneklerinden elde edilmiştir. Bu değişiminde iklim şartlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- 3) Şekil 4.3 verilerine göre en yüksek ekstrakt verimleri etil alkol-su çözücüsüyle elde edilmektedir. Çözücü ortamında etanol bulunması katı materyalden çözücü ortamına ekstre edilen madde miktarını artırmaktadır. Aynı eğilim 2014 örnekleri içinde gözlemlendi (Şekil 4.4).
- 4) Yaş çay örneklerinin yaş (taze) ve kuru olarak işlenmesinde daha yüksek ekstrakt verimleri elde edilmiştir. Ancak dondurulmuş örneklerden tüm çalışmalarda daha düşük kateşin verimleri elde edildi. Yeşil çay örneği parçalayıcıdan geçirilerek - 20 °C’de saklanarak belli bir süreçten sonra ME’na tabi tutulmuştur. Bu süreçte enzimatik tepkimeler devam etmiş olabilir. Bunun bir sonucu olarak kateşinlerin miktarı azalabilir. Bu etkiyle ilgili herhangi bir literatür verisine rastlanmamıştır.
- 5) Kafein tozu ve atık örneklerinden de önemli oranda kateşin ekstre edildiğini gösteren veriler yine Şekil 4.3 ve 4.4’de görülebilir. Ancak ekstraktların HPLC analizleriyle bulunan içerik analizleri % verim değerlerinin başarısını temsil etmediğini göstermektedir. Bölüm 3.1’ de sunulan Tablo 3.3- 3.4 ve Tablo 3.6- 3.7 verileri ekstrakt içeriklerinin tamamen kateşinlerden oluşamayabileceğini net olarak göstermektedir.

4.4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE) Yönteminin Optimizasyonu

Çaydan kafein ve kateşin gibi bileşenlerin ekstraksiyonu için aseton, metanol, asetonitril, kloroform, etil asetat gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Özellikle kafeinsiz çay elde etmek amacıyla sıvı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılan kloroform oldukça toksik özellikte bir organik çözücüdür. Bu çözücülerin kalıntıları insan sağlığı açısından oldukça tehlikelidir ki Amerika Kanser Araştırmaları Enstitüsü bu çözücülerin ekstraksiyonlarda kullanımını yasaklamıştır (Park vd., 2007). Bilim adamları bu gerekçelerden yola çıkarak alternatif ve oldukça önemli bir ekstraksiyon yöntemi olan ve çözücü olarak CO₂’in kullanıldığı süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemini (SFE) önermektedir. Bu yöntemin birçok avantajı vardır. Oldukça önemli özelliklerinin yanında tek dezavantajı oldukça apolar olması sebebiyle yalnızca hidrokarbonlar ve uçucu yağlar

gibi bileşenleri ortamdan uzaklaştırabilmesidir. Bu dezavantajı ortadan kaldırabilmek amacıyla ortama polariteyi artırıcı ilave çözücüler (su, etanol gibi) eklenerek polar karakterli diğer bileşenlerin de izolasyonları sağlanır (Huang vd., 2007; Park vd., 2007). Modifiyerli CO₂ ekstraksiyonu olarak adlandırılan bu sistemde ilave çözücüler bileşenler ile hidrojen bağı gibi güçlü bağlar kurarlar. Seçimli ekstraksiyon yapabilmek amacıyla izolasyonu istenen bileşenin yapısına uygun ilave çözücüler seçilmelidir. Örneğin, kateşinlerin SFE ile izolasyonu için ilave çözücü olarak etanolün kullanılması kateşinlerin hidroksil grubu ve etanolün hidrojeni arasında güçlü bir hidrojen bağı kurulmasıyla izolasyonlarını kolaylaştırır (Ghoreishi ve Heidari, 2012).

Bölüm 2’de detayları tartışılan ve yöntem ayrıntıları verilen ME sonrası SFE yöntemiyle kafein ve kateşinlerin birbirinden ayrımı sağlanmıştır. Yaş çaydan kafeinlerin izolasyonu için yapılan SFE optimizasyonunda en yüksek kafein veriminin elde edildiği 250 bar basınç, 60 °C sıcaklık ve 3 saat modifiyersiz SFE yöntemi ve kateşinlerin izolasyonu için en yüksek kateşin veriminin elde edildiği 250 bar basınç, 60 °C sıcaklık, 0,5 mL etanol hacmi ve 3 saat modifiyerli SFE yöntemi kullanıldı.

Tüm çalışma verilerinde en yüksek kafein verimi sağlayan 2014 yılı çay atığı ve kafein tozu örnekleri önce su çözücüsüyle ME’ na tabi tutuldu. Elde edilen ekstraktan CO₂-SFE sistemiyle önce kafeini daha sonrada modifiyerli (etanol, 0,5 mL/dk) sistemle de kateşinler ayrıldı (Şekil 3.56).

Benzer bir çalışma da kateşin verimleri yüksek olan 2014 yılı I. sürüm yaş çay örnekleri ile gerçekleştirildi. Yaş, kuru ve dondurulmuş yaş çay örnekleri etanol-su çözücüsüyle ME’na tabi tutuldu. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra sulu ekstrakt liyofilizasyonla kurutularak SFE sistemine uygulandı. Yukarıda belirtilen şartlarda önce kafein daha sonra da modifiyerli sistemle kateşinler ayrıldı. Ayrılan ekstraktların verimleri Şekil 3.53’ de belirtilmiştir.

Kullanılan yöntem yaş çay örnekleri için optimize edildiğinden kafein ve kateşince yüksek içeriğe sahip ekstraktlardan ayırma yapmak için yeni bir optimizasyon gerekmektedir. Süreç daha uzun tutularak daha başarılı ayırım gerçekleştirilebilir. Bu optimizasyon çalışmalarına devam edilecektir.

Diğer taraftan şunu da unutmamak gerekir ki ME ile içeriği tamamen kafein ve kateşinlerden oluşan bir ekstraksiyon yapılmış ise kafeinin SFE ile ayrılması sonrasında kalan materyal tamamen kateşinlerden oluşacaktır. Dolayısıyla kafein ve kateşinlerin

birbirinden ayrılmasında herhangi bir organik çözücü kullanılmayacağından tüm işlem bir “yeşil ekstraksiyon” yöntemi olarak kabul edilebilir.

5. SONUÇLAR

-)} Yaş çayın kuru olarak ekstre edilmesi yaş ve dondurulmuş çaylardan daha yüksek kafein verimi sağlandı.
-)} Atık çay ve kafein tozu hem 2013 hem de 2014 örneklemelerinde normalin çok üzerinde kafein verimi sağlandı. Bu yönüyle değerlendirildiğinde çay atıkları çok değerli bir kafein kaynağı olarak görülmektedir.
-)} Yaş çay ve atıklardan mikrodalga ekstraksiyonuyla kafeinlerin ayrılmasında çözücüler arasında önemli fark gözlemlenmedi.
-)} 2013 yılı örneklerinde kafein verimleri açısından sürümler arasında ciddi farklılıklar gözlemlenmezken 2014 yılı örneklerinde I. sürümden III. sürüme doğru azaldığı belirlendi.
-)} Yaş çayın kuru olarak ekstre edilmesi yaş ve dondurulmuş çaylardan daha yüksek kafein verimi sağlamıştır.
-)} Atık çay ve kafein tozu hem 2013 hem de 2014 örneklemelerinde normalin çok üzerinde kafein verimi sağlamıştır. Bu yönüyle değerlendirildiğinde çay atıkları çok değerli bir kafein kaynağı olarak görülmektedir.
-)} Yaş çay ve atıklardan mikrodalga ekstraksiyonuyla kafeinlerin ayrılmasında çözücüler arasında önemli fark gözlemlenmedi.
-)} 2013 yılı örneklerinde kafein verimleri açısından sürümler arasında ciddi farklılıklar gözlemlenmezken 2014 yılı örneklerinde I. sürümden III. sürüme doğru azaldığı belirlendi.

6. KAYNAKLAR

- Aguilera, J.M., 2003. Solid–liquid extraction, In: Tzia C, Liadakis G (eds) Extraction optimization in food engineering, Dekker, New York, 35–55.
- Alfaro, M.J., Belanger, J.M.R., Padilla, F.C. ve Pare, J.R.J., 2003. In fluence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAP™)1 extraction of ginger (*Zingiber of fi cinale*), Food. Res. Int., 36, 499–504.
- Al-Harahshed, M. ve Kingman, S.W., 2004. Microwave-assisted leaching: a review,Hydrometallurgy, 73, 189–203
- Amarowicz, R. ve Shahidi, F. A., 1996. Rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea, Food Res. Int., 29, 71–76.
- Balentine, D.A., Harbowy, M.E. ve Graham, H.N., 1998. Tea: the plant and its manufacture; chemistry and consumption of the beverage. In *Caffeine*; Spiller, G.A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 35–68.
- Bazinet, L., Labbé, D. ve Tremblay, A., 2007. Production of green tea EGC and EGCG enriched fractions by two-step extraction procedure, Sep. Purif. Tech., 56, 53–56.
- Bond T.J., Lewis, J.R., Davis, A. ve Davies, A.P., 2003. Analysis and purification of catechins and their transformation products, In Methods in Polyphenol Anal., Santos-Buelga, C., Williamson, G., Eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 229–266.
- Brachet, A., Christen, P. ve Veuthey, J.L., 2002. Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves, Phytochem. Anal., 13, 162–169.
- Bronner, W.E. ve Beecher, G.R., 1998. Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatograph, J. Chromatogr. A, 805.
- Brunetto, M.R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Galignani, M., Zambrano, A., Gómez, A., Ramos, G. ve Romero, C., 2007. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system, Food Chem., 100, 459-467.
- Brunner, G., 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing, J. Food Eng., 67, 21-33.
- Buffler, C.R., 1993. Microwave cookicccng and processing: engineering fundamentals for the food scientist, Van Nostrand Reinhold, New York.
- Büyüktuncel, E., 2012. Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32, 2, 209.

- Cabrera, C., Gimenez, R. ve Lopez, M.C. 2003. Determination of tea components with antioxidant activity, J. Agr. Food Chem., 51, 4427-4435.
- Caffin, N., D'Arcy, B., Yao, L. ve Rintoul, G., 2004. Developing an index of quality for Australian tea. RIRDC Publication No. 04/033, Project No. UQ-88A, Publication of Rural Industries Research and Development Corporation, 192, Australia.
- Cao, X., Tian, Y., Zhang, T. ve Ito, Y., 2001. Separation and purification of three individual catechins from tea polyphenol mixture by CCC, J. Liquid Chromatogr.& Related Techn., 24, 1723-1732.
- Cemeroğlu, B. ve Acar, J., 1986. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği, Yayın No:6, Ankara.
- Chan, C.H., Yusoff, R., Ngoh, G.C. ve Kung, F.W.L., 2011. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants, J. Chromatogr. A., 1218, 6213-6225
- Chan, C.H., Yusoff, R., Ngoh, G.C. ve Kung, F.W.L., 2011. Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix astragali*, Sep. Purif. Technol., 62, 3, 614-618.
- Chemat, F., Abert-Viani, M. ve Zill-e-Huma, Y.J., 2009. Microwave assisted separations: green chemistry in action. In: Pearlman JT (ed) Green chemistry research trends, Nova Science Publishers, New York, 33-62.
- Chemat, F. ve Smadja, J., 2004. Brevet Européen, EP,A1, 1, 439, 218.
- Chemat, F., Smadja, J. ve Lucchesi, M.E., 2004. Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances, US, Patent, A1, 0,187,340.
- Chemat, S., Ait-Amar, H., Lagha, A. ve Esveld, D.C., 2005. Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds, Chem. Eng. Process., 44, 1320-1326.
- Chen, L., Song, D., Tian, Y., Ding, L., Yu, A. ve Zhang, H., 2008. Application of on-line microwave sample-preparation techniques, Trends. Anal. Chem., 27, 151-159.
- Chen, Y.L., Duan, J., Jiang, Y.M., Shi, J., Peng, L., Xue, S. ve Kakuda, Y., 2010. Production, quality, and biological effects of oolong tea (*Camellia sinensis*), Food Rev. Int., 27, 1-15.
- Chu, D.C. ve Juneja, L.R., 1997. General chemical composition of green tea and its infusion, In Chemistry and Applications of Green Tea; Yamamoto, T.; Juneja, L.R.; Chu, D.C.; Kim, M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 13-22.
- Clifford, M.N., Copeland, E.L., Bloxside, J.P. ve Mitchell, L.A., 2000. Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption., Xenobiotica, 30, 317-326.

- Cocero M.J., Gonzalez S., Perez S. ve Alonso E., 2000. Supercritical extraction of unsaturated products: Degradation of β -carotene in supercritical extraction processes, J. Supercritical Fluids, 19, 39-44.
- Copeland, E.L., Clifford, M.N. ve Williams, C.M., 1998. Preparation of epigallocatechin gallate from commercial green tea by caffeine precipitation and solvent partition, Food Chem., 61, 81–87.
- Çaykur Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü, 2009. Çay Sektörü Raporu, Rize.
- Demir, A., 2002. Çay, T.E.A.E.-Bakış, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü,
- Demir, E., 2015. Türk Yeşil Çay ve Çay Atıklarından Kafein ve Kateşinlerin Makro Boyutta Ekstraksiyonu İçin Yöntem Geliştirilmesi, Doktora Tezi, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dhobi, M., Mandal, V. ve Hemalatha, S., 2009. Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan–silybinin, J. Chem. Metrl., 3, 1, 13–23.
- Dong, J.J., Ye, J., Lu, J.L., Zheng, X.Q. ve Liang, Y.R., 2011. Isolation of antioxidant catechins from green tea and its decaffeination, Food and Bio. Process., 89, 62–66.
- Dou. J., Lee, V.S.Y., Tzen, J.T.C. ve Lee, M.R., 2007. Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes, J. Agric. Food Chem., 55, 7462-7468.
- Escribano-Balo'n, M.T. ve Santos-Buelga, C., 2003. Polyphenols extraction from foods, In Methods in Polyphenol Anal., Santos-Buelga, C., Williamson, G., Eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1–16.
- Eskilsson, C.S. ve Björklund, E., 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction, J. Chromatogr. A., 902, 227–250.
- FAO, The State Of Food And Agriculture, <http://www.fao.org/docrep/013/i2050e/i2050e.pdf>, 2014.
- Fernández, P.L., López, A., Pablos, F., González, A.G. ve Martín, M.J. 2003. The use of catechins and purine alkaloids as descriptors for the differentiation of tea beverages, Microchimica Acta, 142, 79-84
- Fisunoğlu, M. ve Besler, H.T., 2008. Çay ve Sağlık İlişkisi, Zir. Fak. Dergisi, 20, 1, 78-83.
- Ghodake, H.M., Goswami, T.K. ve Chakraverty, A., 2006. Mathematical modelling of withering characteristics of tea leaves, Drying Techn., 24, 159-164.
- Goto, T., Yoshida, Y., Kiso, M. ve Nagashima, H., 1996. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea, J. Chromatogr. A, 749, 295-299.
- Graham, H.N., 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. Prev Med, 21, 334-350.

- Gulati, A., Rawat, R., Singh, B. ve Ravindranath, S.D., 2003. Application of microwave energy in the manufacture of enhanced-quality green tea, J. Agric. Food Chem., 51, 4764-4768.
- Gürü, M. ve İçen, H., 2004. Obtaining of caffeine from Turkish tea fiber and stalk wastes, Bioresource Techn., 94, 17–19.
- Hang, T.V., 1985. Co so sinh hoa va ki thuat che bien tra, Tp.HCM.
- Haslam, E., 2003. Thoughts on Thearubigins, Phytochem., 64, 61-73.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. ve Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants:chemistry, metabolism and structure-activity relationships, J. Nutri. Biochem., 13, 572-584.
- Hu, Z., Cai, M. ve Liang, H.H., 2008. Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from *Radix bupleuri*. Sep. Purif. Technol. 61, 3, 266–275.
- Huang, K.J., Wu, J.J., Chiu, Y.H., Lai, C.Y. ve Chang, C.M.J., 2007. Designed polar cosolventmodified supercritical CO₂ removing caffeine from and retaining catechins in green tea powder using response surface methodology, J. Agr. Food Chem., 55, 9014–9020.
- Huie, C.W., 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants, Anal. Bioanal. Chem., 373, 23–30.
- Huo, C., Wan, S.B., Lam, W.H., Li, L., Wang, Z., Landis-Piwowar, K.R., Chen, D., Dou, Q.P. ve Chan, T.H., 2008. The challenge of developing green tea polyphenols as therapeutic agents, Inflammopharm., 16, 248–252.
- Ishizu, T., Tsutsumia, H. ve Sato, T., 2009. Interaction between galliccatechin gallate and caffeine in crystal structure of 1:2 and 2:2 complexes, Tetrahedron Letters, 50, 4121–4124.
- İçen, H., ve Gürü, M., 2008. Extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes using supercriticalcarbon dioxide, J. Food Eng., 89, 303–309.
- Jain, A., Manghani, C., Kohli, S., Nigam, D. ve Rani, V., 2013. Tea and human health: The dark shadows, Toxic Letters, 220, 82-87.
- Jin, Y., Jin, C.H. ve Row, K.H., 2006. Separation of catechin compounds from different teas., J. Biotechn., 1, 209–213.
- Juneja, L.R., Chu, D., Okubo, T., Nagato, Y. ve Yokogoshi, H. 1999. L-theanine-a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans, Trends in Food Sci. Techn., 10, 199-204.
- Kacar, B., 1992. Yapraktan bardağa, T.C. Ziraat Bankası Kültür Yayınları, No:23, Ankara, 441.

- Kacar, B., 1987. Çayın Biyokimyası ve İşleme Teknolojisi. Çay İşletmeleri GenelMüdürlüğü, Çay-Kur Yayını No:6, Ankara, 329.
- Kang, J.H., Chung, S.T., Go, J.H. ve Row, K.H., 2000. Separation of epigallocatechin gallate from Korean green tea by RP-HPLC, *J. Liquid Chromatogr. & Related Techn.*, 23, 2739–2749.
- Karadeniz, B. ve Koca, İ., 2009. Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Turkish Black Tea Manufactured with Orthodox Method, *Asian J. Chem.*, 21, 6803-6810.
- Khajeh, M., Moghaddam, A.R. ve Sanchooli, E., 2009. Application of Doehlert design in the optimization of microwave assisted extraction for determination of zinc and copper in cereal samples using FAAS, *Food Anal. Methods.*, 3,3, 133–137.
- Kim, W.J., Kim, J.D. ve Oh, S.G., 2007. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Caffeine from Korean Green Tea, *Sep. Sci. Techn.*, 42,14, 3229-3242.
- Kim. Y., Goodner, K.L., Park, J.D., Choi, J. ve Talcott, S.T., 2011. Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of *Camellia sinensis* by oxidation during tea fermentation, *Food Chem.*, 129, 1331-1342.
- Kumar, N.S. ve Rajapaksha, M., 2005. Separation of catechin constituents from five tea cultivars using high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A.*, 1083, 223–228.
- Kuroda, Y., and Hora, Y., 1999. Antimutagenic and Anticarcinogenic Activity Of Tea Polyphenols, *Mutation Res.*, 436, 69-97.
- Lang, Q. ve Wai, C. M., 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-a practical review, *Talanta*, 53, 771-782.
- Li, J., Zu, Y.G., Fu, Y.J., Yang, Y.C., Li, S.M., Li, Z.N. ve Wink, M., 2010. Optimization of microwaveassisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity, *Innov. Food. Sci. Emerg. Technol.*, 11, 637–664.
- Li, P., Wang, Y., Ma, R. ve Zhang, X., 2005. Separation of tea polyphenol from green tea leaves by a combined CATUFM-adsorption resin process, *J. Food Eng.*, 67, 253–26.
- Lin, Y.S., Tsai, Y.J., Tsay, J.S. ve Lin, J.K., 2003. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves, *J. Agr. Food Chem.*, 51, 1864–1873.
- Llompart, M.P., Lorenzo, R.A., Cela, R., Jocelyn, Pare, J.R., Belanger, J.M.R. ve Li, K., 1997. Phenol and methylphenol isomers determination in soils by in-situ microwave-assisted extraction and derivatisation, *J. Chromatogr. A.*, 757, 153–164.
- Lopez, S.J., Thomas, J., Pius, P.K., Kumar, R.R., and Muraleedharan, N., 2005. A Reliable Technique to Identify Superior Quality Clones From Tea Germplasm, *Food Chem.*, 91, 771-778.

- Lu, J.L., Wu, M.Y., Yang, X.L., Dong, Z.B., Ye, J.H., Borthakur, D., Sun, Q.L. ve Liang, Y.R., 2010. Decaffeination of tea extracts by using poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethylacrylate) as adsorbent, J. Food Eng., 97, 555–562.
- Luczaj, W., Skrzydlewska, E., 2005. Antioxidative properties of black tea, Prev. Med., 40, 910-918.
- Majors, R.E., 2008. Practical aspects of solvent extraction, LCGC N Am 26, 12, 1158–1166.
- Mandal, V., Mohan, Y. ve Hemalath, S., 2007. Microwave assisted extraction-an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research, Phcog. Rev., 1,1, 7–18.
- McDonald, M.N. ve Vire, D.E., 1992. Chloroform in the endodontic operatory, J. End., 18, 301–303.
- McHugh M. A. ve Krukonis V. J. 1994. Supercritical fluid extraction principles and practice, 2nd Ed., McGraw Hill, Butterworth-Heinemann, Boston Mass.
- Mengal, P. ve Mompon, B., 1996. Method and apparatus for solvent free microwave extraction of natural products, Eur, Patent, P, EP, 698,076.
- Mira, B., Blasco, M., Berna, A., Subirats, S., 1999. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition, J. Supercritical Fluids, 14, 2, 95.
- Mizukami, Y., Sawai, Y. ve Yamaguchi, Y., 2006. Moisture content measurement of tea leaves by electrical impedance and capacitance, Biosystems. Eng., 93, 293-299.
- Mukhtar H., Ahmad N., 2000. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. Am J. Clin. Nutr., 71, 1698S-1702S.
- Muthumani, T. ve Senthil-Kumar, R.S., 2007a. Studies on freeze-withering in black tea manufacturing, Food Chem., 101, 103-106.
- Muthumani, T. ve Senthil-Kumar, R.S., 2007b. Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea, Food Chem., 101, 98-102.
- Nabors, M.W., 2004. Introduction to Botany. San Francisco: Benjamin Cummings, Chapter 1.
- Ninomiya, M., Unten, L. ve Kim, M., 1997. Chemical and physiochemical properties of green tea polyphenols, In Chem. and Application of Green Tea, Yamamoto, T., Juneja, L.R., Chu, D.C., Kim, M., Eds, CRC Press: Boca Raton, FL, 23–36.

- 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 Chem., 75, 395-404.
- Obanda, M., Owuor, P.O., Mang'oka, R., and Kavoi, M.M., 2004. Changes In Thearubigin Fractions and Theaflavin Levels Due To Variations In Processing Conditions and Their Influence On Black Tea Liquor Brightness And Total Colour, Food Chem., 85, 163-173.
- Owuor, P.O. ve Obanda, M., 2007. The Use Of Green Tea (*Camellia Sinensis*) Leaf Flavan-3-Ol Composition In Predicting Plain Black Tea Quality Potential, Food Chem., 100, 873-884.
- Özdemir, F., Nas, S. ve Gökalp, H.Y., 1993. Siyah çay imalatında farklı kıvrırma metotlarının üç sürgün dönemi çayın işlenmesi üzerindeki etkinliği ve üretilen siyah çayların bazı karakteristik özellikleri, Standard, Nisan, 46-50.
- Özden, D., 2009. Türkiye Siyah Çay Sektör Raporu, Avrupa İşletmeleri Ağı.
- Pan, X., Niu, G. ve Liu, H., 2003. Microwave assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves, Chem. Eng. Process., 42, 129–133.
- Park, H.S., Lee, H.J., Shin, M.H., Lee, K.W., Lee, H.Y., Kim, S., ve Kim, K.H., 2007. Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide, Food Chem., 105, 1011–1017.
- Park, H.S., Choi, H.K., Lee, S.J., Park, K.W., Choi, S.G. ve Kima, K.H., 2007. Effect of mass transfer on the removal of caffeine from green tea by supercritical carbon dioxide, J. Supercritical Fluids, 42, 205–211.
- Park, H.S., Lee, H.J., Shin, M.H., Lee, K.W., Lee, H., Kim, Y.S., Kim, K.O. ve Kim, K.H., 2009. Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide, J. Supercritical Fluids, 50, 225–228.
- Penders, M.H.G.M., Jone, D.P., Needham, D. ve Pealan, E.G., 1998. Mechanistic study of equilibrium and kinetic behaviour of tea cream formation, Food Hydrocolloids, 12, 9–15.
- Périno-Issartier, S., Zill-e-Huma, Y.J., Abert-Vian, M. ve Chemat, F., 2011. Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) food by-products, Food Bioprocess Technol., 4, 1020–1028.
- Peterson, J., Dwyer, J., Jacques, P., Rand, W., Prior, R. ve Chui, K., 2004. Tea variety and brewing techniques influence flavonoid content of black tea, J. Food Composition Analy., 17, 397-405.
- Ravichandran, R. ve Parthiban, R. 2000. Lipid occurrence, distribution and degradation to flavour volatiles during tea processing, Food Chem., 68, 7-13.

- Ravichandran, R., 2002. Carotenoid composition, distribution and degradation to flavour volatiles during black tea manufacture and the effect of carotenoid supplementation on the tea quality and aroma, Food Chem., 78, 23-28.
- Row, K.H. ve Jin, Y., 2006. Recovery of Catechin Compounds From Korean Tea by Solvent Extraction, Bioresource Techn., 97, 790-793.
- Sang, S., Yang, C.S. ve Ho, C., 2004. Peroxidase-Mediated Oxidation Of Catechins, Phytochem. Rev., 3, 229-241.
- Satoh, E., Tohyama, N. ve Nishimura, M., 2005. Comparison of the antioxidant activity of roasted tea with green, oolong, and black teas, Int. J. Food Sci. Nutr., 56, 551-559.
- Shahidi, F. ve Naczki, M., 1995. Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications. Technomic, USA.
- Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J., Mittal, G., Kakuda, Y. ve Jiang, Y., 2005. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods engineering and technology, Food Rev. Int., 21, 139–166.
- Shi, J., Xue, S.J. ve Kakuda, Y., 2009. Green tea induced thermogenesis controlling body weight. In Tea and Tea Products: Chem. and Health-Promoting Properties, Ho, C.T., Lin, J.-K., Shahidi, F., Eds., CRC Press: Boca Raton, FL, 221–232.
- Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J., Mittal, G., Kakuda, Y. ve Jiang, Y., 2005. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods—engineering and technology, Food Reviews Int., 21, 139–166.
- Siebert, K.J., Troukhanova, N.V. ve Lynn, P.Y., 1996. Nature of polyphenol–protein interactions, J. Agr. Food Chem., 44, 80–85.
- Song, J., Li, D., Liu, C. ve Zhang, Y., 2011. Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity, Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 12, 282–287.
- Spigno, G. ve De Faveri, D.M., 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study, J. Food. Eng., 93, 210–217
- Spigno, G. ve De Faveri, D.M., 2009. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review, Food Bioprocess. Technol., 5, 2, 1–16.
- Stashenko, E.E., Puertas, M.A. ve Combariza, M.Y., 1996. Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation solvent extraction and supercritical fluid extraction, J. Chromatogr. A, 752, 1-2, 223.
- Stewart, A.J., Mullen, W. ve Crozier, A., 2005. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea, Molecular Nutr. Food Res., 49, 52-60.

- Streit, N.M., Hecktheuer, L.H.R., do Canto, M.W., Mallmann, C.A., Streck, L., Parodi, T.V. ve Canterle, L.P. 2007. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*), Food Chem., 102, 560-564.
- Sud, R.G. ve Baru, A., 2000. Seasonal variations in theaflavins, thearubigins, total colour and brightness of Kangra orthodox tea (*Camellia sinensis* (L) O Kuntzein Himachal Pradesh, J. Sci. Food Agric., 80, 1291-1299.
- Sun, Q.L., Hua, S., Ye, J.H., Lu, J.L., Zheng, X.Q., ve Liang, Y.R., 2010. Decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide, J. Med. Plants Res., 4,12, 1161-1168.
- Takeuchi, T.M., Pereira, C.G., Braga, M.E.M., Maróstica, M.R., Leal, P.F., ve Meireles, M.A.A., 2009. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants, In Ext. Bio. Compounds for Food Products, Meireles, M.A.A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 137-218.
- Tatke, P. ve Jaiswal, Y., 2011. An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research, Res. J. Med. Plants., 5, 21-31.
- Tokusoglu, Ö. ve Ünal, M.K. 2002. Optimized method for simultaneous determination of catechin, gallic acid, and methylxanthine compounds in chocolate using RPHPLC, European Food Res. Techn., 215, 340-346.
- Tokuşoğlu, Ö., 2001. Siyah çayların başlıca fenolik bileşenleri (flavanoller, flavonoller, tanninler) ve aroma özellikleri üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir.
- Tomlins, K.I. ve Mashingaidze, A., 1997. Influence of withering, including leaf handling, on the manufacturing and quality of black teas-a review, Food Chem., 60, 573-580.
- Tosun, İ. ve Karadeniz, B., 2005. Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi, OMÜ.
- Tüfekci, M. ve Güner, S., 1997. The determination of optimum fermentation time in Turkish black tea manufacture, Food Chem., 60, 53-56.
- URL-1, <http://www.gidabilimi.com/Index.php/tr/makaleler-1/572-yesil-cay-ve-siyah-cay-uretim-teknolojisi>. 03Ağustos 2007
- URL-2, <http://www.tags-search.com/hplc-instrumentation/tag.html>. 30 Aralık 2014
- URL-3, <http://www.tgdf.org.tr>. 15 Mayıs 2013
- URL-4, <http://www.researchandmarkets.com/reports/596464/>. 4 Şubat 2011

- Uzunalic, A.P., Skerget, M., Zeljko, K., Weinreich, B., Otto, F., ve Gruner, S., 2006. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine, Food Chem., 597-605
- Vian, M., Fernandez, X., Visinoni, F. ve Chemat, F., 2008. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: a multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil, J. Chromatogr. A., 1190, 14–17.
- Vovk, I., Simonovska, B. ve Vuorela, H., 2005. Separation of Eight Selected Flavan-3-ols on Cellulose Thin-Layer Chromatographic Plates, J. Chromatogr. A., 1077, 188-194, Slovenia.
- Vuong, Q.V., Stathopoulos, C.E. ve Nguyen, M.H., Golding, J.B., ve Roach, P.D., 2011. Isolation of Green Tea Catechins and Their Utilization in the Food Industry, Taylor & Francis, 27,3, 227-247
- Wang, H. ve Helliwell, K. 2001. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography, Food Res. Int., 34, 223-227.
- Wang, H. ve Helliwell, K., 2000. Epimerisation Of Catechins In Green Tea Infusions, Food Chem., 70, 337-344.
- Wang, H., Provan, G.J. ve Helliwell, K., 2000. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis, Trends in Food Sci. Techn., 11, 152-160.
- Wang, H.F., Tsai, Y.S., Lin, M.L. ve Ou, A.S., 2006. Comparison of bioactive components in GABA tea and green tea produced in Taiwan, Food Chem., 96, 648-653.
- Wang, K., Liu, Z., Huang, J., Fu, D., Liu, F., Gong, Y., and Wu, X., 2009. TLC Separation of Catechins and Theaflavins on Polyamide Plates, J. Planar Chromatogr., 2, 97-100, China.
- Wang, K., Liu, F., Liu, Z., Huang, J., Xu, Z., Li, Y., Chen, J., Gong, Y. ve Yang, X., 2010. Analysis of chemical components in Oolong tea in relation to perceived quality, Int. J. Food Sci. Tech., 45, 913-920.
- Wang, L. ve Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, Trends, Food. Sci. Technol., 17, 300–312.
- Wang, L.J., 2010. Advances in extraction of plant products in nutraceutical processing, In: Pathak Y (ed) Handbook of nutraceuticals, vol II: Scale up, processing and automation, CRC, Press/Taylor & Francis, Boca Raton, 15–52.
- Wang, Y., You, J., Yu, Y., Qu, C., Zhang, H. ve Ding, L., 2008. Analysis of ginsenosides in *Panax ginseng* in high pressure microwave-assisted extraction, Food Chem., 110, 1, 161–167.
- Wan-Joo Kim, W.J., Kim, J.D., Kim, J., Oh, S.G. ve Lee, Y.W., 2008. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbondioxide extraction, J. Food Eng., 89,3, 303-309.

- Willson, K.C. ve Clifford, M.N., 1995. Tea Cultivation to Consumption. Chapman & Hall, London.
- 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, J. the Science of Food and Agr., 82, 517-525.
- Wu, Q., Wang, M., and Simon, J.E., 2004. Analytical Methods to Determine Phytoestrogenic Compounds, J. Chromatogr. B, 812, 325-355.
- Xie, B., Shi, H., Chen, Q., ve Ho, C.T., 1993. Antioxidant properties of fractions and polyphenol constituents from green, oolong and black teas, *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub.*, China B, 17, 77-84.
- Yan, M.M., Liu, W., Fu, Y.J., Zu, Y., Chen, C.Y. ve Luo, M., 2010. Optimisation of the microwaveassisted extraction process for four main astragalosides in *Radix astragali*, Food. Chem., 119, 4, 1663–1670.
- Yao, L., Liu, X., Jiang, Y., Caffin, N., D’Arcy, B., Singanusong, R., Datta, N. ve Xu, Y., 2006a. Compositional analysis of teas from Australian supermarkets, Food Chem., 94, 115-122.
- Ye, J., Wang, L., Chen, H., Dong, J., Lu, J., Zheng, X., Wu, M., and Liang, Y., 2011. Preparation of Tea Catechins Using Polyamide, J. Bio. and Bioeng., 111, 2, 232-236,
- Yen, G.C. ve Chen, H.Y., 1996. Relationship between antimutagenic activity and major composition of various teas, Mutagenesis, 11, 37-41.
- Yen, G.C. ve Chen, H.Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their mutagenicity, J. Agric. Food Chem., 43, 27-32.
- Yoshida, Y., Kiso, M., and Goto, T., 1999. Efficiency Of The Extraction Of Catechins From Green Tea, Food Chem., 67, 429-433.
- Zhao, R., Yan, Y., Li, M. ve Yan, H., 2007. Selective adsorption of tea polyphenols from aqueous solution of the mixture with caffeine on macroporous crosslinked poly(N-vinyl-2-pyrrolidinone), Reactive and Functional Polymers, 68, 768–774.
- Zhen, Y, 2002. Tea: bioactivity and therapeutic potential, Taylor and Francis, 257, 11.
- Zijp, I.M., Korver, O. ve Tijburg, L.B.M., 2000. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption, Critical Reviews in Food Sci. Nutrition, 40, 371–398
- Zimmermann, B.F ve Gleichenhagen, M., 2010. The effect of ascorbic acid, citric acid and low pH on the extraction of green tea: How to get most out of it, Food Chem., 124, 1543-1548.
- Zougagh, M., Valcarcel, M. ve Rios, A., 2004. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness, Trac-Trends in Analy. Chem., 23, 5, 399.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Trabzon'da doğdu. 1998 yılında Trabzon Fatih (Yabancı Dil Ağırlık) Lisesi'nden mezun oldu. 2003 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği bölümünden mezun oldu. 2003-2009 yılları arasında özel bir eğitim kurumunda kimya öğretmeni olarak görev yaptı. 2010 yılında yüksek lisansını tamamladı ve doktora yaptığı 2010-2015 yılları süresince SAN-TEZ projesinde bursiyer olarak çalıştı. Yabancı dili İngilizcedir.