

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANADOLU KAYNAKLI
CAMELLIA SINENSIS (L.) O.KUNTZE BİTKİSİ ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Aslı CAN AĞCA

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr.Engin ŞARER**

2007-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Doktora **Programı**

Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Doktora **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16.01.2007

Prof.Dr. Engin ŞARER
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Gülçin SALTAN
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof.Dr. Şenay KÜSMENOĞLU
Gazi Üniversitesi

Prof.Dr. Mehmet KOYUNCU
Ankara Üniversitesi

Prof.Dr. Bilge ŞENER
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller Dizini	xi
Çizelgeler Dizini	xii
Kromatogramlar Dizini	xiv
1.GİRİŞ	1
1.1. Theaceae Familyasının Botanik Özellikleri	7
1.2. <i>Camellia</i> L. Cinsinin Botanik Özellikleri	7
1.3. <i>Camellia sinensis</i> (L.) O.Kuntze Bitkisinin Botanik Özellikleri	8
1.4. Kimyasal Bileşikler	9
1.4.1. Flavonoitler	9
1.4.1.1. Flavonoitlerin Biyogenezi	13
1.4.2. Terpenler	15
1.4.2.1. Monoterpenler	16
1.4.2.2. Seskiterpenler	20
1.4.2.3. Diterpenler	25
1.4.2.4. Sesterterpenler	26
1.4.2.5. Triterpenler	26
1.4.2.6. Steroller	27
1.4.2.7. Saponinler	28
1.4.2.8. Tetraterpenler	30
1.4.2.9. Politerpenler	31

1.4.2.10. Terpenlerin Biyogenezi	31
1.5. <i>C. sinensis</i> Bitkisinde Elde Edilen Ticari Ürünler ve Elde Ediliş Yöntemleri	33
1.5.1. Yeşil Çay Üretim Tekniği	34
1.5.2. Siyah Çay Üretim Tekniği	36
1.6. <i>Camellia sinensis</i> Üzerinde Yapılan Kimyasal Çalışmalar	38
1.6.1. Yeşil Çay Üzerinde Yapılan Kimyasal Çalışmalar	38
1.6.1.1. Yeşil Çay Polifenoller	38
1.6.1.2. Yeşil Çayda Bulunan Metilksantinler	58
1.6.1.3. Yeşil Çayda Bulunan Aminoasitler	63
1.6.1.4. Yeşil Çayda Bulunan Vitamin ve Mineraller	66
1.6.1.5. Yeşil Çay Aroması	68
1.6.1.6. Diğer Bileşikler	70
1.6.2. Siyah Çay Üzerinde Yapılan Kimyasal Çalışmalar	72
1.6.2.1. Siyah Çay Polifenoller	72
1.6.2.2. Siyah Çayda Bulunan Metilksantinler	82
1.6.2.3. Siyah Çay Aroması	84
1.7. Yeşil Çay ve Siyah Çayın Biyolojik Etkileri	86
1.7.1. Kanser Karşı Etkileri	86
1.7.1.1. Antioksidan Etki	86
1.7.1.2. Antitümöral ve Antikarsinojenik Etki	90
1.7.1.3. Antimutajenik Etki	97
1.7.1.4. Antiinflamatuvar Etki	98
1.7.2. Kardiyovasküler Hastalıklara Karşı Etkisi	100
1.7.2.1. Antiateroskleroz Etki	100

1.7.2.2. Obeziteye Karşı Etkisi	103
1.7.3. Antimikrobiyal Etki	104
1.7.3.1. Antibakteriyel Etki	104
1.7.3.2. Antiviral Etki	108
1.7.4. Diğer Etkileri	109
1.7.4.1. Tetanoz Toksinine Karşı Etki	109
1.7.4.2. Alzheimer'a Karşı Etki	109
1.7.4.3. Parkinson'a Karşı Etki	111
1.8. Yeşil ve Siyah Çayın Toksisitesi	112
2. GEREÇ VE YÖNTEM	114
2.1. Bitkisel Materyal	114
2.2. Kullanılan Cihazlar	114
2.3. Yöntem	115
2.3.1. Antioksidan Aktivite	115
2.3.1.1. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılacak Ekstrelerinin Hazırlanması	115
2.3.1.2. Antioksidan Aktivite Tayini	117
2.3.1.2.1. DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) Testi	117
2.3.1.2.2. ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) Testi	118
2.3.2. Antimikrobiyal Aktivite Tayini	120
2.3.2.1. Disk Agar Difüzyon Yöntemi	120
2.3.2.2. Agar-well Difüzyon Yöntemi	121
2.3.2.3. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC)	122
2.3.3. Ekstrelerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analizi	123

2.3.3.1. Gallik Asite Ait Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi ve Doğru Denkleminin Hesaplanması	124
2.3.3.2. Kateşine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi ve Doğru Denkleminin Hesaplanması	125
2.3.3.3. Epigallokateşin gallata Ait Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi ve Doğru Denkleminin Hesaplanması	125
2.3.4. <i>C. sinensis</i> Yaprakları ile Yeşil ve Siyah Çayın Uçucu Bileşiklerinin Analizi	126
3. BULGULAR	128
3.1. Antioksidan Aktivite Tayini	128
3.2. Antimikrobiyal Aktivite Tayini	130
3.3. HPLC İle Çalışılan Örneklerdeki Standart Bileşiklerin Miktar Tayinleri	134
3.3.1.HPLC ile <i>C.sinensis</i> Yaprakları, Yeşil çay ve Siyah çay Sulu Ekstrelerindeki Gallik asit, Kateşin ve Epigallokateşin gallat Miktar Tayinleri	134
3.3.2.HPLC ile <i>C. sinensis</i> Yaprakları, Yeşil çay ve Siyah çay Metanollü Ekstrelerindeki Gallik asit, Kateşin ve Epigallokateşin gallat Miktar Tayinleri	137
3.3.3.HPLC ile <i>C. sinensis</i> Yaprakları, Yeşil çay ve Siyah çay Etanollü Ekstrelerindeki Gallik asit, Kateşin ve Epigallokateşin gallat Miktar Tayinleri	140
3.3.4. Standart Bileşiklere Ait Kalibrasyon Eğrileri ve Doğru Denklemleri	143
3.3.4.1.Gallik Asite Ait Kalibrasyon Eğrisi ve Doğru Denklemi	143

3.3.4.2. Kateşine Ait Kalibrasyon Eğrisi ve Doğru Denklemi	144
3.3.4.3. Epigallokateşin gallata Ait Kalibrasyon Eğrisi ve Doğru Denklemi	145
3.4.C. <i>sinensis</i> Yaprakları, Yeşil çay ve Siyah çay Uçucu Bileşiklerinin Kalitatif ve Kantitatif Analizi	146
4.TARTIŞMA	151
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	157
ÖZET	158
SUMMARY	159
KAYNAKLAR	160
ÖZGEÇMİŞ	174

ÖNSÖZ

Camellia sinensis (L.)O.Kuntze bitkisi ekonomik öneme sahip olmasının yanında bitkiden elde edilen ticari ürünler çok önemli biyolojik aktivitelere sahiptir ve ülkemize ait örnekler üzerinde bugüne kadar yeni bilimsel yöntemlerle yapılmış detaylı kimyasal bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Karadeniz bölgesinden toplanıp ticari ürün haline getirilmek üzere gerekli işlemlerden geçirilmiş olan yeşil çay, siyah çay ve hiçbir işlem görmemiş olan doğal çay bitkisinin bazı biyolojik aktiviteleri ile uçucu bileşikleri ve flavonoidleri çalışılmıştır.

Yüksek Lisans öğrencilik yıllarımdan itibaren üzerimde büyük emeği olan ve ilgisini hep üzerimde hissettiğim değerli hocam Prof.Dr. Engin ŞARER'e, bana her konuda destek olduğu, yol gösterdiği ve bilgilerini paylaştığı için teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca benden desteklerini esirgemeyen Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Gülçin SALTAN ve diğer hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışma materyalimi sağlamamda yardımcı olan ÇAY-KUR Genel Müdür Yardımcısı Sayın Osman KESER'e teşekkürlerimi sunarım.

Antioksidan aktivite çalışmalarımı yönlendiren İnönü Üniversitesi hocalarından Doç.Dr. Kadir BATÇIOĞLU ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi hocalarından Yrd.Doç.Dr. Semiha ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Kimyasal analizlerimi gerçekleştirebilmem için Enstrumental Analiz Birimindeki cihazları kullanmama olanak sağlayan ve analizlerim sırasında her türlü destek ve bilgisini benimle paylaşan Uzm.Kim.Nilüfer VURAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca tüm sıkıntılı anlarımda benim yanımda olan Farmakognozi Araştırma Görevlisi arkadaşlarım Betül SEVER YILMAZ, Özlem BAHADIR, Sinem ASLAN, Alper GÖKBULUT ve Çiğdem ALTINYAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında gösterdikleri destek ve ilgiden dolayı babam Mümin CAN, annem Hikmet CAN ve eşim Çağatay AĞCA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Küçük yüreği ve sevgisiyle bu sıkıntılı günlerde varlığıyla yüzümü güldüren ve içimi ısıtan biricik oğlum Rüzgar Yiğit AĞCA'ya teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
API-ESI-MS	Atmosferik Basınç-Elektrospray İyonizasyon-Kütle Spektrometresi
ATP	Adenozin trifosfat
C	Kateşin
CE	Kapiler Elektroforez
CZE	Kapiler Zon Elektroforezi
DAT	Dopamin Transporter
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMAPP	Dimetilallil pirofosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EGC	Epigallokateşin
EGCG	Epigallokateşin gallat
EC	Epikateşin
ECG	Epikateşin gallat
FAB-MS	Hızlı Atom Bombardımanı-Kütle Spektrometresi
FPP	Farnesil pirofosfat
GC	Gallokateşin
GCG	Gallokateşin galat
GC-MS	Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
GPP	Geranil pirofosfat
GTP	Yeşil Çay Polifenolleri
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HSCCC	Yüksek Hızlı Karşı Akım Kromatografisi
IPP	İzopentenil pirofosfat
LC-DAD-MS	Sıvı Kromatografisi-Diode Array Dedektörü-Kütle Spektrometresi
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LOD	Dedeksiyon Limiti
LOQ	Kantitasyon Limiti

MECC	Miselli Elektrokinetik Kapiler Kromatografi
MHA	Mueller-Hinton Agar
MHB	Mueller-Hinton Broth
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MOPS	3-[N-morpholino]-propansülfonik asid
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NF-kappa	Nükleer Faktör
NIR	Yakın Infrared Spektroskopisi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NO	Nitrik Oksit
ODS	Oktadesil silan
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SPME	Katı Faz Mikroekstraksiyon
TF ₁	Teaflavin
TF ₂ -A	Teaflavin-3-gallat
TF ₃ -A	Teaflavin-3,3'-digallat
TF ₂ -B	Teaflavin-3'-gallat
TFN	Tümör Nekroz Faktörü
TP	Çay Polifenoller
TWE	Yeşil Çay Sulu Ekstre
UV	Ultraviyole
UV-DAD	Ultraviyole-Diode Array Dedektör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Oolong çay Yeşil çay Siyah çay	6
Şekil 2: Flavonoitlerin genel yapısı	9
Şekil 3: Flavonoit bileşiklerinin biyosentez yolağı	14
Şekil 4: Terpenlerin izopren sayılarına göre sınıflandırılması	15
Şekil 5: Terpenik grupların biyosentez yolağı	32
Şekil 6: <i>Camellia sinensis</i> bitkisinden elde edilen ticari ürünler ve elde ediliş yöntemleri	33
Şekil 7: Ekstrelerin <i>Staphylococcus aureus</i> üzerine etkisi. 9: Siyah çay etanollü ekstre, 11: doğal çay etanollü ekstre	133
Şekil 8: Ekstrelerin <i>Candida albicans</i> üzerine etkisi. 4: yeşil çay etanollü ekstre, 6: siyah çay etilasetatlı ekstre 11: doğal çay etanollü ekstre	133
Şekil 9: Gallik asite ait kalibrasyon eğrisi	143
Şekil 10: Kateşine ait kalibrasyon eğrisi	144
Şekil 11: EGCG'a ait kalibrasyon eğrisi	145

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1: Yeşil çay ekstresindeki kateşinlerin, UV-DAD ve MS dedektörleri ile miktar tayinleri	45
Çizelge 2: Yeşil çay infüzyonunda bulunan major amino asitler ve bağıl yüzdeleri	63
Çizelge 3: Liang ve arkadaşlarının yeşil çay yapraklarında saptadıkları amino asitler ve miktarları	65
Çizelge 4: Gradient yönteme göre mobil faz değişimi	124
Çizelge 5: <i>C.sinensis</i> bitkisinin yaprakları ile bu yapraklardan elde edilen yeşil çay ve siyah çay ekstraktları üzerinde DPPH ve ABTS yöntemleri ile yapılan antioksidan etki sonuçları	129
Çizelge 6: Çay yaprakları, yeşil çay ve siyah çay ekstraktlarının Disk difüzyon, Kuyucuk ve MIC yöntemleri kullanılarak elde edilen antimikrobiyal etki sonuçları.	132
Çizelge 7: Çay yapraklarının, yeşil çay ve siyah çayın sulu ekstraktlarında tespit edilen gallik asit, kateşin ve EGCG değerleri µg/ml, mg/100 ml ve % cinsinden değerleri	136
Çizelge 8: Çay yapraklarının, yeşil çay ve siyah çayın metanollü ekstraktlarında tespit edilen gallik asit, kateşin ve EGCG değerleri µg/ml, mg/100 ml ve % cinsinden değerleri.	139
Çizelge 9: Çay yapraklarının, yeşil çay ve siyah çayın etanollü ekstraktlarında tespit edilen gallik asit, kateşin ve EGCG değerleri µg/ml, mg/100 ml ve % cinsinden değerleri.	142
Çizelge 10: Gallik asite ait denklem, R^2 , LOQ ve LOD değerleri	143
Çizelge 11: Kateşine ait denklem, R^2 , LOQ ve LOD değerleri	144
Çizelge 12: EGCG'a ait denklem, R^2 , LOQ ve LOD değerleri	145
Çizelge 13: <i>Camellia sinensis</i> bitki yaprakları, yeşil çay ve siyah çayın uçucu bileşikleri ve % miktarları.	147
Çizelge 14: Yeşil çay sulu ekstresinin gallik asit, kateşin ve EGCG miktarları bakımından karşılaştırılması.	155

Çizelge 15: Siyah çay sulu ekstresinin gallik asit, kateşin ve EGCG miktarları bakımından karşılaştırılması.	155
Çizelge 16: Doğal çay sulu ekstresinin gallik asit, kateşin ve EGCG miktarları bakımından karşılaştırılması.	155

KROMATOGRAMLAR DİZİNİ

Kromatogram 1: Bitki yaprakları, yeşil çay ve siyah çayın sulu ekstralarının HPLC analizine ait kromatogram.	135
Kromatogram 2: Bitki yaprakları, yeşil çay ve siyah çayın metanollü ekstralarının HPLC analizine ait kromatogram .	138
Kromatogram 3: Bitki yaprakları, yeşil çay ve siyah çayın etanollü ekstralarının HPLC analizine ait kromatogram.	141
Kromatogram 4: Çay yapraklarının uçucu bileşiklerinin Gaz kromatogramı	148
Kromatogram 5: Yeşil çayın uçucu bileşiklerinin Gaz kromatogramı	149
Kromatogram 6: Siyah çayın uçucu bileşiklerinin Gaz kromatogramı.	150



***Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze bitkisinin çiçekleri**



***Camellia sinensis* bitkisinin toplanması**



Bitkiden elde edilecek olan ticari ürünlerin hazırlanılmasında kullanılan üst iki buçuk yaprak



***Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze bitkisinin genel görünümü**
(Prof.Dr. Mehmet KOYUNCU)

1. GİRİŞ

Camellia sinensis (L.) O.Kuntze bitkisi (Sinonimi= *Thea sinensis* L.) Theaceae familyasına ait, 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. Bu bitkinin önemi; yapraklarının dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecek olan çayın hazırlanılmasında kullanılmasından dolayıdır. İçecek olarak tüketilmeye başlanması, Çin’de 5 bin yıl öncesine dayanmaktadır. Çayın, statü sembolü ve şifa veren bir içecek olması sebebiyle, yüzyıllarca Asya kültüründe önemli bir yeri olmuştur. Bir efsaneye göre; büyük Çin İmparatoru Shen Nong’un hizmetlilerinden biri bahçede su kaynatırken bir yaprak suyun içine düşer. Yayıdığı koku imparatoru etkiler ve meraklı kişiliğiyle tanınan imparator, tadını da denemek ister. Böylece çay insanoğlunun vazgeçilmez dostu olur. Çay bitkisi olarak bilinen *C.sinensis*, uzun yıllardır Çinliler tarafından bilinen ve kültürü yapılan bir bitkidir. Eski zamanlardan bu yana çay, Çin’de pek çok değişik hastalığa karşı ilaç olarak kullanılmıştır.

İlk belgelerde, çayın tadının belirgin şekilde acı olduğu bildirilmiştir. O zamanlarda çaya “acı çay” da denmesi, bu ifadeyi desteklemektedir. Günümüzde araştırmacılar “acı çay” ifadesinin nedeninin; o dönemlerde taze koparılmış çay yapraklarının deoksikasyonun hazırlanıp tüketilmesinden kaynaklandığını düşünmektedirler. Çayın, ilaç olarak kullanımından içecek olarak kullanımına geçilmesi M.Ö. 1124-222 yılları arasına denk düşmektedir ve M.Ö. 221-206 arasındaki dönemde çayın popüleritesi gün geçtikçe artmış ve tıbbi çay, tonik çay’a dönüşmüştür. İkisi arasındaki fark ise; tıbbi çay, tedavi edici olarak kabul görürken, tonik çay insan sağlığını, ileride oluşabilecek rahatsızlıklara karşı korumak amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Zaten Çin halk tıbbının dayandığı ve benimsediği

temellerden biri de sağlınızı 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.

M.Ö.206-M.S.220 yılları arasında çay içimi hızlı bir şekilde yayılmaya başlamış ve Materia Medica'da çayın tıbbi etkileri; bitkisel zehirlere karşı antidot olarak, baştaki şişlik ve abselere karşı ve uyku önleyici olarak bildirilmiştir. Dönemin ünlü cerrahlarından Hua Tuo, tezinde çayın etkilerini, "acı çay içmek, insanı daha iyi düşünür hale getirir" diyerek özetlemiştir. Son dönemlerini yaşadığını düşünen yaşlı hanedanlar, uzun ömür toniği olduğunu düşündükleri çayı devamlı içmişlerdir.

M.S. 220-280'li dönemde ise insanlar, çok fazla alkol tüketimine bağlı oluşan sıkıntılarını gidermek için çay içmeye başlamışlardır. Çay, alkol ve etkilerine karşı kullanılan popüler bir ilaç haline gelmiştir. O dönemin insanı, çok fazla ve sıklıkla içilen çayın kronik uykusuzluğa neden olacağını da bilmekteydi.

Çay bitkisinin kültür, hasat ve üretim koşulları ile ilgili gelişmeler M.S. 618-906 yılları arasına rastlamaktadır. Bu dönemde yeşil çay ilk defa elde edilmiş ve çay artık Çin'in ulusal içeceği olarak değer görmeye başlamıştır.

M.S. 960-1279 yıllarında da Çay popülaritesi artmaya devam etmiş ve çay evleri açılmaya başlanmıştır. Bu çay evlerinde kişi, çay içip rahatlayarak güzel vakit geçirmektedir. Siyah çay üretimi ise ilk defa M.S.1368-1644 yıllarında yapılmış ve ihraç edilmeye başlanmıştır.

Çin'de M.S.618-1911 yılları arasında çay ile ilgili olarak yazılan pek çok kitaba rastlamak mümkündür ve bu kitaplar 3 kategoriye ayrılabilirler; Bitkisel tedavi ile ilgili kitaplar, çay kullanımı ile ilgili kitaplar, genel tarih kitapları.

Bu kitaplardan yapılan özetlemeye göre; o dönemlerde çayın pek çok farklı fizyolojik ve terapotik etkilere sahip olduğu düşünülmüştür. Bu etkileri örneklersek, uyku giderici, sakinleştirici, baş ağrısına karşı, susuzluğu giderici, ateş düşürücü, detoksifikan, sindirime yardımcı, zindelik verici, göğüs hastalıklarına karşı pektoral, dişleri güçlendirici, diüretik.

Eski dönemlerde çayın ilaç olarak kullanılmasına ek olarak, günlük içecek olarak da tüketilmesi, insan sağlığına en azından iki önemli katkı sağlamıştır. Birincisi, çay insanların suyu kullanma alışkanlıklarını değiştirmiştir. Eski zamanlarda, insanlar susadıklarında doğal, hiç işlem görmemiş yani patolojik mikropları içirme ihtimali yüksek olan suyu içerlerdi. Çay içiminin benimsenmesiyle birlikte, insanlar çay infüzyonu hazırlamak için kaynar su kullanmaya başlamışlardır. Bu uygulamanın, bilmeden de olsa, o dönemlerde pek çok enfeksiyonel hastalığa karşı bir önlem oluşturduğu kitaplarda belirtilmektedir. İkinci olarak ise, yine o dönemlerde çay, alkollü içeceklerin yerine konabilen en iyi alternatif olmuş ve böylece alkol tüketiminin azaldığı bildirilmiştir.

M.Ö. 350'de yazılan, eski bir Çin Sözlüğü olan Erh Ya'da, çay tarımının Çin'in iç kısımlarında başladığı belirtilmiştir. Geleneksel çay içimi Japonya'ya 6. yy.' da gelmiştir. Daha sonra, bu içecek imtiyazlı bir çevre tarafından tüketilmeye başlanmış ve sadece 700 yıl önce herkes tarafından tüketilebilen popüler bir içecek olmuştur (Weisburger, 1997; Chen, 2002).

1580'lerde Avrupa ve Uzakdoğu ticaretinin başlamasıyla bu gizemli içecek Batı kültürüyle tanışmıştır. 1600' lerin ortalarında Büyük Britanya, güçlü deniz filolarıyla Avrupa'nın çay ticaretiyle ilgilenmeye başlamış ve çayın içecek olarak yayılmasında büyük bir rol oynamıştır. 1700' lerin ortalarında, Büyük Britanya, savaşın neden olduğu parasal problemlerini aşmak için, çayın ithalatında ekstra

vergiler koymuş ve Amerikan kolonileri, Boston Çay Partisi önderliğinde bu vergilendirme sistemini boykot ederek, çay tüketimini azaltmışlardır.

1800' lerin başında çay o kadar popüler olmuştur ki; İngilizler, Çin'den satın alacakları çay bitkisini, Hindistan'dan ithal etikleri afyon karşılığında almaya başlamışlardır. Amerikalılar ise, çay ticaretinde, İngiliz tekelinden kaçmak için, Çin'den almak istedikleri çaya karşılık vermeleri gereken afyon drogunu Osmanlı İmparatorluğundan ithal etmişlerdir.

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 (Nabor, 2004; greentealovers, 2006).

Türkiye'de çay yetiştirme konusunda ilk girişimin Tanzimat Devrinde 1888 yılında yapıldığı, dönemin yazılı belgelerinden anlaşılmaktadır. Edinilen bilgilere göre; Çin'den çay fidanları ve tohumlarının getirildiği ve getirilen bu tohum ve fidanların Bursa ilinde denendiği, ancak ekolojik özelliklerin çay yetiştiriciliği için uygun olmaması nedeniyle her iki denemeden de sonuç alınmadığı belirtilmektedir.

Çay tarımı ile ilgili ilk önemli girişim ise 1917 yılında olmuştur. Batum ve çevresinde incelemeler yapmak üzere, bölgeye aralarında Halkalı Ziraat Mektebi Müdür Vekili Ali Rıza ERTEN'in de yer aldığı bir heyet gönderilmiştir. Yapılan inceleme sonucu hazırlanan raporda, Batum ile benzer ekolojiye sahip Doğu Karadeniz Bölgesinde çay ve narenciye bitkilerinin yetiştirilebileceği belirtilmiştir.

1.Dünya savaşından sonra bölgede yaşanan ekonomik ve sosyal bunalımlar, işsizlik dolayısıyla meydana gelen aşırı göç, bölge insanına gelir kaynağı ve iş alanları yaratılmasını zorunlu hale getirmiştir. TBMM'nde 1924 yılında, Rize ili ve Borçka Kazasında çay yetiştirilmesine dair 407 Sayılı Kanun kabul edilmiştir. Çay tarımı bu kanun ile yasal güvenceye kavuşturulmuştur. Bu kanuna göre başlatılan çay üretimi çalışmalarının yürütülmesinde zamanın Ziraat Umum Müfettişi Zihni Derin görevlendirilmiştir (Gündoğan, 2006).

Çayın ülkemizde halk arasındaki kullanıma baktığımızda; midevi, kuvvet verici, idrar arttırıcı etkilerine bağlı kullanımının yanı sıra, alkaloit zehirlenmelerinde panzehir olarak da kullanıldığı bildirilmiştir. Ayrıca, kurutulan yapraklardan hazırlanan dekoksiyon, iltihaplı göz hastalıkları tedavisinde ve göz yorgunluğunu gidermek amacıyla halk arasında sıklıkla kullanılmaktadır [Baytop, 1999; Tuzlacı, 2006].

Günümüzde bu bitkinin pek çok ülkede ticari amaçla kültürü yapılmaktadır. *C. sinensis* bitkisinden ticari ürün hazırlanmasında en önemli işlem fermentasyondur. Bu fermentasyonun derecesi çayın tipini ve kalitesini etkiler. Buna göre ticarete üç tip üründen söz edilir.

1. Fermente olmamış çay (yeşil çay)
 2. Yarı fermente olmuş çay (oolong çay)
 3. Tam fermente olmuş çay (siyah çay)
- (Yamamoto ve ark., 1997).

Her üç tip çayda *Camellia sinensis* bitkisinin tomurcuk ve ilk 2 yaprağından elde edilmektedir. **Şekil 1**'de elde edilen üç tip çay ve bunlardan hazırlanan sulu infüzyonlar görülmektedir.



Şekil 1: Oolong çay Yeşil çay Siyah çay

C. sinensis bitkisi ekonomik öneme sahip olmasının yanında bitkiden elde edilen ticari ürünlerin, özellikle yeşil çayın, antioksidan, antikarsinojen, antitümoral, antimutajenik, antienflamatuvar, antiaterosklerotik, antihiperkolesterolemik, antihiperlipidemik, antibakteriyel ve antiviral etki gibi çok önemli biyolojik etkilere sahip olduğundan, yetiştirildiği çeşitli ülkelerde oldukça fazla sayıda çalışma bulunurken, ülkemize ait örneklerde bugüne kadar yeni bilimsel yöntemlerle yapılan detaylı kimyasal bir çalışma bulunmadığı gibi bitkinin biyolojik aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. *C. sinensis* bitkisinin içeriğinin yetiştigi bölgeye, toplama zamanına, ikibuçuk yaprağın üretime girmeden önceki bekleme koşullarına ve üretim proseslerine göre farklılıklar gösterdiği de bilinmektedir. Bu çalışmada hedeflenen Karadeniz bölgesinde toplanan *Camellia sinensis* bitki yaprakları ile bu yapraklardan ticari ürün haline getirilmek üzere elde edilen yeşil ve siyah çaydan hareketle farklı polaritede çözücüler kullanılarak hazırlanan ekstrelerin antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin tespit edilmesi ve en iyi aktivite gösteren ekstrelerin HPLC analizi ile kimyasal profillerinin çıkarılması ve her üç örneğin uçucu bileşiklerinin GC/MS ile kalitatif ve kantitatif analizidir.

1.1. Theaceae Familyasının Botanik Özellikleri

Bu familyaya ait bitkiler ağaç veya çalı formunda olup kışın yapraklarını dökmezler. Yaprakları basit, stipulasız ve sarmal dizilişlidir. Çiçekler çoğunlukla tek başına, hermafrodit, aktinomorf, genelde büyük ve gösterişlidir. Sepaller imbrikat, petaller 5 veya daha fazla, serbest veya tabanda birleşiktir. Stamenler çok sayıda, genelde korollanın tabanında birleşmiştir. Ovaryum daha yüksek, 3-5 loküllü. Meyva lokulusit kapsül veya septisit kapsüldür (Davis, 1967).

1.2. *Camellia* L. Cinsinin Botanik Özellikleri

Yaprak dökmeyen ağaç veya çalılardır. Yapraklar kısa saplı, alternan, kenarları dişli ve yapısı derimsidir. Çiçekler tek başına, dalların ucunda veya yaprak ekseninde küçük demetler şeklinde bulunurlar. Sepaller 4-6, korolla (4-) 5-8(-14) petal içerir ve genelde birbirleriyle ve stamenlerle tabanda birleşir. Stamenler çok sayıda. Meyvalar genelde lokulusit kapsüldür (Davis, 1967).

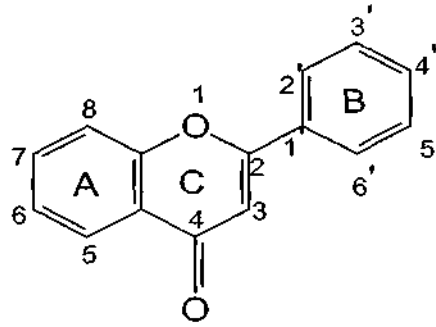
1.3. *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze Bitkisinin Botanik Özellikleri

Bu bitki (Sinonimi: *Thea sinensis* L.), Türkiye'nin yerli bitkilerinden olmamakla birlikte, Kuzey Anadolu bölgesinde yetiştirilmektedir. Vatanı olan Çin'de yabani olarak yetiştiği zaman 10-12 m.yi bulan yüksekliği, kültürde 2 m'yi aşmaz. Yaprak dökmeyen bir ağaçtır. Bitkinin gövdesi esmer ya da koyu esmer renktedir. Yapraklar basit, saplı, bazen stipulasız ve alternan dizilişlidir. Lamina derimsi, koyu yeşil renkli, eliptikten dar eliptiğe kadar değişir. Yaprak kenarlarındaki dişler geniş açılı, içe kavisli ve siyah uçludur. Çiçekleri gösterişli ve yaprakların koltuğunda tek tek veya 2-3 tanesi bir arada bulunurlar. Kaliks alt tarafta birbirine yapışmış 5-7 sepalden ibarettir. Korolla 7-8 petalli, petaller beyaz renkli, oval şekilli. Stamenler tabanda birleşirler. 3 karpelden yapılmış bir ginekeum'a sahiptir. Stilus basit ve stigma 3 parçalı. Çay bitkisinin çiçek açma zamanı tipine ve gelişme ortamına göre değişir. Rize bölgesinde genelde Ağustos ayında çiçek açar ve Aralık ayının sonunda çiçeklenme sona erer. Sıcak iklime sahip ülkelerde yılın hemen hemen her ayında bitki çiçeklidir. Meyva, her gözünde 1-2 adet tohum bulunan, 3 gözlü bir kapsüldür. Meyvaların oluşması yaklaşık bir yılda tamamlanır. Olgunlaşmadan önce yeşil olup, kalın kabuklu, 2.5 cm çapında, kısa saplıdır. Meyva olgunlaştığında tohumlar kahverengi olur ve bölmeler açılarak tohumlar dökülür. Tohumlar genelde 1-2 cm çapında ve küresidir (Baytop, 1963; Davis, 1967; Gündoğan, 2006).

1.4. Kimyasal Bileşikler

1.4.1. Flavonoitler

Flavonoitler, flavan çekirdeği taşıyan düşük molekül ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir. Bu grup bileşikler, hem serbest hem de glukozitleri halinde doğada sıkça rastlanılan ve γ -piron halkası içeren polifenollerdir. **Şekil 2**, flavonoitlerin jenerik yapısını ve numaralandırma sistemini göstermektedir.



Şekil 2: Flavonoitlerin genel yapısı

Flavonoitlerin ve metabolitlerinin biyokimyasal aktiviteleri, bu bileşiklerin kimyasal yapılarına ve moleküller üzerindeki fonksiyonel gruplara bağlıdır.

Flavonoitler, kimyasal yapılarına göre 2 şekilde sınıflandırılırlar.

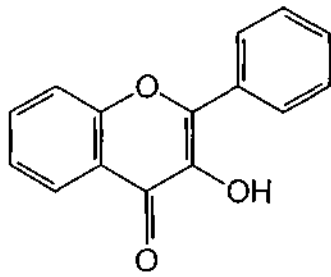
Birinci tip sınıflandırmaya göre;

- 2-fenilbenzopirilyum çekirdeği taşıyanlar
 - a. Antosiyanidol'ler
- 2-fenilkromonlar
 - a. Flavon, Flavonoller ve türevleri
 - b. Flavonon ve Dihidroflavonoller
 - c. İzoflavon ve İzoflavononlar
- 2-fenilkromanlar
 - a. Flavanlar
 - b. Flavanoller, Flavan-3,4-dioller
(Proantosiyanidoller)
- Kalkon ve Dihidroalkonlar
- 2-benziliden kumaranonlar (Auronlar) [Bruneton, 1999a].

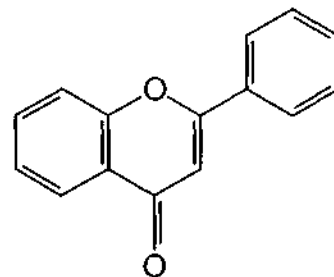
İkinci tip sınıflandırmaya göre ise;

- a. Flavonol
- b. Flavon
- c. Flavanon
- d. Kateşin (Flavanol)
- e. Antosiyanidin
- f. İzoflavon
- g. Dihidroflavanol
- h. Kalkon

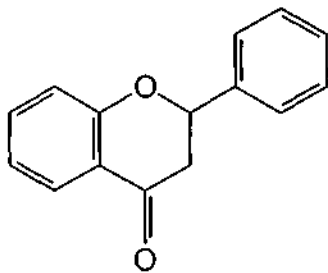
gruplarına ayrılmaktadır.



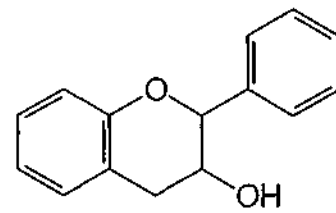
Flavonol



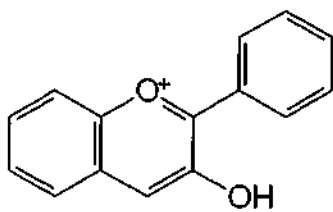
Flavon



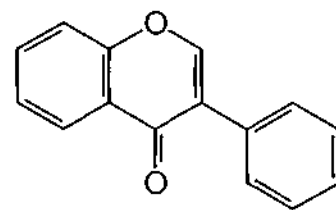
Flavanon



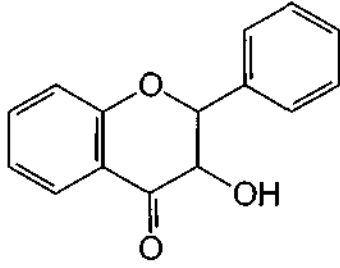
Kateşin



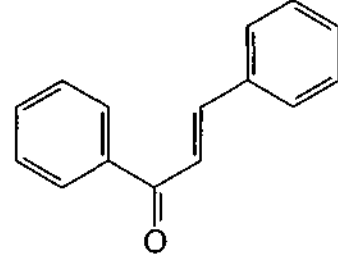
Antosiyanidin



İzoflavon



Dihidroflavonol



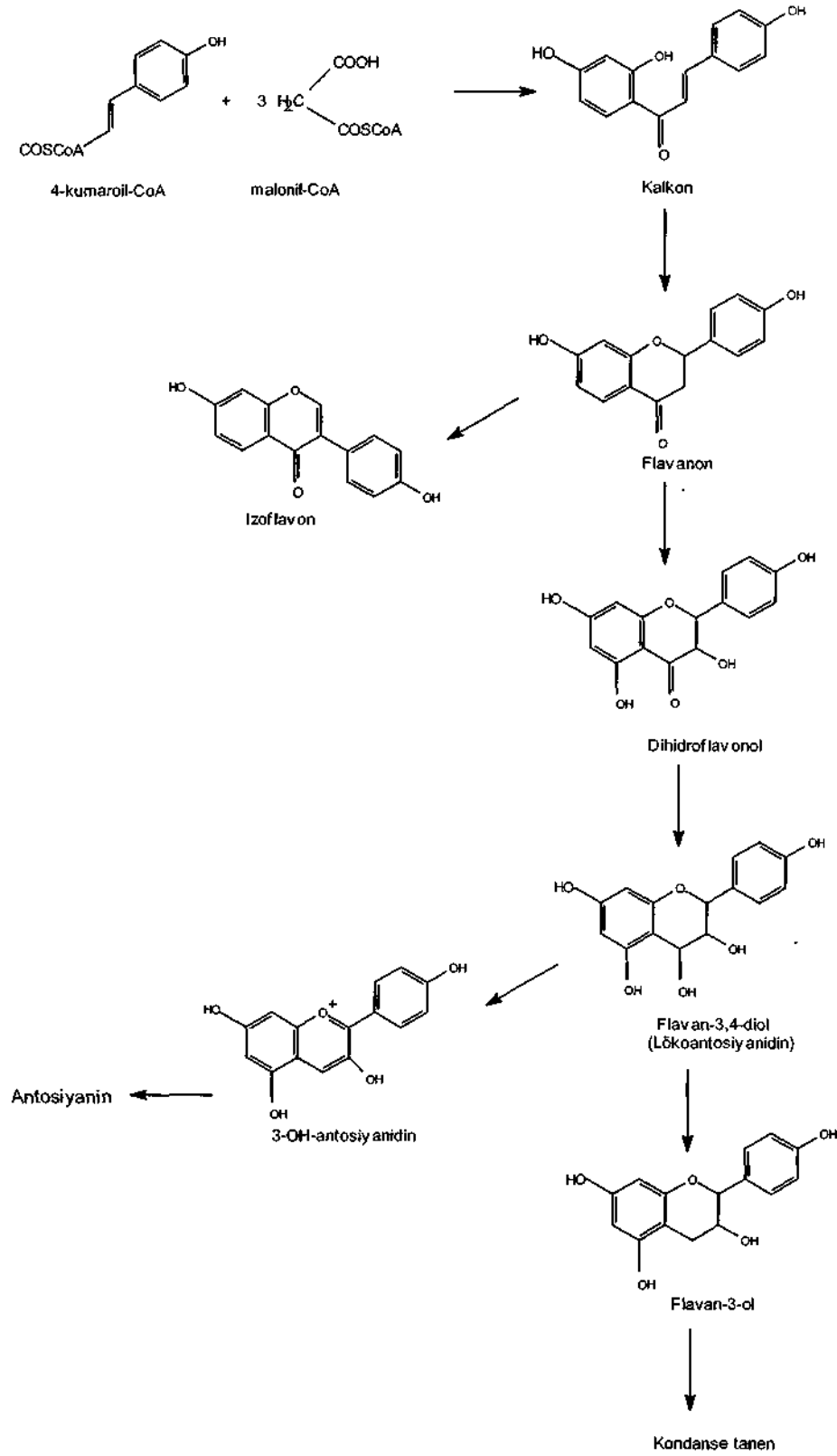
Kalkon

Pek çok flavonoit doğada flavonoit glukozitleri şeklinde bulunur ve karbohidrat süstitüsyonları genelde D-glukoz, L-ramnoz, glukoramnoz, galaktoz ve arabinozdur.

Bitkiler flavonoit içerikleri sayesinde kendilerini fungal parazitlerden patojenlerden ve oksidatif hücre yaralanmalarından korumaktadırlar. Bununla birlikte bu grup bileşiklerin, etkileyici renkleriyle böcek ve kuşların dikkatini çekerek bitki üremesindeki ekolojik önemi göz ardı edilemez. [Cook ve Samman, 1996; Heinrich ve ark., 2004).

1.4.1.1. Flavonoitlerin Biyogenezi

Flavonoitler bitkilerde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Bu bileşikler şikimik asit ve poliketit yolaklarıyla oluşurlar. Triketit başlangıç maddesi, kalkon sintaz enzimi ile kalkon halka yapısı oluşturur. Halkalanma, daha sonra flavanon çekirdeği taşıyan piranon halkasını oluşturur ve bu halka ya C₂-C₃ bağının okside olmasıyla flavonları ya da C₃ pozisyonu hidroksillenerek flavanol grubunu içeren piranol halkası oluşur. Flavonoller daha sonra okside olarak antosiyaninleri oluştururlar. Flavonoitlerin biyosentez yolağı **Şekil 3**'de verilmiştir [Winkel-Shirley, 2001].



Şekil 3: Flavonoit bileşiklerinin biyosentez yolağı

1.4.2. Terpenler

Terpenler doğada yaygın olarak bulunan bir gruptur ve 5 karbonlu izopren moleküllerinin kondensasyonu ile oluşmaktadırlar. Terpenler, çok fazla yapısal farklılık gösteren doğal bileşikler sınıfına çok uygun bir örnektir. Bu bileşik grubunda, en basit yapıyı , (C₅) 5 karbon ile hemiterpen'ler oluşturmaktadır. Ve karbon sayısındaki artışa göre, yani izopren sayısına göre, aşağıda belirtilen gruplar meydana gelmektedir.

<i>İzopren sayısı</i>	<i>Karbon sayısı</i>	<i>Sınıfı</i>
1	5	Hemiterpen
2	10	Monoterpen
3	15	Seskiterpen
4	20	Diterpen
5	25	Sesterterpen
6	30	Triterpen
8	40	Tetraterpen
N	(5C) _n	Politerpen

Şekil 4: Terpenlerin izopren sayılarına göre sınıflandırılması

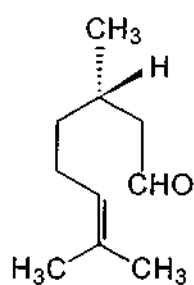
Bu gruplar içinde monoterpenler ve molekül ağırlığı düşük olan seskiterpenler, uçucu özellik gösterirken, molekül ağırlığı büyük olan seskiterpenler ve diğerleri (diterpen, sesterterpen, triterpen, tetraterpen ve politerpen) uçucu değildirler.

1.4.2.1. Monoterpenler

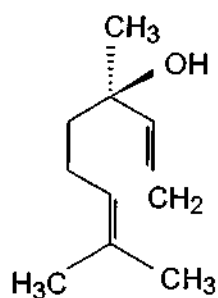
Şu anki rakamlara göre, doğada 1.000'dan fazla ve çoğu yüksek bitkilerden izole edilen monoterpen varlığı bildirilmiştir.

Monoterpenlerin karakteristik özelliği uçuculukları ve yoğun, keskin bir kokuya sahip olmalarıdır. Bitkilerin koku ve aromasından sorumlu, önemli bir bileşik grubudur. Bu yüzden, parfüm-koku sanayinde uçucu yağların üretimi açısından ve yiyecek sanayinde ise baharat üretimi açısından ticari önemi olan bileşikler bu grubu oluşturmaktadır [Pinder, 1960; Robbers ve ark., 1996].

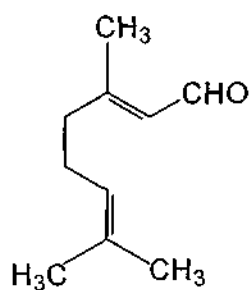
Monoterpenler yapısal olarak farklı tiplerde bulunmaktadır. Bunlar;

Asiklik*Mirkan sınıfı*

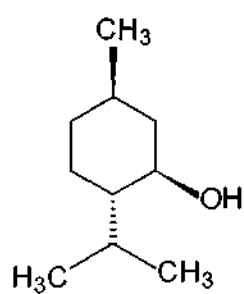
Sitronellal



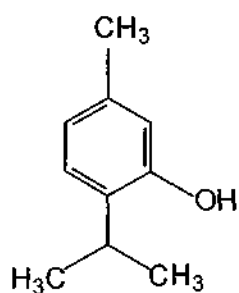
Linalol

Geranilan sınıfı

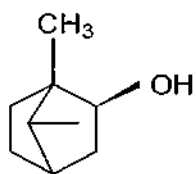
Geranial

Monosiklik*Mentan sınıfı*

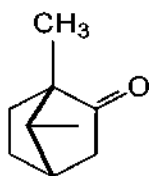
Mentol



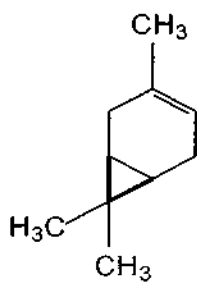
Timol

Bisiklik*Bornan sınıfı*

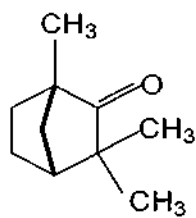
Borneol



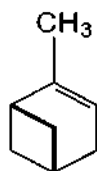
Kafur

Karan sınıfı

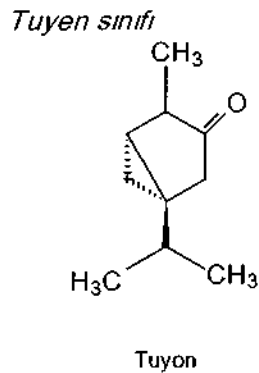
3-karen

Fenkan sınıfı

Fenkon

Pinan sınıfı

alfa-pinen



Biyosentetik orijinine göre yapılan son yıllardaki sınıflandırmasına göre monotерpenler 3 grupta toplanır. Bunlar;

1. Normal monotерpenler
2. Kuraldışı monotерpenler
3. İridoitler

Normal monotерpenlerin biyosentetik orijini GPP olarak bildirilmiştir. GPP'tan mono- ve bisiklik bileşiklerin oluşumunda, izomerizasyon – siklizasyon mekanizmasını kontrol eden monotерpen siklazlar yer almaktadır.

Kural dışı monotерpenler ise iki molekül DMAPP'nin çiftlenmesiyle oluşan krizantemil pirofosfattan meydana gelmektedir. Diğer kural dışı monotерpenler ise krizantemanın siklopropan halkasının parçalanmasıyla açıklanabilir; C₁-C₂ parçalanmasıyla santoninler, C₁-C₃ parçalanmasıyla artemisanlar oluşmaktadır.

İridanların karakteristik çekirdeğini oluşturan siklopentapiran'ın oluşumu, geraniol (veya nerol)'ün C₁₀ hidroksilasyonu ve oksidasyonu ile açığa çıkan aldehitin (10-okso geranial) siklizasyonu (iridodial, epi-iridodial) ile oluşmaktadır. Bazı durumlarda sitronellol prekürsör görevi görmektedir [Bruneton, 1999].

Monoterpenlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bakacak olursak; renksiz ve akışkan sıvılardır. Uçucu özellikleri fazla, düşük kaynama noktasına sahip bileşiklerdir. Fazlasıyla reaktif, düşük sıcaklıklarda bile oksidasyona (oksijen ile reaksiyona girmeye) eğilimli yapılardır [Clarke, 2002].

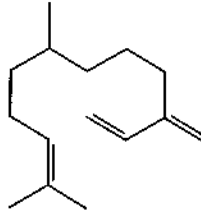
1.4.2.2. Seskiterpenler

Seskiterpenler doğada geniş yayılım göstermektedirler. Terpenlerin en büyük grubunu oluşturlar. Seskiterpenlerin molekül formülü C₁₅H₂₄'tür. Monoterpenlerden daha büyük molekül ağırlığına sahiptir ve bu yüzden yüksek kaynama noktasına sahip olup daha az uçucu özellik gösterirler. Oksidasyona eğilimleri mevcuttur fakat atmosferik oksijenle daha yavaş okside olurlar. Kuvvetli ve belirgin kokulara sahiptirler [Clarke, 2002].

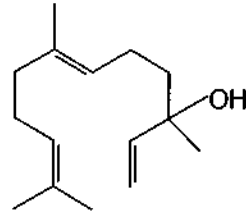
Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar içinde seskiterpenlere de rastlanmaktadır ve uçucu fraksiyonların farmakolojik özellikleri çoğunlukla bu bileşiklerden ileri gelmektedir [Bruneton, 1999b].

Bu bileşiklerin başlangıç ünitesi, Geranil pirofosfat (GPP) ile IPP molekülünün reaksiyonu ile oluşan farnesil pirofosfattır (FPP). FPP'nin siklizesasyonu ile değişik tipte seskiterpenler oluşmaktadır [Heinrich ve ark.,2004].

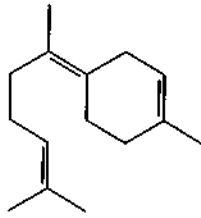
Bu bileşikler doymamışlık içerirler ve asiklik, monosiklik, bisiklik ve trisiklik olarak 4 gruba ayrılabilirler [Pinder, 1960). Bunlar;

Asiklik

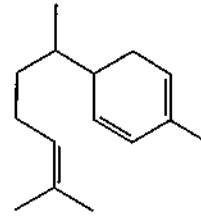
Beta-farnesen



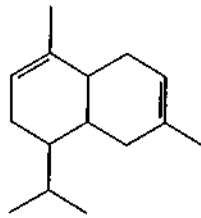
Nerolidol

Monosiklik

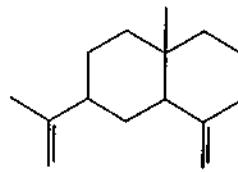
Bisabolen



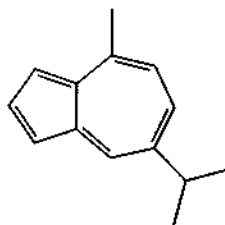
Zingiberen

Bisiklik*Naftalen türevleri*

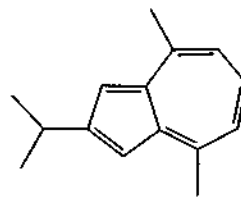
Kadinen



Seline

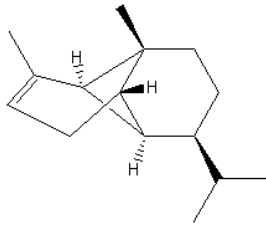
Azulen türevleri

Guaiazulen

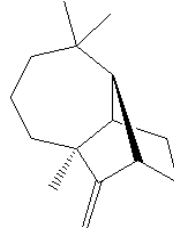


Vetivazulen

Trisiklik



alfa-kopaen



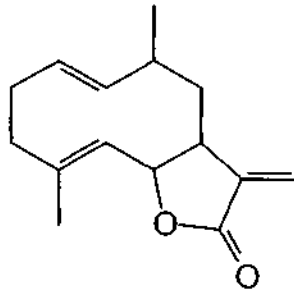
longifolen

Seskiterpenler biyogenezlerine göre tekrar sınıflandırılmışlardır ve buna göre;

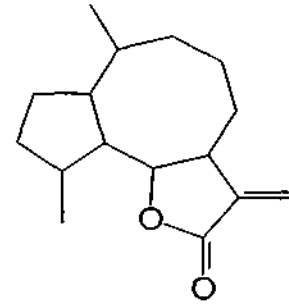
1. Bisabolan sınıfı
2. Humulan sınıfı
3. Germakran sınıfı
4. İresan sınıfı
5. Farnesen sınıfı olmayan (orijini bilinmeyen)

Seskiterpen laktonlar önemli biyolojik aktiviteleri olan fakat doğada sınırlı sayıda bulunan bileşik gruplarıdır. Uçucu özellik göstermezler. α -metilen γ -lakton yapısı içerirler. Pek çoğu ayrıca, α , β - doymamış karbonil ve epoksit grubu içermektedir. Bu fonksiyonel gruplar biyolojik nükleofiller için reaktif reseptör bölümleri olduğu için bu bileşikler için, antimikrobiyal, antitümoral aktivite gibi, çok farklı biyolojik aktiviteler rapor edilmiştir. Bu gruptan bazı bileşikler ise memeliler için oldukça toksiktir.

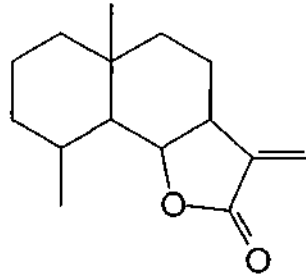
Seskitерpen laktonlar, içerdikleri karbosiklik iskelete bağlı olarak sınıflandırılırlar ve bu sınıflandırmada, germakranolit, ödezmanolit ve guanolit'ler olmak üzere 3 major gruptan söz edilmektedir [Robbers ve ark., 1996).



Germakranolit



Guanolit



Ödezmanolit

1.4.2.3. Diterpenler

Bu grup, 20 karbon atomu içeren, uçucu özelliği bulunmayan, geranil geranilpirofosfat türevi olan yaygın olarak bitkilerden kısmen de ağaçların reçinelerinden elde edilen doğal bileşikleri içermektedir. Bu bileşiklerin sınıflandırılması taşıdıkları halka yapısına göre yapılmaktadır. Buna göre;

1. Asiklik diterpenler
2. Monosiklik diterpenler
3. Bisiklik diterpenler
 - a. Labdanlar ve Halimanlar
 - b. Kolensan, Klerodanlar ve Neoklerodanlar
4. Trisiklik diterpenler
 - a. Abietanlar
 - b. Pimaranlar, Devadaranlar ve Parguaranlar
 - c. Kleistantanlar
 - d. Voakapanlar ve Kasanlar
 - e. Totaranlar ve Nagilaktonlar
 - f. İzokopalanlar ve spongianlar

(CPR Press, 2002].

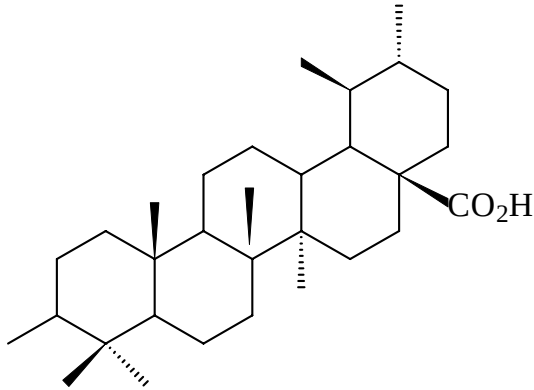
1.4.2.4. Sesterterpenler

25 karbon atomu içeren doğal bileşikler sınıfını oluşturmaktadırlar. Çoğunlukla deniz canlılarında, fungus ve bitkilerde rastlanmaktadır. Genellikle trisiklik yapıda bulunan ve geranil farnesil pirofosfat'tan oluşan yapılardır [Biology-Online, 2006].

1.4.2.5. Triterpenler

C₃₀ terpenler, altı izopren ünitesinden oluşan ve biyosentetik olarak squalen'den türeyen bileşiklerdir. Yüksek kaynama noktasına sahip, renksiz katı yapıdadırlar. Bu bileşik grubunu 3 ana grupta toplamak mümkündür.

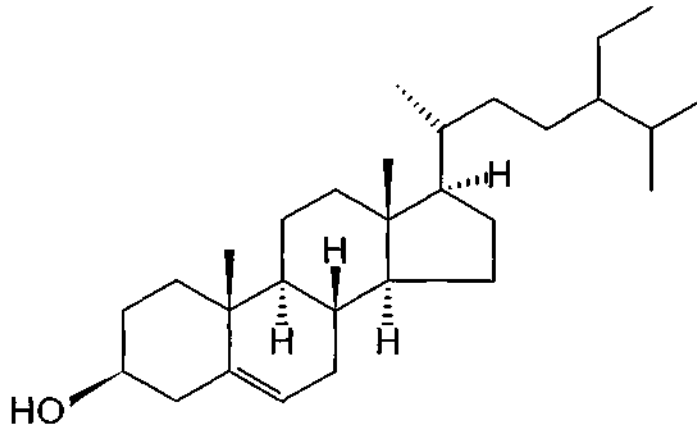
Sadece birkaç genel triterpen bitkiler aleminde yaygın olarak bulunmaktadır. Bunlar, amirenler, ursolik asit ve oleanik asittir.



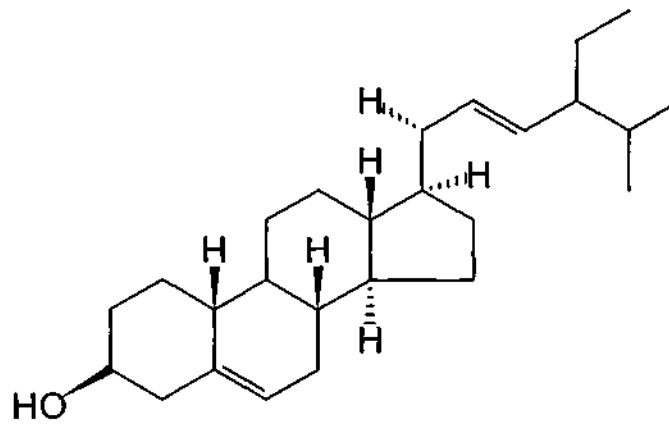
Ursolik asit

1.4.2.6. Steroller

Steroller ya da diğ er adıyla steroid alkoller, C₂₇ 'de hidroksil içeren steroitlerdir. Hem hayvanlarda hem de bitkilerde yaygın olarak bulunan bu grup bileşikler, beyaz toz şeklinde ve alkolde iyi     nmektedirler. Bitkilerde bulunan sterollere, fitosterol ya da diğ er adıyla bitki sterolleri denmektedir. Bu gruba ait önemli bileşiklere örnek olarak;  -sitosterol ve stigmasterol verilebilir.



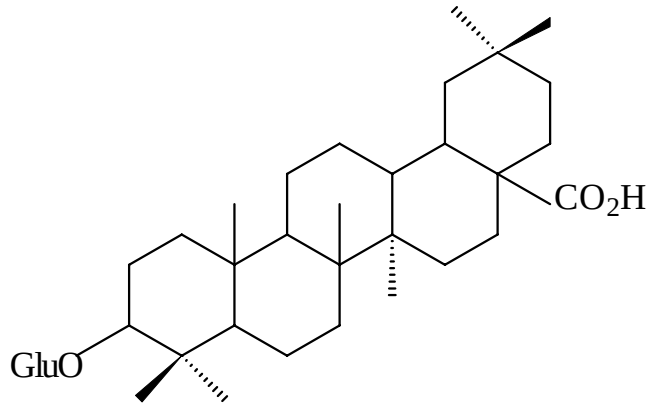
 -sitosterol



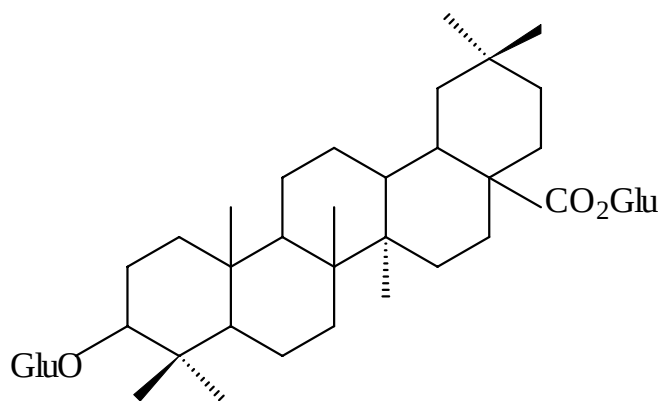
Stigmasterol

1.4.2.7. Saponinler

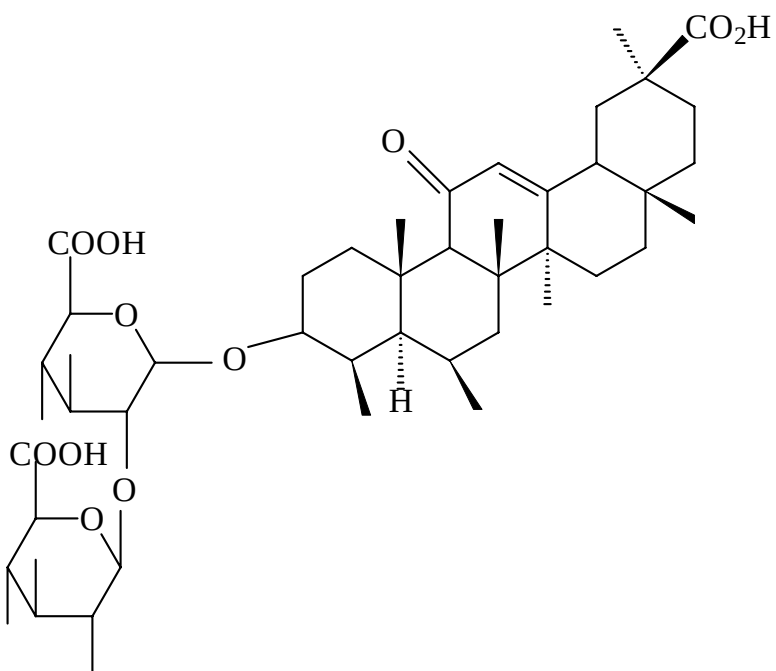
Saponinler, sterol ya da diğ er triterpenlere bağlanan şeker grubu içeren, yüksek molekül ağırlığına sahip, triterpen glukozitleridir. Bitkiler aleminde yaygın olarak bulunurlar ve iki gruptan oluşur; aglikon ve şeker. Deterjan özelliğine sahip, acı lezzetli, suda köpüren bileşikleridir. Saponinler, bağlanan şeker artığının sayısına bağlı olarak, mono-, bi-,...- polidesmotik olarak isimlendirilebilirler[Kaufman ve ark., 1999; Wikipedia, 2006].



Monodesmotik



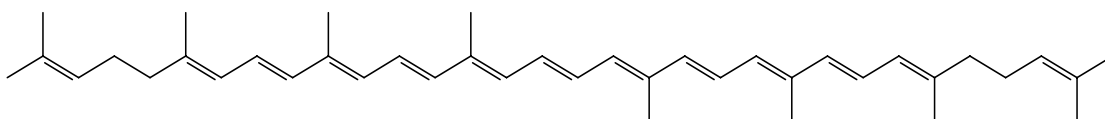
Bidesmotik



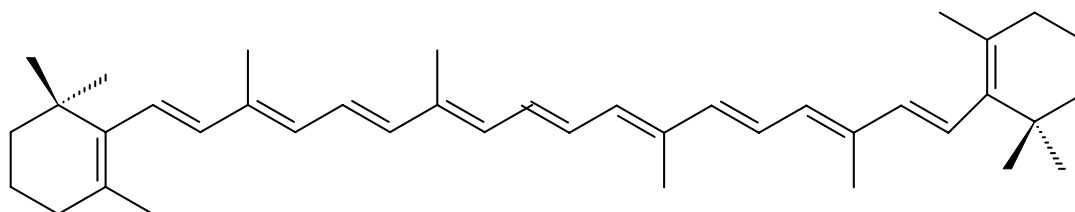
Glisirinizik asit

1.4.2.8. Tetraterpenler

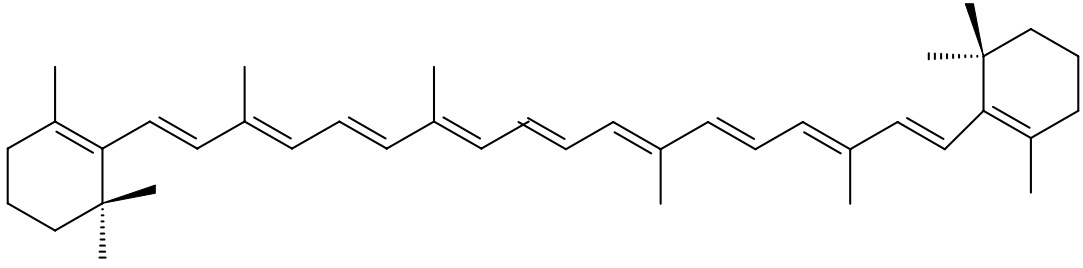
Sekiz izopren molekülünden oluşan bu bileşikler karotenoitler olarak ta bilinmektedir. Karotenoitler, genelde likopen türevi bileşiklerdir. Likopenin bir ucunun halkalanmasıyla γ -karoten, her iki ucun halkalanması ile de bitkilerde sıklıkla bulunan β -karoten bileşiği oluşmaktadır. Bu bileşikler, bitkilerde hem fotosentez için gerekli pigmentlerin hem de meyvaların, çiçeklerin renklenme ajanlarının oluşmasına hizmet eden önemli bir gruptur. Bu renklenme sarıdan kırmızıya kadar değişen renklere olmaktadır. Ayrıca bu bileşiklerin, klorofiller gibi diğer ışığı absorblayan pigmentlerin katalizlediği oksidasyondan bitkileri koruduğuna inanılmaktadır. Biyolojik olarak önemli olan tetraterpenlere örnek olarak; asiklik likopen, monosiklik γ -karoten ve bisiklik α -ve β -karotenler verilebilir [Robbers ve ark., 1996; Wikipedia, 2006].



Likopen



β-karoten



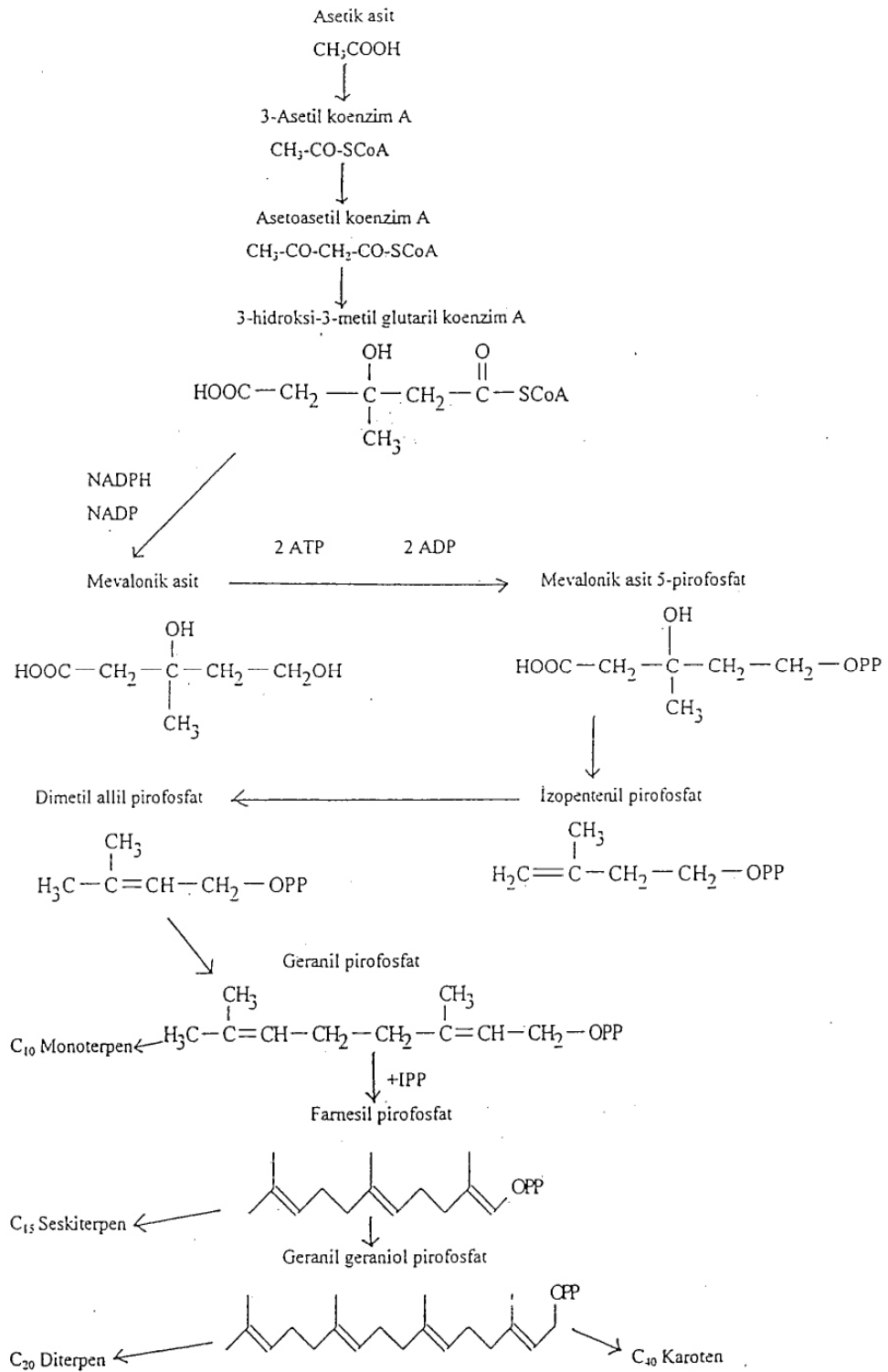
α -karoten

1.4.2.9. Politerpenler

Bu grup, pek çok izopren molekülü içeren uzun zincirli bileşiklerden oluşmaktadır. Doğal kauçuk, çifte bağları cis- konumunda olan poliizoprenlerden oluşmaktadır ve politerpenler için önemli bir örnektir [Clarke, 2002; Wikipedia, 2006].

1.4.2.10. Terpenlerin Biyogenezi

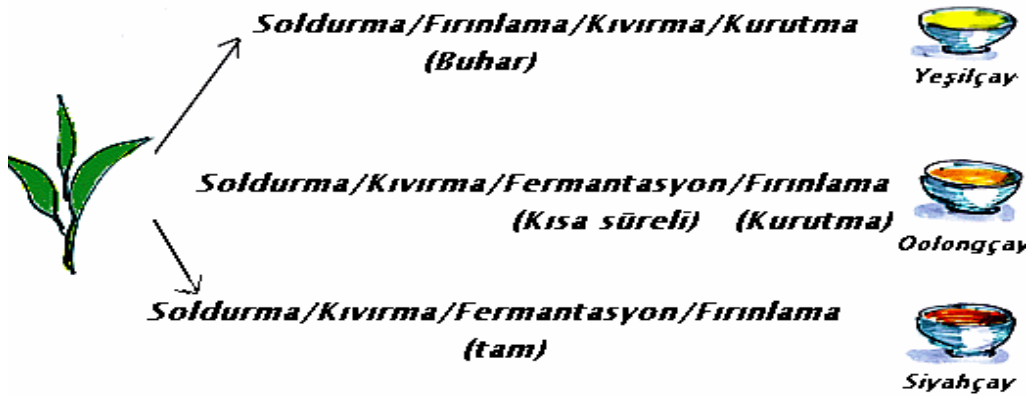
Terpenlerin biyosentez yolakları, üç mol asetik asitin kondensasyonu ile oluşan mevalonik asitle başlar. Mevalonik asitin 2 mol ATP ile fosforlanması sonucu izopentenil pirofosfat yapısı oluşur. İzopentenil pirofosfat yapısının izomeri olan dimetil alil pirofosfattan geranil pirofosfat oluşur ve bu bileşik monoterpenlerin prekürsörüdür. Geranil pirofosfat'a izopentenil pirofosfat katımıyla farnesil pirofosfat meydana gelir ki bu bileşikten seskiterpenler, steroller ve triterpenler oluşur. Farnesil pirofosfatın izopentenil pirofosfatla kondensasyonu ile de geranil geranil pirofosfat oluşur ki bu bileşikte diterpenlerin ve karotenlerin prekürsörüdür [Robbers ve ark, 1996]. Terpenik bileşiklerin biyosentez yolağı **Şekil 5**'te görülmektedir.



Şekil 5: Terpenik grupların biyosentez yolağı

1.5. *C. sinensis* Bitkisinden Elde Edilen Ticari Ürünler ve Elde Ediliş Yöntemleri

C. sinensis bitkisinin tepe tomurcuğu, onu takip eden iki yaprak ve bunlarla bitişik taze sap kısımlarından, fermentasyon derecesinin değiştirilmesine ve taze yapraklarda bulunan polifenollerin oksidasyonuna bağlı olarak, birbirlerinden tamamen ayrı kimyasal kompozisyona sahip, değişik tip çayların elde edildiği bilinmektedir. Yani kullanılan üretim tekniği, elde edilen çayın tipini belirlemektedir. Farklı çay tiplerinin eldesinde kullanılan üretim teknikleri, enzimatik oksidasyon (fermentasyon) açısından birbirlerinden farklılık göstermektedir. **Şekil 6'** da farklı tiplerdeki çayların elde ediliş yöntemleri görülmektedir. Ülkemiz şartlarında çay hasadı, iklim şartlarına bağlı olarak, Mayıs ayı başında başlayıp, Ekim ayında sona ermektedir. Bitki iki yaprak ve tomurcuğunun hasat zamanı elde edilen ürün kalitesini etkilemektedir. Hasadın erken ya da geç yapılması gerekir.



Şekil 6: *Camellia sinensis* bitkisinden elde edilen ticari ürünler ve elde ediliş yöntemleri

1.5.1. Yeşil Çay Üretim Tekniği

Yeşil çay üretimi, özellik ve işlenme yönünden siyah çay üretiminden farklıdır. Fabrikaya gelen iki buçuk çay yaprağı doğrudan kısa bir süre içinde yüksek sıcaklıkta şok soldurmaya tabi tutulmakta ve böylece tüm yükseltgenme enzimlerinin inaktif hale geçmelerini sağlamaktır böylece çay yaprakları yeşil renklerini korumaktadır.

Dünya da bilinen temelde iki tip yeşil çay üretimi olup, bunlar Japon ve Çin metodu yeşil çay üretimleridir. Ancak her iki üretiminde çok sayıda farklı versiyonları bulunmaktadır. Genel olarak yeşil çay üretimini ele alacak olursak;

Havalandırma: Havalandırma işlemi, hasat edilen ve yeşil çay üretimi için fabrikalara çekilen yaş çayın üretime alınmasında gecikme olduğu zamanlarda; çayların soğuk hava verilen teknelere alınıp, oksidasyona engel olunması için yapılır.

Şoklama: Çay yaprağının daha iyi kıvrılması ve sonraki aşamalarda okside olmasını önlemek amacıyla çayın içindeki enzimlerin inaktif hale getirilmesi için yapılır. Bu işlem iki türlü olabilmektedir.

- Birincisi, kendi eksenini etrafında dönen şok soldurma cihazına 15-20 saniye 120-150° C kuru sıcak hava verecek şekilde yapılır. Kuru sıcak hava vermek şeklinde şoklama daha sonraki aşamalarda meydana gelebilecek olumsuzlukları asgariye indirmek için tavsiye edilir.
- İkincisi, buhar kazanlarından elde edilen çayın tazeliğine göre 90-110° C arasında ayarlanabilecek sıcaklıkta buharın tercihen kapalı bir tunelde 3-5 dakika arasında yaş çaya verilmesiyle olur.

Her iki durumda da, polifenol-oksidad enzimi inaktive edilir.

Soğutma - Biriktirme: Buharlama özellikle şoklama yoluyla yapıldıysa, soğutma önem kazanır, burada amaç, yaş yaprak cıdarlarına yapışan suyun uzaklaştırılmasıdır. Şoklanmış yapraklara 30°C civarında kuru hava verilerek işlem gerçekleştirilir.

Yaş çayın kıvırmalarda eşit zamanda kıvrılması gerekir, şoklamadan direkt çıkan çayın kıvrımayı 2-3 dakikalık bir sürede doldurması beklenilemez. Eğer çay kısa bir müddetde kıvırmalara verilmezse bazı çaylar Oolong çaya dönüşecektir, bu duruma engel olabilmek için bir kıvırmalık olacak kadar yaş çayın birikeceği, kızışmanın olmayacağı soğutma-biriktirme aşamasının olması gerekmektedir.

I.Kıvrma: Şoklanan çaylar 15-20 dakika süreyle birinci kıvrma işlemine tabi tutulurlar. Burada ilk şekillenme oluşur. Kıvırmaların küçük olması, işlem sırasında tercih edilmektedir.

I.Kurutma: Kıvırmadan alınan ve havalandırılmak üzere elenen çaylar giriş sıcaklığı 55°C olan klasik yaş çay fırınlarda kurutulur. Bu sıcaklık döner fırın kullanılıyorsa 80-90°C'ye kadar çıkabilir. Bu işlemlerin yapılmasındaki amaç, çayın nem oranını %20-25 dolaylarına indirmek, oksidasyonun başlamasına engel olmaktır.

II. Kıvrma: Fırınlardan indirilen çaylar 20 dakika süreyle ikinci kıvrma işlemine tabi tutulur. Bu süre şekillenme isteğine göre bir müddet daha uzatılabilir.

II. Kurutma: Kıvrma işleminden geçirilen çaylar, 70-75 kg'lık döner fırınlarda 110-120°C sıcaklıkta 50-60 dakika süreyle kurutulurlar ve böylece çaydaki nem oranını %-3-5 seviyelerine düşürmektir.

Tasnif: İlk aşamada çaylar lif tutucularından geçirilerek lif ve çöplerinden ayrılır. Daha sonra tiplerine göre ayrılır. Tiplerine ayırma işlemi partikül büyüklüğünden çok partikül ağırlığına göre yapılmalıdır bunun içinde winnower tipi ayırıcılar kullanmalıdır. [Demet, 2006].

1.5.2. Siyah ay retim Tekniği

Siyah ay, *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze türünün yaş çay yaprağı (iki yaprak), tomurcuk ve bunlarla bitişik taze sap kısımlarının uygun yöntemlerle işlenmesiyle elde edilen üründür.

Soldurma: Taze ay yaprağının bünyesinde bulunan %70-80 oranındaki suyun soldurma ünitelerinde traflara 32°C sıcak hava verilerek %60-65 düzeyine indirilmesiyle yaprağın esnekliğinin artması ve kıvrıma uygun hale gelmesi işlemdir.

Kıvrırma: Solmuş ay yaprağının değişik çay imalat makinalarında parçalanması, ezilmesi ve bükülmesi ile hücre zsuyunun kıvrılmış yaprak yüzeyine yayılması ve oksidasyonun başlaması işlemdir.

Fermentasyon: Soldurmadan sonra uygulanan kıvrırma işlemi anında yaprak hücrelerinin ezilip parçalanması sonunda ağa çıkan hücre zsuyundaki polifenollerle enzimler oksijen karşısında tepkimeye girerek fermentasyon denilen yükseltgenmenin (oksidasyonun) gerçekleşmesini sağlar. Bunun sonucunda siyah çayın niteliği üzerinde önemli etkilere sahip olan teaflavinler ve tearubigenler oluşarak, içilen çayın renk, burukluk, parlaklık, aroma ve kalitesi meydana gelmektedir.

Kurutma: Fermentasyonu tamamlanan kıvrılmış çay yapraklarının, 95-100°C sıcak hava verilerek kurutma fırınlarında %3-4 rutubete kadar kurutulması işlemdir.

Tasnif ve Ambalajlama: Tasnif, fırından çıkan yarı mamül çayın tasnif eleklerinden elenerek, farklı büyüklükteki tip ve kalitelerinin birbirinden ayrılması işlemdir [Gündoğan, 2006].

C. sinensis bitkisinden elde edilen ticari ürünler arasında dünyada yaygın olan ve en çok tüketilen ürün siyah çaydır. Bitki toplandıktan sonra, soldurma ve kıvrma işlemlerinden sonra bitkinin yapraklarında bulunan polifenol oksidaz enziminin etkisiyle fermentasyon olarak isimlendirilen oksidatif polimerizasyon gerçekleştirilir. Böylece taze yaprakta bulunan kateşin ve diğer polifenollerin polimerize olması ve teaflavin ve tearubigen olarak bilinen, kırmızıdan kahverengiye değişen renklerde bileşiklerin oluşması sağlanır. Bu bileşikler siyah çayın karakteristik rengini oluşturmaktadır. Oolong çaylar ise, kırmızı veya sarı renkte olup, bitki yapraklarının kısmi fermentasyonu ile elde edilmektedirler. Oysaki yeşil çay hiç fermente edilmemektedir. Hasattan hemen sonra, enzimatik oksidasyonu engellemek için fırınlama veya terletme yöntemi kullanılarak enzim etkisi inaktive edilmektedir. Bu yüzden, yeşil çayın ve taze bitkinin kimyasal kompozisyonun birbirine yakınlık gösterdiği bildirilmiştir [McKenna ve ark. 2002).

1.6. *Camellia sinensis* Üzerinde Yapılan Kimyasal Çalışmalar

1.6.1. Yeşil Çay Üzerinde Yapılan Kimyasal Çalışmalar

1.6.1.1. Yeşil Çay Polifenolleri

Yeşil çayda bulunan polifenoller, 5 ana grupta toplanabilirler; flavanoller, flavonoller, antosiyaninler, flavonlar ve fenolik asitler [Chen ve ark.,2002).

a.Flavanoller (Kateşinler)

Yeşil çay, major polifenolik bileşikler olarak kateşinleri içermektedir. Bu grup bileşikler, yeşil çayın antioksidan ve buna bağlı antikarsinojenik etkisinden sorumlu flavan-3-ol yapısındaki bileşikleridir. Taze çay yapraklarının 4 major kateşin içerdiği: epi-kateşin, epi-kateşin gallat, epi-gallokateşin ve epi-gallokateşin gallat, renksiz ve suda çözünen bu bileşiklerin yeşil çay infüzyonunun hafif astrenjan ve acı lezzetinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak, kateşin ve gallokateşinin de çay yapraklarında varlığı az miktarda da olsa tespit edilmiş ve ayrıca yaprakta varlığı tespit edilen kateşin gallat ve gallokateşin gallat bileşiklerinin doğal olarak bulunmadığı, rasemizasyon ürünü oldukları yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. [Balentina ve ark., 1997;Harbowy ve Balentina, 1997;Arce ve ark., 1998].

Günümüzde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), uçucu olmayan çay bileşiklerinin araştırılmasında ve rutin analizinde en çok kullanılan yöntemdir. Çayla ilgili yapılan çalışmaların çoğunda bu yöntem kullanılmakla beraber, nadir de olsa farklı yöntemler kullanılmıştır.

Farklı 9 ticari yeşil çay örneğinin flavanollerini üzerinde yapılan bir HPLC çalışmasında, C₁₈ µ-Bondopak kolon ve mobil faz olarak da asetik asit:metanol:dimetilformamit:su (1:2:40:157) kullanılarak UV-Visible dedektörde 280 nm'de çalışılmış ve sonuçta; yeşil çay örneklerinden hazırlanan infüzyonlarda, teşhisi yapılan ve miktarı saptanan flavanoller; epi-kateşin gallat (%0,5-0,91), epi-kateşin (%0,87-2,00), epi-gallokateşin gallat (%2,19-3,95) ve epi-gallokateşin (% 2,75-5,44), olarak bulunmuştur [Price ve Spitzer, 1993].

Amarowicz ve Shahadi, ticari yeşil çay örneğinden su:kloroform (1:1, h/h) ve su:etil asetat (1:1, h/h) solvan sistemleri kullanarak karşı akımlı kromatografi tekniği ile kateşinleri saflaştırmış ve elde edilen saf kateşinleri Sephadex-LH 20 kolonuna etanol ile uygulayarak bu bileşiklerin ayırımını sağlamışlardır. Ayrılan fraksiyonlar içinde epi-kateşin, epi-kateşin gallat, epi-gallokateşin ve epi-gallokateşin gallat'ın diğer polifenolik bileşiklerden ayırımını, HPLC yöntemi ile C₁₈ kolonda ve su:asetonitril:metanol:asetik asit (79.5:18:2:0.5, h/h/h/h) mobil fazını kullanarak daha hızlı ve daha iyi sağladıklarını bildirmişlerdir [Amarowicz ve Shahadi, 1996].

Goto ve arkadaşları kalitelerine göre farklılık gösteren 4 ticari yeşil çay örneğinden hareketle elde ettikleri asetonitril: su (1:1, h/h)'lu eksterelerin, HPLC'de ODS kolon kullanarak, su:asetonitril:fosforik asit mobil faz sisteminde kateşinlerin miktar tayinini yapmışlar ve sonuçta; epi-kateşin (%0,45-1,11), epi-gallokateşin (%1,64-4,39), epi-kateşin gallat (%1,45-1,73) ve epi-gallokateşin gallat (%5,94-9,26)'ın varlığını tespit etmişlerdir [Goto ve ark., 1996].

1997 yılında yapılan diğer bir HPLC çalışmasında ise, Inertsil-ODS-2 kolon ve mobil faz olarak (A: %5 asetonitril, B: fosfat tamponunda (0.025M, pH:2.4) %25 asetonitril) linear gradient uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda, Japonya ve Çin olmak üzere farklı kaynaklı iki yeşil çay örneğinin infüzyonunun içerdiği kateşinler; epi-gallokateşin (163-287 mg/l), epi-kateşin (47-94 mg/l), epi-gallokateşin gallat (263-408 mg/l), epi-kateşin gallat (44-59 mg/l) olarak belirtilmiştir. Japonya kaynaklı yeşil çay numunesinin Çin kaynaklı numuneye nazaran daha yüksek oranda flavan-3-ol yapılarını içerdiği tespit edilmiş ve yine aynı çalışmada her iki örnekten hazırlanan infüzyonların kateşin içermediği belirtilmiştir. [Khokhar ve ark., 1997]

Brooner ve Beccher, HPLC yöntemi kullanarak Tayvan kaynaklı yeşil çaydan hazırlanan infüzyondaki kateşin miktarlarını, gradient elusyon sistemiyle farklı üç mobil faz kullanarak C₁₈ kolonda tespit etmişlerdir. Bu çalışmada mobil faz olarak; asetonitril:sulu asetat tamponu, metanol:sulu asetat tamponu ve asetonitril:sulu askorbat tamponu kullanılmıştır. Pik alanları 210 nm'de ölçülmüştür. Sonuçta, bu iki araştırmacının, farklı iki ekstraksiyon zamanı kullanarak - 3 dakika ve 20 dakika- elde ettiği verilere göre; yeşil çayın sırasıyla, epi-gallokateşin (2-4mg/dl), epi-kateşin (1-2 mg/dl), epi-gallokateşin gallat (6-9 mg/dl) ve epi-gallokateşin gallat (3-5 mg/dl) içerdiği bildirilmiştir. 20 dakikalık ekstraksiyon süresi kullanıldığında ise daha verimli sonuç elde edildiği kaydedilmiştir. Buna ek olarak, kullanılan mobil faza askorbik asit ilave edildiğinde pik şekillerinde gözle görülür bir iyileşme gözlenmiş olduğu araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır [Brooner ve Beecher, 1998].

1998 yılında yapılan başka bir çalışma ile ABD’da kültürü yapılan yeşil çay numunesinden hareketle hazırlanan infüzyonunda bulunan kateşinlerin miktarları ve en iyi ayırımın gerçekleştiği koşullar tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; mobil faza asit ilavesiyle pik şekillerinde belirgin bir düzelme gözlemlendiği bildirilmiş ve aynı infüzyonda 6 kateşinin tespiti ve miktar tayinleri yapılmıştır. Sonuçta örneğin, kateşin (0,6 mg), gallokateşin gallat (0,621 mg), epi-kateşin gallat (3,15 mg), epi-kateşin (3,76 mg), epi-gallokateşin (15,4 mg) ve epi-gallokateşin gallat (21,7 mg) içerdiği bildirilmiştir [Dalluge ve ark., 1998] .

Baptista ve arkadaşları, farklı 6 ticari yeşil çay örneğinden hareketle yeşil çay polifenol ekstresini elde etmişler ve en iyi verime sahip olan örneğe ait olan ekstrenin içindeki bileşiklerin tespiti ve miktarlarını HPLC yöntemi ile araştırmışlardır. En iyi sonucu, Ultrapac Spherisorb ODS kolonda ve asetonitril: etil asetat:%0,1’lik o-fosforik asit (8.5:2:89.5, h/h/h) mobil fazında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Buna göre; incelenen örneklerde total yeşil çay polifenollerinin %74,5’ini epi-kateşin türevi bileşiklerin oluşturduğunu ve bu oranın %47,9’unu epi-gallokateşin gallat, %13,2’sini epi-gallokateşin, %7,7’sini epi-kateşin gallat’ ve %5,7’sini epi-kateşin’inin meydana getirdiği belirtilmiştir [Baptista ve ark., 1998].

1998 yılında yapılan bir çalışmada ticari yeşil çaydan hazırlanan infüzyonun içerdiği polifenollerini tespit etmek amacıyla miselli elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemi kullanılmış ve incelenen örnekte kateşin, epi-kateşin, epi-kateşin gallat, epi-gallokateşin ve epi-gallokateşin gallat varlığı tespit edilmiştir [Larger ve ark., 1998].

Kapiler elektroforez (CE) tekniği kullanılarak çay kateşinlerinin miktar tayini ve ayırımı yapılmış olan çalışmalar da bulunmaktadır. Kapiler zon elektroforez (CZE) ve miselli elektrokinetik kapiler kromatografi (MECC) yöntemleri kateşinlerin tespit edilmesinde tercih edilen kapiler elektroforez tekniklerindendir. Kullanılan CZE metotlarında genelde borat tamponu tercih edilmiş ve 5 kateşinin de (kateşin, epi-kateşin, epi-gallokateşin, epi-kateşin gallat, epi-gallokateşin gallat) ayırımının yeterli düzeyde olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. MECC yöntemlerinin tamamında kateşinlerin ayrılması için sodyum dodesil sülfat (SDS) miselleri ve borat tampon çözeltisi kullanıldığı ve ayırımın başarılı olduğu kaydedilmiştir [Horie ve ark., 1997; Arce ve ark., 1998; Larger ve ark., 1998; Dalluge ve Nelson, 2000 ; Horie ve Kohata, 2000].

2000 yılında Wang ve arkadaşları, Çin kaynaklı yeşil çay numunesinin kateşinlerinin HPLC analizinde izokratik elüsyon sistemi geliştirmişlerdir. Ayırım tekniğinde C₁₈ ters faz kolon metanol:su:o-fosforik asit (20:79.9:0.1) ve UV detektör (210 nm ve 280 nm) kullanıldığında farklı 5 yeşil çay numunesinde kateşin (0-1,41 mg/100ml), gallokateşin (0,40-3,05 mg/100ml), epi-kateşin (0-9,54 mg/100ml), gallokateşin gallat (0-0,91 mg/100ml) epi-kateşingallat (1.19-5.03 mg/100 ml) ve epi-gallokateşin gallat (0.95-32.6 mg / 100 ml) varlığı tespit edilmiştir [Wang ve ark., 2000].

Lee ve Ong, Singapur'dan satın aldıkları ticari yeşil çay örneklerinden hazırlanan infüzyonların kateşin içeriklerini HPLC ve CE yöntemlerini de kıyaslayarak tespit etmeye çalışmışlar ve sonuçta; yeşil çay numunelerinin yüksek konsantrasyonda epi-kateşin, epi-kateşin gallat, epi-gallokateşin ve epi-gallokateşin gallat içerdiğini ve her iki analiz yönteminde de birbirine yakın sonuçlar bulduklarını bildirmişleridir. Ayrıca bu iki yöntemin polifenol teşhis ve miktar tayini için yeterli hassasiyete sahip olduğu fakat CE ile yapılan

analizlerin daha hızlı sonuç verdiğini belirtmişlerdir [Lee ve Ong, 2000]

2002 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise ABD-Boston'daki Çin mahallesine ait lokal bir marketten satın alınan farklı 4 yeşil çay numunesi %80'lik metanol ile 3 saat boyunca ekstre edildikten sonra, %0.15 HCl içeren %80'lik metanol ile 3 saat boyunca tekrar ekstre edilmiş ve ekstreler distile-deiyonize su ile seyreltilmiştir. Daha sonra C₁₈ gard kolon ve C₁₈ ters faz kullanılarak su:asetik asit (97:3, h/h) ve metanol ile gradient sistemde ve 280 nm'de HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçta; örneklerde epi-kateşin 6,60-10,30mg/g, epi-kateşin gallat 11,3-21,8 mg/g, kateşin gallat 0-0.81 mg/g, epi-gallokateşin 27,6-37,6 mg/g ve epi-gallokateşin gallat 51,1-62,4 mg/g tespit edilmiştir [Zuo ve ark., 2002].

Yapılan bir HPLC çalışmasında, farklı ticari yeşil çay örneklerinden infüzyon hazırlanarak, C₁₈ kolon ve su:asetonitril:formik asit (94.7:43:1, h/h/h) ve su:asetonitril:formik asit (49.5:49.5:1, h/h/h) mobil faz gradient elüsyon tekniği kullanılarak kateşin miktarları tespit edilmiş ve yeşil çay infüzyonunda epi-gallokateşin (157,6 µg/ml-489,6 µg/ml) ve epi-gallokateşin gallat (136,8µg/ml-714,7µg/ml) bileşiklerinin yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir [Fernandez ve ark., 2003].

2003 yılında yapılan bir diğer çalışmayla Yakın Infrared Spektroskopi (NIR) tekniği kullanılarak, çoğu Çin kaynaklı 34 tip ticari yeşil çay örneğinde epi-kateşin ve epi-gallokateşin gallat miktarının tespit edilip edilemeyeceği araştırılmış ve bunun için öncelikle HPLC analizinde C₁₈ kolon ve gradient elüsyon tekniği (%0,05 trifloroasetik asit içeren su ve %0,05 trifloroasetik asit içeren asetonitril) kullanılarak örneklerin bu iki bileşiği ne kadar içerdiği tespit edilmiştir. Daha sonra NIR yöntemi kullanılarak elde edilen veriler önceki yöntemle kıyaslanmış; epi-gallokateşin gallat bileşiğinin yeşil çay örneklerinde fazla miktarda bulunmasına bağlı olarak NIR ile

miktar tayinin başarılı bir şekilde yapılabilirdi fakat örneklerde çok daha az miktarda bulunan epi-kateşin'in NIR tekniği kullanılarak yapılan miktar tayini çalışmalarında hatalı sonuçlar elde edildiği vurgulanmıştır [Luypaert ve ark., 2003].

Çin kaynaklı yeşil çay yaprakları ve çiçeklerinden hazırlanan ve özellikle Çin'de tüketilen jasmin yeşil çay örneklerinin polifenol içerikleri, %75'lik etanollü ekstraktlar hazırlanıp Cosmosil 5 C₁₈ kolon kullanılarak, izokratik sistemde HPLC yöntemiyle araştırılmış ve polifenol içeriği açısından çay çiçeklerinin çay yapraklarına kalitatif açıdan benzediği fakat kantitatif farkların mevcut olduğu saptanmıştır. Buna göre; çay bitkisinin çiçeklerinin, yapraklara oranla özellikle epi-gallokateşin gallat içeriği yönünden farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Ve yine aynı çalışmada, yeşil çay numunesinin taze çay yapraklarına nazaran total kateşin miktarının daha fazla olduğu vurgulanmıştır. Buna neden olarak ta, üretim aşamasında dahi kateşin biyosentezinin devam etmesi gösterilmiştir [Lin ve ark., 2003].

2004 yılında Endonezya kaynaklı yeşil çay numunesi üzerinde C₁₂ ters faz kullanılarak yapılan LC-MS çalışmasına göre, yeşil çay infüzyonunun 270 mg/l kateşin, 361 mg/l epi-kateşin gallat, 383 mg/l gallokateşin, 1255 mg/l epi-gallokateşin gallat, 1565 mg/l epi-gallokateşin içerdiği belirlenmiştir [Del Rio ve ark., 2004]

Pelillo ve arkadaşları, İtalya'dan sağladıkları yeşil çay ekstraktlarının analizinde RP-HPLC (Ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) yönteminde ile iç çapı 3 mm ve 4,6 mm olan C₁₈ kolonlarındaki ayırım mukayese etmişler ve iç çapı daha küçük olan kolon kullanıldığında ayırımın daha iyi olduğunu ve HPLC sistemi içinde daha düşük basınca ihtiyaç duyulduğunu tespit etmişlerdir. Kateşinlerin teşhis ve miktar tayini çalışmasında UV-DAD (ultraviyole-diode array dedektör) ve API-ES-MS (atmosferik basınç elektrospray iyonizasyon- mass spektroskopisi) denendiğinde, UV ve MS

dedektörlerinin benzer sonuçlar göstermesine rağmen MS dedektörünün yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip olduğunu fakat doğruluğu daha az ve stabil olan dedektör sinyalleri oluşturduğunu bildirmişleridir. Araştırmacıların bu kıyaslama sonucu elde ettikleri veriler **Çizelge 1**'de özetlenmiştir [Pellilo ve ark., 2004].

Çizelge 1: Yeşil çay ekstresindeki kateşinlerin, UV-DAD ve MS dedektörleri ile miktar tayinleri

	Miktar (mg/ 100 ml ekstre)	
	<i>UV-DAD dedektör</i>	<i>MS dedektör</i>
Gallokateşin	4,40	2,19
Epi-gallokateşin	11,92	11,53
Kateşin	0,80	0,89
Epi-gallokateşin gallat	39,07	36,13
Epi-kateşin	5,57	5,38
Gallokateşin gallat	0,72	0,77
Epikateşin gallat	10,04	9,69

2004 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise Avusturya'da yetişen taze çay yapraklarında bulunan ana bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılabilecek en uygun çözücü araştırılmış ve taze çay yapraklarındaki fenolik bileşikler için en iyi çözücünün metanol olduğu ve maksimum verimin örnek:metanol oranı 1:18 (a/h) olduğunda elde edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada Hiperisil ODS kolonu kullanılarak yapılan HPLC analizinde metanollü ekstrenin içeriği epi-gallokateşin (32,7 mg/g), epi-kateşin (18,5 mg/g) epi-gallokateşin gallat (106 mg/g), epi-kateşin gallat (33,4 mg/g) olarak tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak; ekstrede epi-gallokateşin3,5-digallat, kateşin gallat bileşikleri teşhisde edilmiştir [Yao ve ark., 2004].

2005 yılında yapılan bir derleme çalışmasında, ticari yeşil çay örneklerinin kateşin, epi-kateşin, epi-kateşin gallat, epi-gallokateşin, epi-gallokateşin gallat yönünden zengin olduğu ve bir bardak çayın içindeki flavonoit içeriğinin çayın kendi kimyasal kompozisyonuna, üretim ve infüzyonu hazırlama tekniğine bağlı olduğu bildirilmiştir. Çayın partikül büyüklüğü ve ağırlığı, çay:su oranı, infüzyonu hazırlama süresi ve sıcaklığı da flavonoit içeriğini etkileyen önemli parametreler olarak bildirilmiştir [Peterson ve ark, 2005].

Sharma ve arkadaşları, Japonya kaynaklı ticari yeşil çaylar üzerinde üretim tekniklerinin ve infüzyonu hazırlama koşullarının kateşinler üzerindeki etkisini araştırmışlar ve elde ettikleri sonuçları değerlendirdiklerinde, farklı üretim teknikleri kullanıldığında kalitatif ve kantitatif farkların gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Japon üretim tekniğine göre hazırlanan yeşil çay örneklerinde kateşin miktarının daha fazla olduğu ve bunun nedeninin üretimde çay partiküllerinin düzleştirilmesi ve buna bağlı olarak da daha fazla yüzey alanı sağlanarak, ekstraksiyonun kolaylaşması olarak açıklanmıştır. Yine aynı çalışmada 100°C'de hazırlanan infüzyonun 80°C'de hazırlanan infüzyona oranla daha fazla kateşin içerdiği saptanmıştır [Sharma ve ark., 2005].

2005 yılında yapılan bir çalışmada Çin kaynaklı, Yunanistan'da marketlerde satılan yeşil çay örneğinin ters faz C₁₈ kolon içeren ve gradient elüsyon tekniği uygulanan LC-DAD-MS (Liquid Kromatografi-Diode Array Dedektör- Kütle Spektroskopisi) tekniği kullanılarak kalitatif olarak incelenmiştir. Örnekten hazırlanan infüzyonun kateşin dimerler, gallokateşin gallat ve epi-gallokateşin-3-metil gallat'ı içerdiği bildirilmiştir [Atoui ve ark., 2005].

Sharma ve arkadaşları farklı orijinli (Tayvan, Kangra-Hindistan ve Hindistan'daki lokal market) yeşil çay numunelerinden farklı çözücüler kullanarak hazırladıkları ve en iyi verimi %70'lik metanol ile elde ettikleri ekstrahatların; asetonitril ve %0,1 fosforik asit'li su içeren mobil faz ve C18 Lichrocart kolon kullanarak HPLC analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Örneklerde saptanan kateşinlerin en düşük ve en yüksek değerleri ; 2,5-72 mg/g epi-gallokateşin, 1-1,38 mg/g kateşin, 0,1-9,5 mg/g epi-kateşin, 0,5-59,2 mg/g epi-gallokateşin galat ve 1,5-3,58 mg/g olarak tespit edilmiştir [Sharma ve ark., 2005].

2005 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise Kenya orijinli yeşil çay örneğinin, gradient elüsyon sistemi kullanılarak ve ters faz kolon içeren HPLC-DAD-MS ile flavan-3-ol yapıları teşhis edilip, miktar tayinleri yapılmıştır. İncelenen örnekte; gallokateşin 513µM, epi-gallokateşin 1594 µM, epi-kateşin 374 µM, epi-gallokateşin gallat 1202 µM ve epi-kateşingallat 389 µM konsantrasyonda tespit edildiği bildirilmiştir [Steward ve ark., 2005].

Labbe ve arkadaşları, çay kateşinleri içerisinde biyolojik olarak en önemli olduğu düşünülen epi-gallokateşin gallat bileşiğinin en yüksek verimle eldesini sağlayacak bir yöntem üzerinde çalışmışlar ve elektrodializ hücreler kullanarak, membranların kateşinler üzerindeki seçiciliğini araştırmışlardır. Buna göre; yeşil çay infüzyonunda bulunan epi-gallokateşin ve epi-gallokateşin gallat bileşiklerinin elektrodializ sisteminde yüksek oranda göç yeteneğine sahip olduklarını ve bu sistemde UF-1000Da membranının kullanılmasıyla epi-gallokateşin ve epi-gallokateşin gallat'ın göç yeteneklerinin %50 oranında arttırıldığı bildirilmiştir. Böylece yeşil çay ekstresinden, biyolojik önemi bilinen epi-gallokateşin gallat bileşiğinin daha verimli şekilde izolsyonunun sağlanabileceği sonucuna varmışlardır [Labbe ve ark., 2005].

2006 yılında yapılan bir çalışmada yeşil çay infüzyonunda bulunan kateşinlerin teşhis ve miktar tayini HPLC yöntemi kullanılarak tespit edilmeye çalışılmış ve yöntem geliştirilmiştir. X-Terra-C₁₈ kolonda ve gradient elüsyon tekniği kullanılarak yapılan analizde kateşinlerin 280 nm’de verdikleri sinyaller kullanılarak miktar tayini yapılmıştır. Daha sonra HPLC-DAD analizinde elde edilen piklerin identifikasyonu için HPLC-ESI-MS analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre; yeşil çay infüzyonunun, 26,8 mg/250ml epi-gallokateşin , 20 mg/250ml epi-kateşin, 105 mg/250ml epi-gallokateşin gallat, 25,2 mg/250ml epi-kateşin gallat içerdiği tespit edilmiş ve geliştirilen bu HPLC yöntemiyle yeşil çay infüzyonundaki kateşinlerin analiz süresinin kısaltıldığı ve tekrarlanabilirliğinin arttırıldığı bildirilmiştir [Neilson ve ark., 2006].

Weiss ve arkadaşları, yeşil çay kateşinlerinin analizi için miselli elektrokinetik kromatografinin (MECC) diğer analiz yöntemlerine göre daha hızlı, verimli ve basit bir yöntem olduğundan söz etmişler ve diet destek kapsülleri olarak satılan ticari ürünleri içerik açısından bu yöntemi kullanarak kıyaslamışlardır. Bu çalışma ile diyet destek kapsüllerinin ilk defa ekstraksiyonu optimize edilmiş ve yine ilk defa MECC tekniği kullanılarak analizi yapılmıştır [Weiss ve ark., 2006].

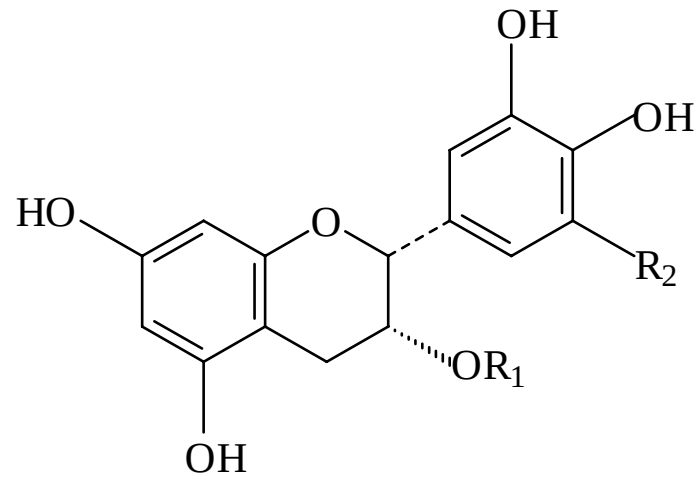
Bir başka çalışmada Çin’in farklı 4 bölgesine ait yeşil çayların total polifenol içerikleri NIR (Yakın İnfrared Spektroskopisi) kullanılarak tespit edilmiş ve yöntemin basit, hızlı ve tekrarlanabilir olduğu bildirilmiştir. Sonuçlara göre incelenen çayların total polifenol içeriği %19-30 olarak bulunmuştur [Chen ve ark., 2006].

Benzer bir çalışma Row ve arkadaşları tarafından da yapılmış ve yeşil çayda bulunan major kateşinlerin maksimum verimle elde edilmesi için gerekli olan optimum koşullar araştırılmıştır. Buna göre; yeşil çay numunesinin 80°C’de 40 dakika su ile ekstre edilmesinden sonra ekstredeki kafein, su:kloroform çözücü sistemi kullanılarak uzaklaştırılarak; su: etilasetat çözücü sistemi ile major kateşinlerin saf halde elde edildiği bildirilmiştir [Row ve Jin, 2006].

2006 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise Japonya kaynaklı ticari yeşil çaydaki kateşinlerin ayırım profili, iki fazlı solvan sistemi kullanılan HSCCC (yüksek hızlı karşı akım kromatografisi) yöntemi ile elde edilmiştir. Buna göre; polifenolik bir molekülün hidrofobik özellikleri; flavan-3-ol yapısının gallik asit ile ester oluşturması ile, flavan-3-ol yapısındaki B halkasının oksidatif dimerizasyonu ile artarken, flavan-3-ol yapısındaki C₄ ve C₈ arasındaki interflavan bağları ile azaldığı bildirilmiştir [Yanagida ve ark., 2006].

2006 yılında yapılan diğer bir çalışmada düşük kalitedeki Çin kaynaklı yeşil çay yapraklarından hazırlanan ticari poşet çayların üzerinde ekstraksiyon koşullarının etkileri araştırılmıştır. Bunun için, farklı sulu ve saf çözücüler (aseton, etanol, metanol, asetonitril, su) kullanılarak, farklı sıcaklıklarda (60°, 80°, 95° ve 100°C) ve farklı sürelerde (5-20 dakika) çalışılmıştır. Sonuçta, saf çözücüler içinde major kateşinlerin ekstraksiyon veriminin en düşük olduğu çözücüler aseton ve asetonitril olarak tespit edilirken, su kullanılarak yapılan ekstraksiyon prosedürleri arasında ise optimum koşullar; yeşil çayın su ile 80°C’de 20 dakika ve 95°C’de 10 dakika ekstre edilmesi olarak bildirilmiştir. Yüksek ekstraksiyon sıcaklığı ve uzun ekstraksiyon sürelerinin ise kateşinlerin parçalanmasına neden olduğu saptanmıştır [Perva-Uzunalic ve ark., 2006].

Yeşil çay içerisinde bulunan kateşin bileşiklerinin yüksek nutrasötik potansiyallerinin yanında önemli farmakolojik etkilerinin olduğu ve bunlar içerisinde epi-gallokateşin gallatın en fazla bulunması nedeniyle; bu etkilerin çoğunlukla bu bileşikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu yüzden son yıllardaki çalışmalar, yüksek oranda epi-gallokateşin gallat bileşiği içeren yeşil çay ekstraktlarının hazırlanması yönüne kaymıştır. Bu çalışmalardan bir tanesi de Japonya kaynaklı yeşil çay numunesinin ekstraksiyonu sırasında karıştırma süresi ve sıcaklığının kateşinlerin verimine olan etkisi üzerinedir. Yapılan çalışmada varılan sonuca göre; kateşinler iki gruba ayrılabilirler: 1. zamana bağlı bileşikler (epi-gallokateşin ve epi- kateşin) 2. zaman ve sıcaklığa bağlı bileşikler (kateşin, epi-gallokateşin gallat, gallokateşin gallat ve epi-kateşingallat).Buna ek olarak; kateşinlerin ekstraksiyonu için en iyi zaman ve sıcaklık kombinasyonu ise zamana bağlı kateşinler için 50°C'de 20-40 dakika, zaman ve sıcaklığa bağlı kateşinler için 90°C'de 80 dakika olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, Perva- Uzunalic ve arkadaşlarının farklı kaynaklı yeşil çayların ekstraksiyon verimi üzerine yaptığı ve yukarıda detaylı bir şekilde anlatılan çalışma ile uyum göstermemektedir [Labbe ve ark., 2006].



	R₁	R₂
epi-kateşin (EC)	H	H
epi-kateşin gallat (ECG)	galloil	H
epi-gallokateşin (EGC)	H	OH
epi-gallokateşin gallat (EGCG)	galloil	OH

b. Flavonoller

Flavonoller ve flavonol glikozitleri yeşil çay yapraklarında düşük miktarda bulunan bileşiklerdir. Taze çay yapraklarında 3 ana flavonol aglikonundan bahsetmek mümkündür. Bunlar; kemferol, kersetol ve mirsetol olarak bilinir. Bu bileşikler, B halkasındaki hidroksilasyonun derecesine göre farklılık gösterirler. Sırasıyla, mono-, di- ve tri-hidroksi sübstitüsyonu taşıyan bileşikleridir.

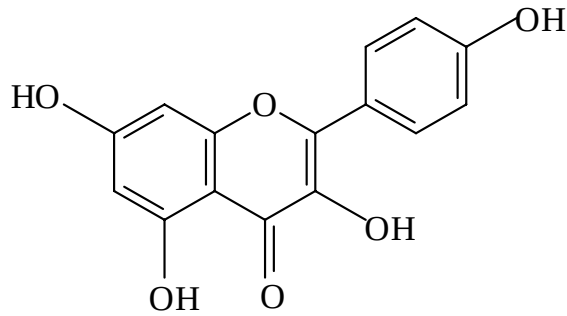
1991 yılında yapılan bir çalışmada *C. sinensis* tohumlarından iki yeni flavonol glikoziti izole edilmiştir. Bunlar; kamelliazit A ve B. Bu bileşiklerin yapıları; kemferol 3-O-[2-O- β -D-galaktopiranozil-6-O- α -L-ramnopiranozil]- β -D-glukopiranozit ve kemferol 3-O-[2-O- β -D-ksilopiranozil-6-O- α -L-ramnopiranozil]- β -D-glukopiranozit olarak tespit edilmiştir. Glukozlar arası bu tip bağlar bu çalışmayla ilk defa rapor edilmiştir [Sekine ve ark., 1991].

1997 yılında yapılan bir derleme çalışmasında, yeşil çay yapraklarında kersetol, kemferol, mirisetol ve bunların glikozitlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Suda çözünebilen bu flavonol glikozitlerinin yeşil çay infüzyonundan elde edilen katı ekstraktın %2-3'ünü oluşturduğu, fakat suda çözünmeyen aglikonların az miktarda bulunduğu bildirilmiştir. [Balentina ve ark., 1997; Harbowy ve Balentina,1997].

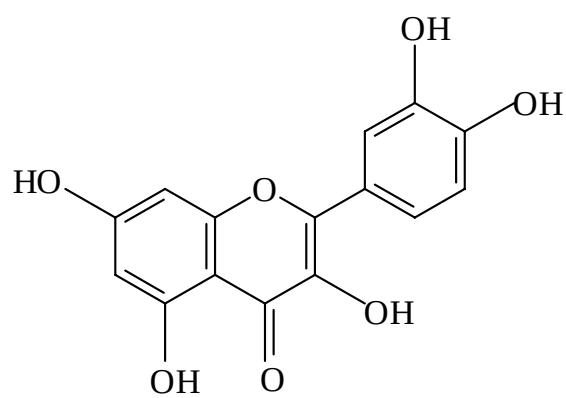
Wang ve Haelliwell, çay yapraklarındaki ve farklı ticari yeşil çaylardan hazırlanan infüzyondaki flavonollerin, hidroliz sonrası analizlerini HPLC yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Analizler C_{18} kolonda ve izokratik sistemde yürütülmüş ve pik alanları 370 nm'de ölçülmüştür. Aynı çalışmada flavonol glikozitlerinin hidrolizinde kullanılabilecek en iyi çözücünün HCl içeren etanol olduğu tespit edilmiş ve yeşil çay yapraklarında, 0,83-1,59 g/kg mirisetol, 1,79-4,05 g/kg kersetol ve 1,56-3,31 g/kg kemferol varlığı bildirilmiştir [Wang ve Helliwell, 2001].

2004 yılında Endonezya kaynaklı yeşil çay örneği üzerinde C₁₂ ters faz kullanılarak yapılan LC-MS çalışmasına göre, yeşil çay infüzyonunun içerdiği flavonol glikozitleri ve miktarları; 15 mg/L kersetol-ramnozilgalaktozit, 131 mg/L kersetol-3-rutinozit, 119 mg/L kersetol-3-galaktozit, 30 mg/L kersetol-ramnoz-heksoz-ramnoz, 185 mg/L kersetol-3-glukozit, 32 mg/L kemferol-ramnoz-heksoz-ramnoz, 42 mg/L kemferol-galaktozit, 69 mg/L kemferol rutinozit, 102 mg/L kemferol-3-glukozit, 4,4 mg/L kemferol-arabinozit olarak saptanmıştır [Del Rio ve ark., 2004].

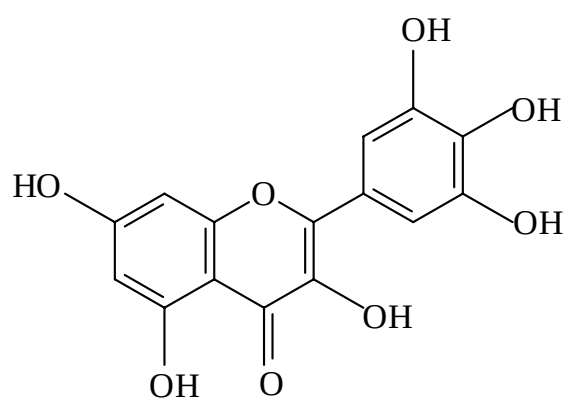
2006 yılında yapılan diğer bir çalışmayla Çin orijinli yeşil çay yapraklarının %60'lık etanollü çözeltilisine HCl ilavesiyle flavonol glikozitlerinin hidrolizi gerçekleştirildikten sonra yapılan HPLC ile analizi yapılan örneğin 0,8 g/kg mirisetol, 1,8 g/kg kersetol ve 2,6 g/kg kemferol içerdiği bildirilmiştir [Perva-Uzunalic ve ark., 2006].



Kemferol



Kersetol



Mirisetol

c. Antosiyaninler

1997 yılında çayın kimyasal kompozisyonu hakkında yapılan derleme çalışmasında; prodelfinidin B2 gallatlar gibi proantosiyanidin bileşiklerinin yeşil çaydan izole edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada assamikain A isimli bir başka proantosiyanidin bileşiğinin de yeşil çay yapraklarında bulunduğu bahsedilmiştir [Harbowy ve Balentina, 1997].

2001 yılında yapılan diğer bir çalışmaya göre, Çin’de yetişen ve kırmızı renkli çiçekleri ve kırmızımsı yeşil renkli yaprakları olan *C. sinensis* bitkisinin çiçek ve yapraklarından 3 antosiyanin bileşiği izole edilmiştir. Bunlar; delfinidin, siyanidin-3-O- β -D-galaktozit ve delfinidin-3-O- β -D(6-(E)-p-kumaril) galaktopiranozit olarak bildirilmiştir [Terehara ve ark., 2001].

2006 yılında yapılan bir çalışmada ise Çin kaynaklı yeşil çay örneğinin, HCl içeren n-butanol’de, yapraklarındaki proantosiyanidinlerin antosiyaninlere hidrolizi gerçekleştirildikten sonra, Fe^{+3} ile reaksiyona giren antosiyaninlerin total miktarı, UV spektrofotometresiyle 540 nm’de ölçülerek hesaplanmış ve 12-19 g/kg olarak tespit edilmiştir. [Perva-Uzunalic ve ark., 2006].

d.Flavononlar

Apigenin, viteksin, gibi flavononlara ve bunların glikozitlerine çay yaprağının polifenol fraksiyonlarında rastlanmış olsa da, bu grup bileşiklerin çay yapraklarında çok az miktarda bulundukları 1997 yılında yapılan bir derleme çalışmasında belirtilmiştir [Harbowy ve Balentina, 1997].

Yapılan diğer bir derleme çalışmada ise yeşil çay infüzyonunun içerdiği flavonlar olarak, viteksin, izoviteksin, c-glukozil-apigenin izomerleri, saponarin, teiferin A ve teiferin B bildirilmiştir [Chen ve ark.,2002).

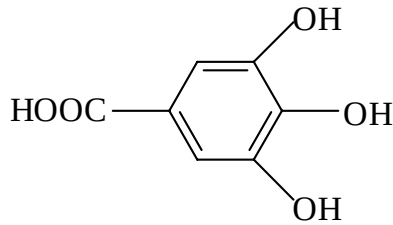
e. Fenolik asitler

1997 yılında yapılan çalışmalarda, gallik asit ve onun kinik asit esteri olan teogallinin yeşil çay yapraklarında bulunan fenolik asitler olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sinnamik asit türevlerinden olan kinik asit, klorojenik asit , 5-kafeoilkinik asit veya 4-kumaril kinik asit gibi kumaril- ve kafeoil- kinik asitlerin de bulunduğu belirtilmiştir [Harbowy ve Balentina, 1997 ; Balentina ve ark., 1997].

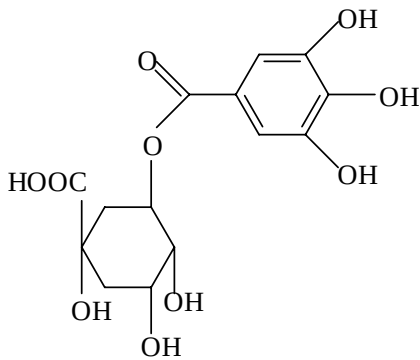
2000 yılında Wang ve arkadaşları, Çin kaynaklı yeşil çay örneklerinin gallik asit içeriğini tespit etmek için HPLC analizinde izokratik elüsyon sistemi geliştirmişlerdir. Analiz sonucunda C₁₈ ters faz kolon, metanol:su:o-fosforik asit (20:79.9:0.1) ve UV detektör (210 nm ve 280 nm) kullanıldığında 5 farklı yeşil çay numunesinde, 0,78-3,33 mg/100ml gallik asit bulunduğu bildirilmiştir [Wang ve ark., 2000].

2002 yılında yapılan bir çalışmada ABD-Boston'daki Çin mahallesine ait lokal bir marketten satın alınan 4 yeşil çay örneğinin C₁₈ gard kolon ve C₁₈ ters faz kullanılarak su:asetik asit (97:3, h/h) ve metanol ile gradient sistemde ve 280 nm'de HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçta; örneklerin 0,74-1,84 mg/g gallik asit içerdiği tespit edilmiştir [Zuo ve ark., 2002].

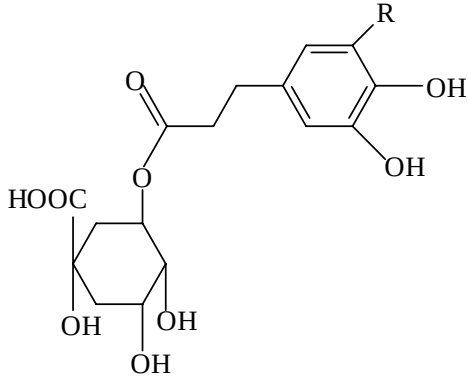
2004 yılında yapılan bir çalışmada ise Avusturya'da kültüre alınan taze çay yapraklarının fenolik içerikleri ve bu bileşikler için kullanılabilecek en uygun çözücü araştırılmış ve fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda; su, etanol, etilasetat ve kloroform ile kıyaslandığında, metanolün en uygun çözücü olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada Hiperisil ODS kolon kullanılarak yapılan HPLC analizinde gallik asit, izoklorojenik asit, p-kumaril kinik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit bileşiklerinin teşhisleri yapılmıştır [Yao ve ark., 2004].



Gallik asit



teogallin



kumarilkinik asit, R= H

klorojenik asit, R=OH

1.6.1.2. Yeşil Çay'da Bulunan Metilksantinler

Yapılan çalışmalarda, *C. sinensis* bitkisinin hem stamenlerinde hem de petallerinde kafein varlığına rastlandığı ve yine stamenlerinde çok yüksek oranda teobromin varlığının tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca, *C. sinensis* bitkisindeki kafein biyosentezinin, filizlerin oluşumunun erken döneminde (Nisan-Haziran) sadece genç yapraklarda meydana geldiği belirtilmiştir. Kafein sentezi için en önemli limit faktörü olarak N-metiltransferaz enzimleri gösterilmiş ve sonuçta, çay yapraklarındaki kafein biyosentezini kontrol edebilmek için en önemli mekanizmanın bu enzimlerin indüklenmesi veya baskılanması olduğuna karar verilmiştir [Fujimori ve Ashihara, 1990; Fushimori ve ark., 1991].

Goto ve arkadaşları, kalitelerine göre farklılık gösteren 4 ticari yeşil çay örneğinden hareketle elde ettikleri asetonitril: su (1:1, h/h)'lu ekstrelerin, HPLC'de ODS kolon kullanarak, 274 nm'de ve su:asetonitril:fosforik asit mobil faz sisteminde kafein miktar tayinini yapmışlar ve sonuçta; kafein miktarını %3,07-3,87 aralığında tespit etmişlerdir [Goto ve ark., 1996].

1997 yılında yapılan bir derleme çalışmasına göre; yeşil çay yaprakları %2-5 aralığında kafein içermektedir. Yine aynı çalışmada infüzyon zamanının artmasıyla kafein miktarının da arttığı belirtilmiştir. Kafeinin gerçek miktarının tespitinin pek çok parametreye göre değiştiğini ve bunlar içinde en önemli parametrenin kaynatma olduğu ve benzer şekilde hazırlanan yeşil ve siyah çay infüzyonlarındaki kafein miktarında belirgin bir fark olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca, teobromin ve teofilin bileşiklerinin de çay yapraklarında bulunduğu fakat miktarlarının çok az olduğu sonucuna varılmıştır [Harbowy ve Balentina, 1997].

2000 yılında Wang ve arkadaşları, Çin kaynaklı yeşil çay örneğinin kafein içeriğini tespit etmek için HPLC analizinde izokratik elüsyon sistemi geliştirmişlerdir. Ayırım tekniğinde C₁₈ ters faz kolon, metanol:su:o-fosforik asit (20:79.9:0.1) ve UV detektör (210 nm ve 280 nm) kullanıldığında farklı 5 yeşil çay örneğindeki kafein miktarı 22,9-30,3 mg/100 ml olarak tespit edilmiştir [Wang ve ark., 2000].

Zuo ve arkadaşları, ABD-Boston'daki Çin mahallesine ait lokal bir marketten satın aldıkları farklı 4 yeşil çay örneğinin C₁₈ gard kolon ve C₁₈ ters faz kullanılarak su:asetik asit (97:3, h/h) ve metanol ile gradient sistemde ve 280 nm'de HPLC analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Sonuçta; numunelerin 23-29,6mg/g aralığında kafein içerdiğini belirtmişlerdir [Zuo ve ark., 2002].

Çin kaynaklı yeşil çay yaprakları ve çiçeklerinden hazırlanan ve özellikle Çin'de tüketilen jasmin yeşil çay örneklerinin kaynar su ve %75'lik etanol ile hazırlanan ekstrelerinin kafein içerikleri, Cosmosil 5C₁₈ kolon kullanılarak, izokratik sistemde HPLC yöntemiyle incelenmiş ve sulu etanollü ekstrelerde kafein miktarının daha fazla bulunduğu bildirilmiştir. Çay çiçeklerinin kafein içeriğinin çay yapraklarındaki kafein içeriğine yakın olduğu ve çiçeklerin de üretim aşamasında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [Lin ve ark., 2003].

2003 yılında yapılan bir HPLC çalışmasında, farklı ticari yeşil çay örneklerinden infüzyon hazırlanarak; C₁₈ kolon ve su:asetonitril:formik asit (94.7:43:1, h/h/h) ve su:asetonitril:formik asit (49.5:49.5:1, h/h/h) mobil faz gradient elüsyon tekniği kullanılarak, 275 nm'de yapılan analiz sonucunda, yeşil çay infüzyonlarında kafeinin ana alkaloid olduğu, az miktarda teobromine rastlandığı fakat teofilin alkaloidinin saptanamadığı bildirilmiştir [Fernandez ve ark., 2003].

2004 yılında Endonezya kaynaklı yeşil çay örneği üzerinde C₁₂ ters faz kullanılarak yapılan LC-MS çalışmasında, bileşiklerin alıkonma zamanları, absorbans spektrumları ve MS yarılmalarına göre yapılan teşhislerde; yeşil çayın 866mg/l kafein ve 57 mg/l teobromin alkaloidlerini içerdiği tespit edilmiştir [Del Rio ve ark., 2004].

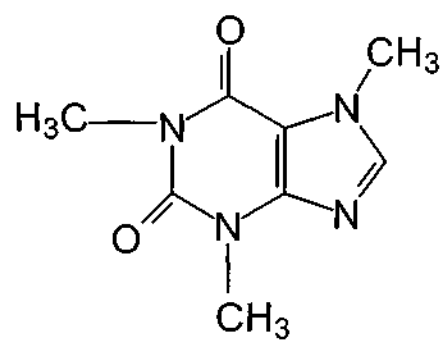
Sharma ve arkadaşları farklı orijinli yeşil çay örneklerinden farklı çözücüler kullanarak hazırladıkları ve en iyi verimi %70'lik metanol ile elde ettikleri ekstrelerin; asetonitril ve %0.1 fosforik asit'lik su içeren mobil faz ve C₁₈ Lichrocart kolon kullanarak HPLC analizlerini gerçekleştirmişler ve örneklerdeki metilksantinlerin en düşük ve en yüksek değerlerini ; 17,5-20 mg/g kafein, 1.48-5,5 mg/g teobromin ve 0-1,99 mg/g teofilin olarak tespit etmişlerdir [Sharma ve ark., 2005].

Steward ve arkadaşları, Kenya orijinli yeşil çay örneğinden hazırladıkları infüzyondaki metilksantin bileşiklerinin HPLC-DAD-MS yöntemi ile tayinini yapmışlar ve kafein miktarını 1194 μM ve teobromin miktarını ise 54 μM olduğunu bildirmişleridir [Steward ve ark., 2005].

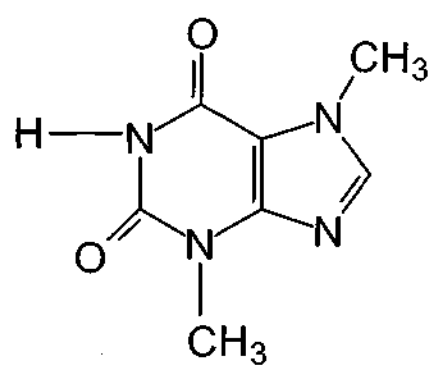
Avusturya'daki marketlerden satın alınan 2 adet ticari yeşil çay yaprak örneği ve 5 adet yeşil çay poşet çayların kafein içerikleri UV spektrofotometresinde 274 nm'de çalışılmış ve sonuçta; yeşil çay poşetlerinin ortalama kafein içeriği %3,83 ve ticari yeşil çay yapraklarındaki kafein miktarı ise %3,71 olarak bulunmuştur [Yao ve ark., 2006].

Bir başka çalışmada ise Çin kaynaklı çayların kafein içerikleri NIR (Yakın İnfrared Spektroskopisi) kullanılarak tespit edilmiş ve sonuçlara göre çayların kafein içeriği %2,2-3,7 olarak bulunmuştur [Chen ve ark., 2006].

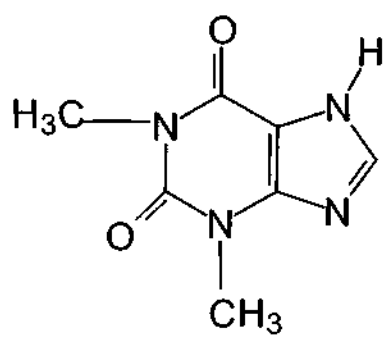
2006 yılında yapılan diğer bir çalışmada düşük kalitedeki Çin kaynaklı yeşil çay yapraklarından hazırlanan ticari poşet çayların kafein içerikleri üzerinde ekstraksiyon koşullarının etkileri araştırılmıştır. Bunun için, farklı çözücüler (aseton, etanol, metanol, asetonitril, su), farklı sıcaklıklarda (60°, 80°, 95° ve 100°C) ve farklı sürelerde (5-20 dakika) çalışılmıştır. Sonuçta, saf çözücüler içinde kafeinin ekstraksiyon veriminin en düşük olduğu çözücüler aseton ve asetonitril olarak tespit edilirken, su kullanılarak yapılan farklı ekstraksiyon yöntemlerinde, infüzyondaki kafein içeriğinin 80°C veya 95°C'de yapılan her iki ekstraksiyonda 2,5 dakika sonra sabit kaldığı (30 mg/100ml) fakat 60°C kullanılarak yapılan ekstraksiyonda ise bu değere ulaşmak için ekstraksiyonun 15 dakika süreyle devam etmesi gerektiği belirtilmiştir.[Perva-Uzunalic ve ark., 2006].



Kafein



Teobromin



Teofilin

1.6.1.3. Yeşil Çay'da Bulunan Aminoasitler

Yeşil çay yapraklarında %6 oranında amino asitlerin bulunduğu yapılan derleme çalışmalarında belirtilmiştir. Bu amino asitler içerisinde teanin (γ -N-etil-glutamil) çayda bulunan en önemli ve en fazla miktardaki amino asit olarak bildirilmiştir. Buna ek olarak, çay yaprağında bulunan amino asitler, yaprağın aroma bileşiklerinin prekürsörleri olarak da bilinmektedir [Harbowy ve Balentina, 1997; Balentina ve ark., 1997].

Yeşil çay infüzyonundaki major amino asitler teanin ve glutamik asit olarak bildirilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalara göre, ilkbaharda hasatı yapılan çay yapraklarının amino asit miktarı yaza doğru yapılan hasata nazaran daha fazladır. **Çizelge 2**'de yeşil çay infüzyonunda bulunan amino asitler ve bağıl yüzdeleri görülmektedir [Yamamoto ve ark., 1997].

Çizelge 2: Yeşil çay infüzyonunda bulunan major amino asitler ve bağıl yüzdeleri

Amino asitler	Bağıl yüzdeleri
Teanin	45,9
Glutamik asit	12,7
Aspartik asit	10,8
Arjinin	9,2
Glutamin	7,5
Serin	3,8
Treonin	1,4
Alanin	1,4
Asparagin	1,2
Fenil alanin	1,1
Lizin	1,0
Valin	1,0

2000 yılında yapılan diğer bir derleme çalışmasına göre de; yüksek kalitedeki Japon yeşil çayları fazla miktarda teanin içermektedir. Yeşil çayda bulunan bir diğer ilginç amino asit γ -amino butirik asit olarak bildirilmiştir. Normal yeşil çayın bu amino asiti %0,1'den az içermesine karşın, taze yapraklara üretim prosesinden önce anaerobik uygulamalar yapılması, γ -amino butirik asit miktarını belirgin şekilde arttırdığı belirtilmiştir [Horie ve Kohata, 2000].

Liang ve arkadaşları yeşil çay yapraklarının amino asit içeriğini belirlemek için amino asit analiz kolonu ve sodyum sitrat tamponu ile sodyum borat tamponunu içeren solvan sistemlerinin gradient elüsyonu ve 338 nm'de HPLC analizi yapmışlardır. Tayini yapılan amino asitler ve miktarları **Çizelge 3**'de gösterilmiştir [Liang ve ark., 2003].

Çizelge 3: Liang ve arkadaşlarının yeşil çay yapraklarında saptadıkları amino asitler ve miktarları

Amino asitler	Miktarları (mg/kg)
Teanin	11794
Glutamik asit	5094
Arjinin	4482
Histidin	3653
Aspartik asit	1589
Serin	1227
Treonin	1184
Alanin	684
Glisin	486
Lösin	244
Tirozin	216
Fenil alanin	188
İzolösin	152
Valin	36.8
Lizin	27.2
Triptofan	0,7

Avusturya'daki marketlerden satın alınan 2 adet ticari yeşil çay (yaprak) örneği ve 5 adet yeşil çay poşet çaylarının total amino asit içerikleri UV spektrofotometresinde 570 nm'de çalışılmış ve sonuçta; yeşil çay poşetlerinin ortalama total amino asit içeriği %2,28 ve ticari yeşil çay yapraklarındaki total amino asit miktarı ise %3,44 olarak bulunmuştur [Yao ve ark., 2006].

Wang ve arkadaşlarının 2006 yılında Tayvan'da üretilen yeşil çay yapraklarındaki serbest amino asitlerin miktarını tespit etmek için yaptığı çalışmanın sonucuna göre; yeşil çay yapraklarının pek çok amino asiti içerdiği fakat bunlar arasında en fazla miktarda bulunan teanin (722 mg/100g)'in total amino asitler miktarının %50'sini oluşturduğu bildirilmiştir. Teanin'in tatlımsı ve lezzetli bir tadı olduğu ve yeşil çayın kalitesiyle doğrudan ilgili bir bileşik olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, yeşil çay yapraklarında insanlar için esansiyel olan treonin (17,34 mg/100g), lizin (9,65 mg/100g), valin 12,50 mg/100g), izolösin (8,29 mg/100g), lösin (9,79 mg/100g), triptofan (13,11 mg/100g) ve metionin (0,17 mg/100g)'in bulunduğunu tespit ettiklerini bildirmişleridir [Wang ve ark., 2006].

1.6.1.4. Yeşil Çay'da Bulunan Vitamin ve Mineraller

Çay yapraklarının vitaminler, özellikle Vitamin C yönünden zengin bir kaynak olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. 100g yeşil çay yaprağındaki Vitamin C miktarının 150-300 mg'ı bulunduğu bilinmektedir. 100 g yeşil çayda bulunan Vitamin B'nin ise 1-2 mg düzeyinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu iki vitamin de suda çözünen ve yaprakların suyla kaynatılmasıyla infüzyona geçen bileşiklerdir. Vitamin E ise çay yapraklarının lipit fraksiyonunda bulunmaktadır ve 100g yeşil çayda 24-80 mg civarında bulunduğu bildirilmiştir. Her 1 gram yeşil çayda ise 300-500 i.u. oranında K vitamininin bulunduğu belirtilmektedir [Chen ve ark., 2002; Yamamoto ve ark, 1997].

Diğer bitkilerle kıyaslandığında yeşil çay yapraklarında potasyum, alüminyum, iyot, selenyum, nikel, arsenik ve manganezin yüksek oranda bulunduğu ve flor, alüminyum, selenyum kalsiyum, demir, manganez gibi bazı minerallerin çay bitkisinde olgun yapraklar tarafından kullanılırken; çinko, magnezyum, potasyum gibi minerallerinin ise filizler tarafından kullanıldığı tespit edilmiştir. Flor miktarının çay bitkisinde alışılmamış şekilde çok yüksek olduğu bildirilmiştir. Filizlerde bu miktar 100-200 mg/kg olarak bulunurken, olgun yapraklarda 400 mg/kg ve yaşlı yapraklarda ise 1000 mg/kg olarak bulunduğu bildirilmiştir. Florun çay bitkisindeki rolü hala kesinlik kazanmamakla birlikte, bu bileşiğin insanlarda diş çürüklerine karşı koruyucu etkisi bilinmektedir. Çay bitkisinin alüminyumunu kullanan ender bitkilerden biri olduğu ve hatta pek çok bitkinin Al toksisitesine karşı hassasiyet gösterdiği bildirilmektedir. Çay bitkisinde alüminyumun, bitkinin fosfor ve diğer esansiyel elementlerin absorpsiyonunu ve kullanımını stimüle etmek suretiyle büyümeyi destekleyen bir mineral olduğu vurgulanmaktadır. Taze çay yapraklarının Al içeriği 200-1500 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Polifenol oksidaz enziminin içerdiği bakır bileşiğinin çay yapraklarındaki içeriği de 12-18 mg/kg olarak bildirilmiştir. Çin orijinli bir yeşil çay örneğinde bulunan mineraller üzerine yapılan diğer bir çalışmaya göre örneğin mineral içeriği ;Cu (270 ppm), Fe (13040 ppm), Ni (1340 ppm), Na (1.800 ppm), K (262 000 ppm), Mg (30800 ppm), Ca (13750 ppm), Zn (630 ppm), Cr(10 ppm) olarak saptanmıştır [Chen ve ark., 2002; Yamamoto ve ark, 1997; Ferrara ve ark, 2001; Flaten, 2002].

1.6.1.5. Yeşil Çay Aroması

Yeşil çay aromasında fazlaca bileşik bulunmasına rağmen bunların miktarları genelde çok azdır. Yeşil çay aromasında bulunan bileşikler düşük kaynama noktasına sahip alkollerden yüksek kaynama noktalı olan asitlere kadar değişen geniş bir yelpaze gibidir.

1981 yılında Japonya kaynaklı yeşil çay örneğinin uçucu bileşikleri Carbowax 20M ve OV-101 kolon kullanılarak GC/MS (Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometresi) yöntemi ile araştırılmış ve sonuçta; örnekte 17 hidrokarbon, 17 alkol, 16 aldehit, 13 keton, 8 ester, 2 eter, 1 asit teşhis edilmiştir. Uçucu yağın içerdiği ana bileşikler geraniol (%5,88), cis-jasmon (%4,16) 2,6,6-trimetil-2-hidroksisikloheksanon (% 4,08), cis-2-penten-1-ol (%3,70), linalool (%3,40) olarak tespit edilmiştir [Yamaguchi ve Shibamoto, 1981].

1997 yılında yapılan derleme çalışmasında, yeşil çayın üretim prosesinin aromasını etkilediği ve genelde taze yaprakta bulunan geranil, linolil, terpinil ve neril glukozitlerinden hareketle β -glukozidaz enziminin aromanın oluşturulmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir [Harbowy ve Balentina, 1997].

1998 yılında Baptista ve arkadaşları, farklı kaynaklı 6 yeşil çay örneğinin 100 μ m polidimetilsiloksan ile kaplı fiber içeren SPME (Solid Faz Mikro Ekstraksiyon) tekniği kullanarak ve HP-FFAP kolonda GC/MS ile uçucu bileşiklerinin analizini yapmışlardır. Ve sonuçta; yüksek oranda 1-penten-3-ol, 6-metil-5-hepten-2-on, 2,4-heptadienal, linalol oksit (trans-furanoit), linalol oksit (cis-furanoit) ve daha az miktarda olmakla birlikte 1-penten-3-on, hekzenal, 2-pentenol, 3,7-dimetil-1,5,7-oktatrien-3-ol, 3-penten-2-on, 4-metil-3-penten-2-on, 2-hekzenal, n-pentanol, benzaldehit, metil salisilat ve nerol bulunduğu bildirilmiştir [Baptista ve ark., 1998].

Kato ve Shibamoto, farklı 3 ülkeden alınan 15 yeşil çay örneğine ait uçucu bileşiklerin analizlerini DB-Wax kolon kullanarak GC/MS yöntemi ile gerçekleştirmişler. Tespit ettikleri 100 bileşikten 11 tanesini seçerek örneklerin kıyaslamasını yapmışlardır. Seçilen bu 11 bileşik; hekzenal, 1-penten-3-ol, heptenal, 1-pentenal, 2-penten-1-ol, 3-penten-1-ol, linalol oksit (trans-furanoit), linalol oksit (cis-furanoit), linalol ve linalil propionat ve geraniol olarak belirlenmiştir. Genelde hekzenal ve linalol miktarının yeşil çay kalitesini etkileyen bir parametre olduğu bildirilmiştir. Farklı 2 bölgeden (Laos ve Myanmar) elde edilen yeşil çay örneklerinin, yüksek sıcaklık prosesinde açığa çıkan piridin ve pirazin gibi heterosiklik bileşikler yönünden zengin olduğu tespit edilmiştir. Bu heterosiklik bileşiklerin varlığının da gösterdiği gibi, yeşil çay üretim prosesinde uygulanan sıcaklığın yeşil çayın aroması üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır [Kato ve Shibamoto, 2001].

2003 yılında Japonya kaynaklı yeşil çay örneklerinden hareketle hazırlanan uçucu bileşikleri içeren ekstrelerin DB-1 kolonda GC/MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre; 3,7-dimetil-1,6-oktadien-3-ol (%8,04), 3,7-dimetil-2,6-oktadien-3-ol (% 6,10) 3-hekzenol (%6,01), benzil alkol (%4,67), 1-etilsiklohekzen (%4,44) ve metil salisilat (%3,76) ekstradaki major uçucu bileşikler olarak saptanmıştır [Yanagimoto ve ark., 2003].

1.6.1.6. Diğer Bileşikler

a.Karbohidratlar

Çay yapraklarının serbest şeker artığı yanında, pektik bileşikler, polisakkaritler ve lif içerdiği bildirilmiştir. Karbohidratların kuru ağırlık üzerinden %11 civarında olduğu bilinmektedir. Yüksek molekül ağırlıklı pektinler ve diğer polisakkaritlerin Sephadex G-100 ile analizi yapılmıştır. Çay bitkisi olgunlaştıkça, lignin ve selüloz miktarının arttığı ve bunun nedeninin büyümekte olan bitkinin yapısal bütünlüğünü korumak için olduğu bildirilmiştir. Nişastanın ise sadece bitkinin kök sisteminde yer aldığı ve miktarının çok az olduğu rapor edilmiştir [Harbowy ve Balentina, 1997, Chen ve ark., 2002].

2001 yılında *Camellia sinensis* bitkisinin yapraklarından, aroma prekürsörü olduğu belirtilen (3R, 9R)-3-hidroksi-7,8-dihidro- β -ionil-6-O- β -D-apiofuranosil- β -D-glukopiranozit yapısında bir disakkarit glukoziti izole edilmiştir [Ma ve ark., 2001].

b.Karotenoitler

Taze çay yapraklarında bulunan ana pigmentlerin klorofil ve karotenoitler olduğu bildirilmiştir. Siyah çayın üretim prosesinde klorofillerin okside olarak feofitin ve feoforbittlere dönüştüğü ve bu bileşiklerin renginin de kahve-siyah olduğu belirtilmektedir. Karotenoitlerin ise siyah çay aroma bileşiklerinin prekürsörü olduğu vurgulanmaktadır. Yapılan bir çalışmada gölgede büyüyen çay bitkisinde klorofil ve karotenoit miktarında artış olduğu bildirilmiştir [Harbowy ve Balentina, 1997].

2000 yılında yeşil çay örneğinin polifenolik olmayan fraksiyonu araştırılmış ve spektrofotometrik ölçümler sonucu 1 g yeşil çayın 3,5 mg feofitin a ve 0,4 mg feofitin b içerdiği saptanmıştır [Higashi-Okai ve ark., 2000].

c. Yağ Asitleri

Wang ve arkadaşlarının 2006 yılında Tayvan'da üretilen yeşil çay yapraklarındaki serbest yağ asitlerinin miktarını tespit etmek için yaptığı çalışmanın sonucuna göre; yeşil çay yapraklarından elde edilen infüzyonda fazla bulunmamalarına rağmen yeşil çayın aromasını doğrudan etkilediği belirtilmektedir. Ayrıca, yeşil çay yapraklarında metil miristat (1,15 mg/100g), metil palmitat (42,28 mg/kg), metil stearat (24,26 mg/100g), metil-cis-9-oleat (19,47 mg/100g), metil linoleat (22,48 mg/100g), metil linolenat (15,53 mg/100g), metil araşidat (44,57 mg/100g), metil eikozenoat (10,68 mg/100g), metil behenat (11,07 mg/100g), metil lignokrat (8,92 mg/100g) varlığını tespit ettiklerini bildirmişleridir [Wang ve ark., 2006].

d. Triterpenik saponozitler

Saponinler, bitkiler aleminde fazlaca bulunan bileşik gruplarıdır. Bu bileşiklerin son yıllarda yapılan çalışmalarla antikarsinojen, antiallerjen, antibakteriyal, antienflamatuvar ve antihepatotoksik etkileri bulunduğu tespit edilmiştir. Çayda acı lezzetli saponinlerin çok az miktarda bulunduğu bildirilmiştir. Çay bitkisinin tohumlarının major saponinleri olarak teasaponin E1 ve E2 gösterilirken, çay yapraklarında bulunan ana saponin 3-o-{ β -D-galaktopiranozil (1→2)- [β -D-ksilopiranozil (1→2) α -L-arabinopiranozil (1→3)- β -D-glukopiranozil }-21-O-sinnamoil-16,22-di-

O-asetilbarringtonenol C olmak üzere yapraklarında izoteasaponin bileşiklerinin varlığı da tespit edilmiştir. Ayrıca çay çiçeklerinin antihiperlipidemik aktivitesi olan floratasaponinlerin izole edildiği belirtilmiştir Buna ek olarak, çay bitkisinin köklerinden 3 tane TR-saponin A, B ve C olarak adlandırılan olean-12-en tipi triterpenik saponin izole edilmiş ve NMR (Nükleer Manyetik Rezonans), FAB-MS (Hızlı Atom Bombardıman Kaynaklı Kütle Spektroskopisi) teknikleri ile teşhisleri yapılmıştır. [Lu ve ark., 2000; Yoshikawa ve ark, 2005; Kobayashi ve ark., 2006].

1.6.2. Siyah Çay Üzerinde Yapılan Kimyasal Çalışmalar

1.6.2.1. Siyah Çay Polifenolleri

A. Teaflavin ve Tearubigenler

Siyah çay polifenolleri, taze çay yapraklarının kontrollü enzimatik reaksiyonları içeren fermentasyon işlemi sonucunda elde edilmektedir. Fermentasyonun derecesi ve süresinin oluşacak olan spesifik siyah çay polifenollerinin miktarını belirlediği bilinmektedir.

1983 yılında yapılan bir çalışmayla, saf kateşinlerin ve polifenol oksidazın kullanıldığı ve çay yapraklarından siyah çay elde etmek amacıyla bir model fermentasyon sistemi dizayn edilmiştir. Bu model fermentasyon sisteminden elde edilen ürünler ile fabrikada uygulanan fermentasyonla elde edilen ürünler Hiperisil ODS kolon'da ve 375 nm'de HPLC yöntemi ile kıyaslandığında, sonuç ürünler açısından çok yakın benzerlikler olduğu sonucuna varılmıştır. Fermentasyon süresinin uzatılmasıyla, teaflavin ve tearubigen miktarlarındaki değişimler not edilmiş ve model fermentasyon sisteminde elde edilen bu polifenollerin miktarlarının fabrika

fermentasyon sistemiyle oluşanlara oranla, çok daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. HPLC analiz sonuçlarında ise; teaflavin, teaflavin-3'-monogallat, teaflavin-3-monogallat, teaflavin-3,3'-digallat, izoteaflavin, epi-teaflavin bileşiklerinin varlığı gözlenmiş fakat tearubigen bileşiklerinin yapılarının kararsız ve değişken olması ve kimyasal kompozisyonunun tam olarak bilinmemesi nedeniyle teşhisleri yapılamamıştır [Robertson ve Bendall, 1983].

Reeves ve arkadaşları Kenya kaynaklı siyah çay örneklerindeki total teaflavin miktarını ve ekstraksiyon için kullanılan çözücünün total miktar üzerine etkisini araştırmışlar ve sonuçta; teaflavinlerin miktar tayininde Flavognost metodunda kullanılan Flavognost reaktifi yerine daha ucuz, daha kolay bulunan alüminyum klorür'n kullanılabilieceğine ve alüminyum-teaflavin kompleksinin stabilitesinin saatlerce bozulmadan kaldığına dikkat çekmişlerdir. Ayrıca siyah çayın ekstraksiyonunda su yerine izobutilmetilketon/su çözücü karışımının kullanılmasıyla ekstredeki total teaflavin miktarında artış gözlediklerini bildirmişleridir [Reeves ve ark., 1985].

Robertson ve Hall, siyah çaydaki teaflavin miktarını belirlemek için kullanılan Flavognost metodundaki kritik parametrelerden söz edip bunlar hakkında yapılan deneysel sonuçları bildirmişlerdir. Buna göre; siyah çay örneğinin partikül büyüklüğünün standardize edilmesi, ekstraksiyon sırasında standart su (distile su veya deiyonize su) kullanılması, ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla teaflavin miktarının da lineer artış gösterdiği; ekstraksiyon süresinin 10 dakikayı geçmesi halinde teaflavin bileşiklerinde parçalanmaya bağlı azalma gözlendiği vurgulanmıştır [Robertson ve Hall, 1989].

1991 yılında yapılan bir çalışmada, siyah çay infüzyonunda bulunan polifenollerin tayini için en uygun HPLC sistemi araştırılmış ve sonuçta; teaflavinlerin tayininde her üç kolonda da sorun yaşanmazken tearubigenlerin molekül ağırlıklarının geniş bir yelpazede olması nedeniyle tek bir kromatografik analizle bütün tearubigen bileşiklerinin ayırımının sağlanmasındaki güçlüklerden bahsedilmiştir. Bu çalışmaya göre; denenen tüm parametrelerde, teaflavinlerin ayırımı gerçekleşmiş olmasına rağmen, en verimli sistemin 460 nm’de asetonitril ve %1’lik sitrik asit içeren sulu mobil fazın gradient elüsyonu olduğu bildirilmiştir. Tayini yapılan teaflavinler; teaflavin, teaflavin-3-gallat, teaflavin-3’-gallat ve teaflavin-3,3’-digallat olarak tespit edilmiştir [Bailey ve ark., 1991].

1992 yılına ait bir çalışmaya göre, siyah çayın üretiminde fermentasyon aşamasında kateşin veya epi-kateşin ve bunların gallatlarından, polifenol oksidaz enziminin katalizlediği oksidatif reaksiyonlar sonucu teaflavinler oluşmaktadır. Bunlar benzotropolon halkası taşıyan ve turuncu-kırmızı renkli bileşiklerdir. Siyah çayın, kuru ağırlık üzerinden %0.3-1.8’ini oluştururlar. Teaflavik asitler ise flavanoller ve gallik asitin bir seri analog reaksiyonu ile oluşan oksidatif ürünlerdir. Tearubigenler, siyah çayın elde edilmesi için gerekli olan fermentasyon işlemi sırasında flavanollerin enzimatik oksidasyonu ile oluşan turuncu-kahverengi, hafif asidik, heterojenik bileşik gruplarıdır. Yapılarının tam olarak aydınlatılamadığı bildirilmektedir [Finger ve ark., 1992].

Önceki yıllarda her bir teaflavin bileşiğinin farklı astrenjan özellik gösterdiği ve coğrafik koşullara göre siyah çayda bulunma miktarlarının değiştiği bildirildiğinden, 1994 yılında yapılan bir çalışmada fermentasyon prosesinin, oluşan teaflavinlerin birbirlerine olan oranı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kenya kaynaklı klonlardan hareketle fermentasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve daha sonra elde edilen ürünün infüzyonu Hiperisil ODS kolon kullanılarak %1 asetik

asit'li su ve asetonitril içeren mobil fazın gradient elüsyonu ile 375 nm'de HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Farklı teaflavinlerin fermentasyon işlemi sırasında farklı oranda oluştuğu ve fermentasyon işleminin teaflavin kompozisyonunu etkilediği sonucuna varılmıştır. Buna ek olarak; coğrafi koşullar dışında, iklimsel ve genetik farklılıkların da teaflavinlerin oluşum oranında etkili olduğu bildirilmiştir [Owuor ve McDowell, 1994].

1996 yılında ise Çin kaynaklı fakat Hindistan'da yetiştirilen *Camellia sinensis* bitkisinden elde edilen siyah çayın mevsimsel değişimlere bağlı kalite araştırması yapılmış ve bunun için siyah çay infüzyonunda bulunan total teaflavin, tearubigen miktarları spektrofotometrik yöntemle 380 nm'de incelenmiştir. Sonuçta; teaflavin ve tearubigen miktarları bitkinin filizlerinin erken oluşum zamanında (Nisan-Haziran) fazla bulunurken, yağmurların olduğu Temmuz ve Ağustos aylarında toplanan filizlerden elde edilen siyah çay örneklerinde miktarlarının azaldığı saptanmıştır. Hasat için en son dönem olarak bilinen Eylül ve Ekim aylarında toplanan filizlerden elde edilen siyah çayda ise bu bileşiklerin miktarlarının çok daha azaldığı gözlenmiştir [Gulati ve Ravindranath, 1996].

Harbowy ve Balentina'nın yaptığı çalışmada, en iyi bilinen fermentasyon ürününün teaflavinler olduğu ve bu bileşiklerin siyah çayda kuru ağırlık üzerinden %3-5 oranında bulunduğu bildirilmiştir. Bu bileşiklerin benzotropolon halkasıyla karakterize olduğu ve bir kateşinin bir gallokateşinle dimerizasyonu sonucu izoteaflavin, neoteaflavin ve teaflavik asit gibi bir seri bileşiğin meydana geldiği belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada tearubigenler için ileri fermentasyon ürünleri tanımı yer almaktadır ve bu bileşiklerin kimyasal yapılarının devamlı farklılık göstermekte olduğu ve spesifik bir kimyasal yapıyla sınıflandırılmadığı bildirilmiştir [Harbowy ve Balentina, 1997] .

Lewis ve arkadaşları, siyah çay ekstresinde NMR, MS spektroskopileri yöntemleriyle yeni 3 polifenolik bileşik karakterize ettiklerini bildirmişlerdir. Bunlar; teaflavat B, izoteaflavin-3'-O-gallat ve neoteaflavin-3-O-gallat'tır [Lewis ve ark., 1998].

Liang ve arkadaşları, Çin kaynaklı 17 siyah çay örneğinin infüzyonlarının Diamonsil C₁₈ kolonunda ve 280 nm'de HPLC analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Örnekten örneğe kimyasal kompozisyonun hayli farklılık gösterdiğini bildiren araştırmacılar; askorbik asit, epi-gallokateşin gallat ve teaflavin-3-gallat'ın değişim katsayılarının %100'ü geçtiği bildirmişlerdir. Yeşil çayda yüksek oranda bulunan epi-gallokateşin galat, siyah çay örneklerinde daha az miktarda bulunduğundan fermentasyon sırasında bu bileşiğin çoğunun okside olduğu sonucuna varılmıştır. Buna ek olarak; gallokateşin, epi-gallokateşin, epi-kateşin, kateşin gallat, teaflavin, teaflavin-3'-gallat bileşikleri ile siyah çayın total kalite skoru arasında pozitif ve belirgin bir bağlantısı olduğu bildirilmiştir. 17 örnek üzerinde yapılan HPLC analiz sonuçlarına göre; siyah çay polifenollerinin miktarları; teaflavin 0,16-5,02 mg/g, teaflavin-3-gallat 0,03-2,01 mg/g, teaflavin-3'-gallat 0,40-8,76 mg/g ve teaflavin-3,3'-digallat 0,06-5,88 mg/g olarak tespit edilmiştir [Liang ve ark., 2003].

Peterson ve arkadaşları literatür verilerine göre siyah çaydaki teaflavin ve tearubigen miktarları üzerine, kaynatma ve ürün farklarının etkisini derlemiştir. Hindistan kaynaklı hibrit çayları yüksek oranda teaflavin ve tearubigen içerirken, Çin kaynaklı hibrit çaylarda teaflavin ve tearubigen içeriğinin düşük bulunduğunu bildirmişlerdir. Ticari poşetlerde satılan çayın ağırlığının da, çay infüzyonu içindeki polifenollerin miktarlarını etkileyen önemli bir parametre olduğunu belirtmişlerdir [Peterson ve ark., 2004].

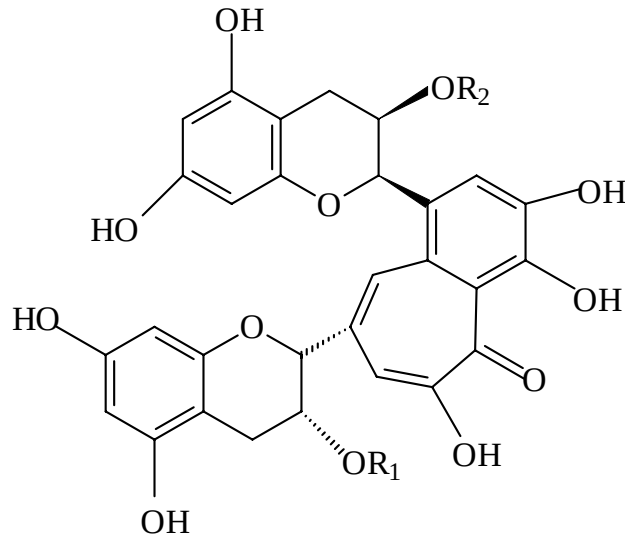
2004 yılında Endonezya kaynaklı siyah çay örneği üzerinde C₁₂ ters faz kullanılarak yapılan LC-MS çalışmasına göre, siyah çay infüzyonunun 64 mg/l teaflavin, 63 mg/l teaflavin-3-gallat, 35 mg/l teaflavin-3'-gallat, 62mg/l teaflavin-3,3'-digallat içerdiği tespit edilmiştir [Del Rio ve ark., 2004].

2005 yılında yapılan bir çalışmada, ticari siyah örneklerinin içerdiği polifenolik bileşikler ve ortalama miktarları; teaflavin 162mg/100g, teaflavin-3-gallat 105 mg/100g, teaflavin-3'-gallat 178 mg/100g ve teaflavin-3,3'-digallat 144 mg/100g olarak bildirilmiştir [Peterson ve ark, 2005].

Steward ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, Kenya orijinli siyah çay örneğinin, gradient elüsyon sistemi kullanılarak ve ters faz kolon içeren HPLC-DAD-MS ile polifenolik bileşikleri teşhis edilip, miktar tayinleri yapılmıştır. Buna göre; teaflavin 117µM, teaflavin-3-gallat 168 µM, teaflavin-3'-gallat 87 µM, teaflavin-3,3'-digallat 194 µM konsantrasyonda tespit edildiği bildirilmiştir [Steward ve ark., 2005].

2006 yılında Neilson ve arkadaşları, siyah çay infüzyonunda bulunan teaflavinlerin teşhis ve miktar tayini HPLC yöntemi kullanarak yapmışlar ve yöntem geliştirmişlerdir. X-Terra-C₁₈ kolonda ve gradient elüsyon tekniği kullanarak yapılan analizde teaflavinlerin 280 nm'de verdikleri sinyaller kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Daha sonra HPLC-DAD analizinde elde edilen piklerin teşhisi için HPLC-ESI-MS analizi gerçekleştirilmiştir. Alınan sonuçlara göre; siyah çay infüzyonunun; teaflavin, teaflavin-3-gallat, teaflavin-3'-gallat ve teaflavin-3,3'-digallat içerdiği saptanmış geliştirilen bu HPLC yöntemiyle siyah çay infüzyonundaki major polifenolik bileşik olarak sadece teaflavinin miktar tayini yapılmıştır ve teaflavin miktarı 4,43 mg/250 ml olarak bildirilmiştir [Neilson ve ark., 2006].

Owuor ve arkadaşları, farklı 11 kültürden elde edilen Kenya kaynaklı siyah çay örneklerindeki total teaflavin ve tearubigen miktarlarını, ayrıca teflavinlerin HPLC analizini yapmışlar ve Flavognost metodu ile miktarlarını saptamışlardır. Total teaflavin miktarı Flavognost metoduyla tespit edilmiş, 14,75-26,38 $\mu\text{mol/g}$ aralığında bulunmuştur. Örneklerin total tearubigen miktarı ise %15,19-19,60 olarak bildirilmiştir. Teşhis ve miktar tayinleri yapılan teaflavinler; teaflavin 4-12,47 $\mu\text{mol/g}$, teaflavin-3-gallat 4,98-6,91 $\mu\text{mol/g}$, teaflavin-3'-gallat 1,25-4,70 $\mu\text{mol/g}$ ve teaflavin-3,3'-digallat 1,20-6,31 $\mu\text{mol/g}$ olarak belirlemişlerdir [Owuor ve ark., 2006].



	R₁	R₂
Teaflavin	H	H
Teaflavin-3-gallat	galloil	H
Teaflavin-3'-gallat	H	galloil
Teaflavin-3,3'-digallat	galloil	galloil

B. Artık Yeşil Çay Polifenolleri

Fermentasyon sırasında yeşil çay polifenolleri hızla siyah çay polifenollerine dönüşmektedir ve fermentasyonun derecesine bağlı olarak bir miktar yeşil çay polifenolleri siyah çayda değişmeden kalmaktadır. Bunlar;

a. Kateşinler

Brooner ve Beccher, HPLC yöntemi kullanarak Tayvan kaynaklı siyah çaydan hazırlanan 3 dakikalık infüzyondaki kateşin miktarlarını gradient elüsyon sistemiyle ve farklı üç mobil faz kullanarak C₁₈ kolonda tayin etmişlerdir. Bu çalışmada mobil faz olarak; asetonitril:sulu asetat tamponu, metanol:sulu asetat tamponu ve asetonitril:sulu askorbat tamponu kullanılmıştır. Pik alanları 210 nm'de ölçülmüştür. Sonuçta, bu iki araştırmacının elde ettiği verilere göre; siyah çayın, epi-gallokateşin (6 mg/dl), epi-kateşin (4 mg/dl), epi-gallokateşin gallat (12 mg/dl) ve epi-gallokateşin gallat (11 mg/dl) içerdiği bildirilmiştir[Brooner ve Beecher, 1998].

1998 yılında yapılan diğer bir çalışma da ise, Hindistan kaynaklı siyah çayın içerdiği bileşikler, miselli elektrokinetik kromatografi yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan siyah çayın üretim aşamasındaki fermentasyon işlemi hafif tutulduğundan yüksek oranda kateşin içeriği tespit edilmiştir. Major kateşin olarak epi-gallokateşin gallat ve epi-kateşin gallat bulunmuş, epi-kateşin piki çok küçük gözlenirken, epi-gallokateşin varlığı tespit edilememiştir. Ayrıca spektral özellikleri epi-gallokateşin gallata benzeyen fakat göç zamanı çok daha ileride olan bileşiklerin de bisflavonoitler olabileceği sonucuna varılmıştır [Larger ve ark., 1998].

Zuo ve arkadaşları, Boston'daki Çin mahallesindeki lokal bir marketten satın aldıkları siyah çay örneğini %80'lik metanol ile 3 saat boyunca ekstre ettikten sonra; %0.15 HCl içeren %80'lik metanol ile 3 saat boyunca tekrar ekstre etmişler ve ekstreleri distile-deiyonize su ile seyreltmışlerdir. Daha sonra C₁₈ gard kolon ve C₁₈ ters faz kullanarak su:asetik asit (97:3, h/h) ve metanol ile gradient sistemde ve 280 nm'de HPLC analizlerini gerçekleştirmişlerdir. İncelenen örnekte; epi-kateşin 1,36 mg/g, epi-kateşin gallat 4,45 mg/g, epi-gallokateşin 5,71 mg/g ve epi-gallokateşin gallat 3,79 mg/g bulunduğu saptanmıştır [Zuo ve ark., 2002].

2005 yılında yapılan bir çalışmada ise, Kenya orijinli siyah çay örneğinin, gradient elüsyon sistemi kullanılarak, 280 nm'de ve ters faz kolon içeren HPLC-DAD-MS yöntemi ile kateşinlerinin teşhisi ve miktar tayinleri yapılmıştır. Sonuç olarak; epi-gallokateşin 48 µM, epi-kateşin 34 µM, epi-gallokateşin gallat 52 µM, epi-kateşin gallat 58 µM konsantrasyonda tespit edildiği bildirilmiştir [Steward ve ark., 2005].

Nelson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada siyah çay infüzyonunda bulunan kateşinlerin teşhis ve miktar tayini HPLC yöntemi kullanılarak tespit edilmeye çalışılmış ve yöntem geliştirilmiştir. X-Terra-C₁₈ kolonda ve gradient elüsyon tekniği kullanılarak yapılan analizde kateşinlerin 280 nm'de verdikleri sinyaller kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Daha sonra HPLC-DAD analizinde elde edilen piklerin teşhisi için HPLC-ESI-MS analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre; siyah çay infüzyonunun, 6,77 mg/250ml epi-gallokateşin , 15,2 mg/250ml epi-kateşin, 14,6 mg/250ml epi-gallokateşin gallat, 12,5 mg/250ml epi-kateşin gallat içerdiği tespit edilmiştir [Neilson ve ark., 2006].

b. Flavonoller

Wang ve Helliwell, 2 farklı ticari siyah çaydan hazırlanan infüzyonlardaki hidroliz sonrası ortaya çıkan flavonollerin, analizlerini HPLC yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Analizler C₁₈ kolonda ve izokratik sistemde gerçekleştirilmiş ve pik alanları 370 nm'de ölçülmüştür. Aynı çalışmada flavonol glikozitlerinin hidroliz işlemi sırasında kullanılabilecek en iyi çözücünün etanol olduğu tespit edilmiş ve siyah çay örneklerinde, 0,24-0,52 g/kg mirisetol, 1,04-3,03 g/kg kersetol ve 1,72-2,31 g/kg kemferol varlığı bildirilmiştir [Wang ve Helliwell, 2001].

Del Rio ve arkadaşlarının Endonezya kaynaklı siyah çay örneği üzerinde C₁₂ ters faz kullanılarak yapılan LC-MS çalışmaya göre siyah çay infüzyonunun içerdiği flavonol glikozitleri ve miktarları; 12 mg/L kersetol-ramnoz-galaktozit, 98 mg/L kersetol-3-rutinozit 75 mg/L kersetol-3-galaktozit, 25 mg/L kersetol-ramnoz-heksoz-ramnoz, 119 mg/L kersetol-3-glukozit, 30 mg/L kemferol-ramnoz-heksoz-ramnoz, 29 mg/L kemferol-galaktozit, 60 mg/L kemferol rutinozit, 69 mg/L kemferol-3-glukozit olarak tespit edilmiştir [Del Rio ve ark., 2004].

2005 yılında yapılan bir çalışmada ise Kenya orijinli siyah çay örneğinin, gradient elüsyon sistemi kullanılarak ve ters faz kolon içeren HPLC-DAD-MS ile flavonol yapıları teşhis edilip, miktar tayinleri yapılmıştır. İncelenen örnekte; kersetol-ramnoz-galaktozit 4,5µM, kersetol-3-rutinozit (29 µM), kersetol-3-galaktozit (27 µM) kersetol-heksoz-ramnoz-ramnoz (25 µM) ve kemferol-ramnoz-heksoz-ramnoz (5.4 µM), kemferol galaktozit (11 µM), kemferol-3-rutinozit (21 µM) , kemferol-3-glikozitin (29 µM) tespit edildiği bildirilmiştir [Steward ve ark., 2005].

2005 yılında yapılan bir çalışmaya göre; 100 g kuru siyah çay 0,4 g flavonol ve 0,06 g flavonon içermektedir. Yine aynı çalışmada siyah ve yeşil çayın flavonol içeriklerinde pek bir fark bulunmadığı, bu konuda bir tek mirisetinin istisna olduğu bildirilmektedir. Mirisetol miktarının yeşil çayda, siyah çaya nazaran daha fazla oranda bulunduğu ve bunun nedeninin de fermentasyon prosesi olduğu düşünülmektedir [Peterson ve ark., 2005].

1.6.2.2. Siyah Çay’da Bulunan Metilksantinler

1996 yılında Çin kaynaklı fakat Hindistan’da kültüre alınan *C. sinensis* bitkisinden elde edilen siyah çayın mevsimsel değişimlere bağlı olarak kafein içeriği araştırılmıştır. Bunun için siyah çay infüzyonunda bulunan kafein miktarı, spektrofotometrik yöntemle 270 nm’de tespit edildiğinde; kafein miktarının bitkinin filizlerinin erken oluşum zamanında (Nisan-Haziran) fazla olduğu belirlenirken, yağmurların olduğu Temmuz ve Ağustos aylarında toplanan filizlerin alkaloit miktarında azalma tespit edilmiş ve hasat için son dönem olarak bilinen Eylül ve Ekim ayında toplanan filizlerdeki alkaloit miktarında ise hafif bir artış gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada önceki yıllarda yapılan araştırmalara göre, mevsimsel dalgalanmaların kafein içeriğine minimal etkisinin olduğunun saptandığı bildirilmiştir [Gulati ve Ravindranath, 1996].

Zuo ve arkadaşları, Boston’daki Çin mahallesindeki bir marketten satın aldıkları siyah çay örneğinin C₁₈ gard kolon ve C₁₈ ters faz kullanarak su:asetik asit (97:3, h/h) ve metanol ile gradient sistemde ve 280 nm’de HPLC analizini gerçekleştirmişlerdir. Sonuçta; siyah çay örneğinin 21,6 mg/g kafein içerdiğini tespit etmişlerdir [Zuo ve ark., 2002].

Liang ve arkadaşları, Çin kaynaklı 17 siyah çay örneğinin infüzyonlarının Diamonsil C₁₈ kolonda ve 280 nm'de HPLC analizlerini yapmışlardır. Örnekten örneğe kimyasal kompozisyonun hayli farklılık gösterdiğini bildiren araştırmacılar, bu örneklerdeki kafein miktarlarını 35.3-58.7 mg/g aralığında saptadıklarını belirtmişleridir [Liang ve ark., 2003].

2004 yılında Endonezya kaynaklı siyah çay örneğinden hareketle hazırlanan infüzyon üzerinde C₁₂ ters faz kullanılarak yapılan LC-MS çalışmasında; bileşiklerin alıkonma zamanları, absorbans spektrumları ve MS yarılmalarına göre yapılan teşhislerde, siyah çay örneğinin 541 mg/l kafein ve 25 mg/l teobromin alkaloidlerini içerdiği tespit edilmiştir [Del Rio ve ark., 2004].

Steward ve arkadaşları, Kenya orijinli 3 g siyah çay örneğinden hareketle hazırladıkları infüzyonki metilksantin bileşiklerinin HPLC-DAD-MS yöntemi ile tayinini yapmışlar ve örnekteki kafein miktarını 1295 µM ve teobromin miktarını ise 49 µM olarak tespit ettiklerini bildirmişleridir [Steward ve ark., 2005].

2006 yılında yapılan bir çalışmada ise siyah çay infüzyonunda bulunan kafein bileşiğinin miktar tayini için X-Terra-C₁₈ kolon ve gradient elüsyon tekniği ile HPLC yöntemi kullanılmış ve yapılan analizde kafeinin 280 nm'de verdiği sinyaller kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Daha sonra HPLC-ESI-MS analizi ile bileşiğin teşhisi gerçekleştirilmiştir. Sonuçta, siyah çay infüzyonunun 63 mg/250ml kafein içerdiği tespit edilmiştir [Neilson ve ark., 2006].

1.6.2.3. Siyah Çay Aroması

Siyah çayın aromasını etkileyen parametrelerden bitkinin yetiştiği bölge, iklimsel koşullar dışında önemli parametrelerden bir tanesinin de fermantasyon işlemi olduğu düşünülmektedir. Fermantasyon işlemi sırasındaki oksidasyon koşullarına bağlı olarak pek çok bileşiğin oluştuğu bilinmektedir.

Renold ve arkadaşları, siyah çaydan hareketle uçucu bileşikleri içeren bir ekstre hazırlayıp GC/MS yöntemiyle analizini gerçekleştirmişlerdir ve sonuçta; 68 bileşiğin teşhisini yapmışlardır. Bunların içinde 21'i aldehit, 14'ü keton, 20'si ester yapıdaki bileşiklerin olduğu bildirilmiştir. Bu bileşiklerin bir kısmının polifenoliklerin parçalanması ile oluştuğu bir kısmının prekürsörlerinin lipitler olduğu düşünülmektedir. Ayrıca fermentasyon sırasında oluşan amino asit türevleri uçucu bileşiklerin de bulunduğu bildirilmiştir [Renold ve ark., 1974].

Howard'ın yaptığı derleme çalışmasına göre; çayın uçucu bileşikleri 4 parametre ile ifade edilebilir. Bunlar; *Parametre A*, linalol ve oksitlerinin oluşturduğu floral not. *Parametre B*, trans-2-hekzenal'in oluşturduğu sebzemsi bir aroma, *Parametre C*, hekzenal, 1-penten-3-ol, cis-2-penten-1-ol, cis-3-hekzen-1-ol'ün oluşturduğu taze, yapraksı koku ve *Parametre D*'nin ise daha komplike olmasına rağmen koku notunun taze ve yeşilimsi olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada yine, siyah çay aromasında bulunan linalol, linalol oksit ve metil salisilatın güzel bir kokuya sahip olmasına rağmen, asetik asit, 3-metilbutanon benzil alkol ve β -osimen bileşiklerinin istemeyen bir koku yaydıkları belirtilmiştir. En son iklimsel farklılıkların ve üretim prosesinin uçucu bileşiklerin kimyasal kompozisyonunu önemli ölçüde etkilediği vurgulanmıştır [Howard, 1978].

1995 yılında siyah çay aroması ile ilgili diğer bir çalışmada ise; ekstraksiyon ile buhar distilasyonu (SDE) yöntemleri kıyaslanarak siyah çay aromasının Carbowax kolonda GC/MS analizi yapılmıştır. Ekstrede total 38 bileşiğin tayini yapılırken, SDE ürünü için bu sayı 52 olarak tespit edilmiştir. Ekstrede yüksek oranda asit, aromatik alkol ve monoterpendioller gözlenmiş, ancak monoterpen alkollerin miktarı SDE yöntemine kıyasla çok daha düşük bulunmuştur. SDE yöntemiyle elde edilen major bileşikler; geraniol, linalol, linalol oksit I II, IV ve metil salisatken, ekstrenin linalol oksit II, geraniol, linalol oksit IV, trans-geranik asit, linalol, (E)-2-hekzenoik asit, benzil alkol hekzenoik asit, 2-fenil etanol, (Z)-hekzenoik asit ve 2,6-dimetil-3,7-oktadien-2,6-diol'ü major bileşik olarak içerdiği bildirilmiştir [Kawakami, ark., 1995].

Siyah çay eldesi sırasında kullanılan üretim aşamaları sırasında siyah çayın içerdiği amino asit, vitamin ve mineraller, karbohidrat ve lipidlerin yeşil çayla kıyaslandığında, miktar ve içerik yönünden değişmediği bildirilmiştir [Harbowy ve Balentina, 1997; Yamamoto ve ark., 1997] .

1.7. Yeşil Çay ve Siyah Çay'ın Biyolojik Etkileri

1.7.1. Kansere Karşı Etkileri

Çay tüketimi ile kanser insidansı arasında ilişki pek çok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Bazı araştırmalara göre, çay tüketiminin belli kanser tiplerine karşı koruyucu etkisi olduğu savunulurken, diğer çalışmalarda bu tip bir koruyucu etkinin olmadığı yönünde sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklılıklarının nedeni olarak da farklı kanser tipleri, farklı hasta özellikleri ve kansere neden olan farklı faktörlerle çalışılması gösterilmiştir. Yeşil ve siyah çayın kanser önleyici etkisinin, içerdikleri polifenollerin antioksidan ve antiproliferatif etkilerine bağlı olarak ortaya çıktığı bilinmektedir.

1.7.1.1. Antioksidan Etki

Çay polifenolleri farklı 3 mekanizma ile antioksidan etki göstermektedir. Bunlar;

- Bu polifenoller yapılarında kateşol içerdiklerinden, metal iyonlarıyla güçlü bağlar oluştururlar. Örneğin; demir iyonları ile bağlanarak miktarlarını azaltması gibi.
- EGCG, EGC ve ECG gibi çay polifenolleri süperoksit anyon ve hidroksi radikallerini süpürücü etkiye sahiptirler. Bu iki radikal de DNA'yı ve diğer hücresel molekülleri hasara uğratarak lipid peroksidasyon reaksiyonlarının başlamasına neden olmaktadır.

- Çay polifenolleri, peroksil radikalleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını durdurmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin DNA hasarı ve genetik deformasyon yapması, hücre büyümesini ve değişimini etkilemesiyle kanserde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir [Li, 2002].

1996 yılında yapılan bir çalışma ile, teaflavinlerin total antioksidan aktivitesi ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) ve deoksiriboz yöntemleri kullanılarak araştırılmış ve teaflavinler için antioksidan etki sıralaması, teaflavin-3,3'-digallat> teaflavin-3-gallat=teaflavin-3'-gallat>teaflavin olarak tespit edilmiştir. Buna göre; teaflavinlerin gallatlarla oluşturduğu ester yapısının bu etkiyi güçlendirdiği sonucuna varılmıştır [Miller ve ark. 1996].

Nanjo ve arkadaşları, kateşinlerin ve epimerize türevlerinin DPPH radikali üzerine süpürücü etkilerini araştırmışlar ve bunlar arasında etki açısından bir fark gözlemediklerini bildirmişlerdir. Buna göre; kateşinlerin radikal süpürücü etkilerinin sterik yapılarına bağlı olmadığını bildirmişlerdir. Flavan-3-ol yapısının 3. konumunda bulunan galloil artığı ve B halkasındaki o-trihidroksi gruplarının bu güçlü etkiden sorumlu olabileceği sonucuna varmışlardır. Bu bileşiklerin, farklı pH'larda DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) üzerine etkisi araştırıldığında ise EGC, EGCG, ECG geniş pH aralıklarında dahi güçlü bir aktivite gösterirken, kateşin ve EC'in nötral ve alkali koşullarda etkilerinin sınırlı olduğunu tespit ettiklerini belirtmişlerdir [Nanjo ve ark., 1996].

Değişik kaynatma zamanları ve koşulları kullanılarak siyah çay ve yeşil çayın içerdiği total polifenolik bileşiklerin miktarı ve bunların antioksidan aktivitesi, Troloks eşdeğer antioksidan kapasite metodu ve düşük dansiteli lipoprotein oksidasyon testi kullanılarak araştırıldığında; her iki çay örneğinin kaynatma zamanı arttıkça total polifenolik miktarı ve buna bağlı olarak antioksidan aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, kaynatma sırasında karıştırma işleminin

yapılmasının da ekstrelerdeki polifenol miktarını arttırdığı belirlenmiştir [Liebert ve ark., 1999].

Sung ve arkadaşları, yeşil çayın invivo antioksidan etkisini ve etkinin olduğu dozu 10 sağlıklı birey (yaş aralığı 23-25 olan 5 kadın, 5 erkek) üzerinde araştırmışlardır. Sonuçta, 300 ml ve 450 ml tüketilen yeşil çay infüzyonundan sonra , plazmadaki total antioksidan kapasitenin belirgin şekilde arttığını bildirmişleridir [Sung ve ark., 2000].

Camellia sinensis köklerinin metanollü ekstresinden izolen edile TS-1 ve TS-2 saponinlerinin invitro antioksidan etkileri olduğunu ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile tespit edilmiştir [Sur ve ark., 2001].

Yeşil çay kateşinleri olarak bilinen epi-kateşin (EC), epi-kateşingallat (ECG), epi-gallokateşin (EGC) ve epi-gallokateşin gallat ile siyah çay polifenollerini olan teaflavin (TF₁), teaflavin-3-gallat (TF₂-A), teaflavin-3'-gallat (TF₂-B), teaflavin-3,3'-digallat (TF₃-A) bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri LDL oksidasyon sistemi kullanılarak ve her bir kateşin ve TF'ler 5µmol/L konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanıp kıyaslanmış ve bileşiklerin antioksidan aktivite sıralaması; TF₃>ECG>EGCG>TF₂B>TF₂A>TF₁>EC>EGC olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre, siyah çayda bulunan teaflavinlerin yeşil çayda bulunan kateşinlerle aynı antioksidan etki potansiyelinin olduğu ve fermentasyon işlemi sırasında serbest radikal süpürücü etkinin belirgin bir değişikliğe uğramadığı sonucuna varılmıştır [Leung ve ark., 2001].

Fadel ve Arman, sıçanlarda CCl₄ ile indüklenmiş lipit peroksidasyonuna karşı %0,7'lik siyah çay infüzyonunun etkilerini araştırmış ve sonuçta; 75 günlük siyah çay uygulamasının sonunda antioksidan etkisine bağlı olarak karaciğer ve böbrek dokularında lipit peroksidasyonunda azalma gözlediklerini ve siyah çayın lipit

peroksidasyona karşı koruyucu etkisinin olduğunu bildirmişleridir [Fadhel ve Arman, 2002].

2002 yılında yapılan bir çalışmada, DPPH yöntemi kullanılarak yeşil çay kateşinlerinin antioksidan etkileri araştırılmış ve sonuçta bileşiklerin radikal süpürücü etki sıralamasının $ECG \geq EGCG \geq EGC \geq GC \geq EC$ olarak bulunduğu bildirilmiştir [Kinjo ve ark., 2002].

Yeşil çay kateşinleri, *invivo* total plazma antioksidan aktivitesinin ve süperoksit dismutaz enziminin artışını sağlamaktadır ki bu da reaktif oksijen türlerine karşı hücrelerin korunması demektir. Deneysel sonuçlara göre; kateşinlerin direkt (antioksidan etki) ve indirekt (antioksidan etkinin arttırılmasına yönelik etki) antioksidan etkiye sahip olduğu düşünülmektedir [Crespy ve Williamson, 2004].

Yeşil çay ve siyah çay polifenollerinin oksidatif stresi azaltma yetenekleri farklı mekanizmalarla olmaktadır: **1.** bu bileşiklerin direkt radikal süpürücü etkileri bilinmektedir. **2.** Nitrik oksit sentaz enzim aktivitesini baskırlar. Bu enzim, arjinin amino asiti ve oksijenden $NO\cdot$ oluşturur; ve tekrar O_2^- ve NO 'nun reaksiyona girmesiyle kuvvetli bir serbest radikal olan peroksinitrit açığa çıkar. Çay polifenollerinin peroksinitrite karşı da güçlü bir süpürücü etkisi vardır. **3.** Ksantin dehidrogenaz sistemi (XDH)/XO iskemik reperfüzyon yaralanmalarında serbest radikaller için potansiyel bir kaynak olabilmektedir. Çay polifenollerini ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ederek etkilerini gösterebilirler. **4.** Lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarını hücresel düzeyde parçalayarak, serbest radikallerin etkilerini yok eder. **5.** Organizmada bulunan antioksidanların konsantrasyon/aktivitesini arttırarak dolaylı antioksidan aktivite de göstermektedir. Yeşil çay ve siyah çayın polifenollerinin kimyasal yapılarında içerdikleri hidroksil gruplarının konumu, sayısı ve galik asit artışı içermesi antioksidan aktiviteyle doğrudan

ilişkilendirilmektedir [Wheeler ve Wheeler, 2004; Lucazj ve Skrzydlewska, 2005; Rah ve ark., 2005].

Chen ve arkadaşları, Çin kaynaklı düşük kaliteli bir yeşil çay örneğinden izole edip, saflaştırdıkları çay polisakkaritlerinin 3 farklı yöntemle in vitro antioksidan aktivitesini araştırmışlar ve sonuçta; çay polisakkarit fraksiyonunun etkili bir antioksidan olduğu sonucuna varmışlardır [Chen ve ark., 2005].

1.7.1.2. Antitümöral ve Antikarsinojenik Etki

Goldbohm ve arkadaşları, hem siyah çayda hem de yeşil çayda fazla miktarda bulunan antioksidan özellikli polifenolik bileşiklerin antikanserojenik etkilerinin olduğuna dair çalışmaları göz önüne alarak, siyah çay tüketen yaş aralığı 55-69 olan 58279 kadın ve 62573 erkekte mide, kolorektal, akciğer ve meme kanseri risk faktörleri arasında bağlantı olup olmadığını araştırmışlar ve sonuçta; siyah çay tüketiminin insanlarda bu 4 tip kansere karşı koruyucu etkisinin olmadığını ve ayrıca kanseri çoğaltan bir etkinin de mevcut olmadığını tespit etmişleridir [Goldbohm ve ark., 1996]

1997 yılında yapılan çalışmada yeşil çayın sulu ekstresi ve yeşil çayda izole edilen polifenolik fraksiyonun, (GTP) farelerin deri tümörü model sisteminde kanser önleyici etkileri araştırılmış ve sonuçta GTP'nin hem invitro hem de UV ile indüklenmiş invivo deri kanserine karşı inhibisyon etkisi saptanmıştır. Çay tüketen farelerde kimyasal karsinojen ile indüklenmiş mide, akciğer, özofagus, duodenum pankreas, karaciğer, meme ve kolon kanserine karşı önleyici etkisi bildirilmiştir. Yeşil çayda bulunan kateşinlerin özellikle EGCG'nin antikanserojen etkisinin bulunduğu belirtilmiştir [Katiyar ve Mukhtar, 1997].

Amerika ay enstitüsünden alınan siyah çay infüzyonu (%1,25 a/h) ve süt ilave edilen siyah çay infüzyonunun (%1,85 h/h) sıçanlarda kimyasal olarak indüklenen meme ve kolon kanserine karşı etkileri araştırılmış ve sonuçta; siyah çay infüzyonunun meme tümörünün çoğalmasını, hacmini ve kolondaki lezyon odaklarını azaltırken, süt ilave edilmiş siyah çay infüzyonunun çok yüksek koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmayla ilk defa sütün tek başına kansere karşı koruyucu etkisi yokken, çay infüzyonuna ilavesiyle infüzyonun etkisini çoğalttığı tespit edilmiştir [Weisburger ve ark., 1997].

Imai ve arkadaşları yaptıkları laboratuvar çalışmaları sonucu yeşil çayın kansere karşı koruyucu etkilerini tespit ettikten sonra, Japon popülasyonunda yeşil çay tüketimi ile kanser arasındaki bağlantıları araştırmaya karar vermişlerdir. Günlük hayatında yeşil çay tüketme alışkanlığı olan 40 yaş civarı 8552 birey üzerinde, 384 kanser vakasını çalışmışlardır. Sonuçta; yeşil çay tüketimiyle kanser insidansı arasında negatif bir korelasyon -özellikle günde 10 bardaktan fazla yeşil çay tüketen kadınlarda- gözleendiği bildirilmiştir. Kanser insidansının bağıl riski, fazla miktarda yeşil çay tüketimine bağılı olarak hem erkeklerde hem de kadınlarda azalmış olduğu saptansa da, erkeklerde kansere karşı koruyucu etki istatistiksel olarak çok artmamıştır. Bunun nedeni olarakta; sigara ve alkol tüketimi, tüketilen besinlerin farklılıkları gösterilmiştir [Imai ve ark., 1997].

1998 yılında yapılan bir çalışmada ise, yeşil çayın non-polifenolik fraksiyonunda bulunan feofitin a ve feofitin b bileşiklerinin farelerin derisinde kimyasal olarak indüklenmiş tümör oluşumuna karşı etkileri araştırılmış ve sonuçta; 100µg feofitin a veya 500µg feofitin b doza bağılı olarak tümör insidansında belirgin azalma sağladığı bildirilmiştir [Higashi-Okai ve ark., 1998].

Yapılan diğerk bir çalışmada %97'den daha saf olan epi-gallokateşin gallat bileşiğinin 10µg/ml su- 80 µg/ml su dozdaki etkileri, insan prostat kanseri hücrelerini içeren kitler kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçta 40 ve 80 µg/ml dozdaki EGCG bileşiğinin kanserli hücrelerde belirgin bir apoptoz gösterdiğı bildirilmiştir [Gupta ve ark., 2000].

Saeki ve arkadaşları, kateşin bileşiklerinin insan lenfoma hücreleri içeren kitler üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta, B halkasındaki pirogallol yapısı içeren kateşinlerin apoptozu indükledikleri ve 3-O-gallat grubunun B halkasıyla cis- konumu oluşturmasının bu etkiyi arttırdığı sonucuna varmışlardır [Saeki ve ark., 2000].

Yeşil ve siyah çayın polifenolik antioksidanlar içermesine bağılı olarak kanser riskini azaltıp azaltmadığı pek çok deneysel ve epidemiyolojik çalışmalarla araştırılmıştır. Bu çalışmaların çoğunda, yeşil çayın kansere karşı koruyucu etkisi bulunurken, çok az çalışmada siyah çayın böyle bir etkisinin olmadığı yönünde görüş bildirmiştir. Her iki örneğın de fare, sıçan ve hamsterlarda kimyasal karsinojenle veya UV radyasyonu ile indüklenen deri, özefagus, akciğer, mide, duodenum pankreas, karaciğer, meme ve kolon kanserlerine karşı koruyucu etkileri tespit edilmiştir [Mukhtar ve Ahmed, 2000].

Sadzuka ve arkadaşları, yeşil çayın içerdığı bileşiklerin –teanin, kafein, EGCG- doksorubisinin kanser hücrelerinden dışarı akışını engellediğini ve bu yüzden bu ilacın tümör içinde daha fazla kalmasını sağılayarak etkisini arttırdıklarını tespit etmişlerdir. Bu bileşiklerin düşük toksisiteye sahip oldukları düşünölünce antitümör bir ajanla kombine bir şekilde tüketilmelerinde birkaç hafif yan etkinin oluşabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, yeşil çayın hasta tarafından tüketilmesinin psikolojik bir rahatlama da sağılamasıyla, kemoterapotik indeksin veriminin artacağını ve bu verimliliğın kanser kemoterapisi alan hastaların hayat kalitesine

pozitif bir etki sağlayacağını düşünmektedirler [Sadzuka ve ark., 2000].

Farelerde, UV radyasyon ışığı ile indüklenen deri tümörleri 6 mg/ml yeşil çay ve siyah çay oral verilerek gözlenmiştir. 23 haftanın sonunda tümör sayılarında ve tümöre uzak veya direkt tümörün altındaki dermal yağ tabakasının kalınlığında belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Kafeinsiz çayların verilmesiyle tümöre ait bu parametrelerde ya çok az ya da hiçbir değişimin gözlenmediği bildirilmiştir. Kafeinin tek başına verilmesi (0.44mg/ml) ile de tümör sayılarında ve dermal yağ tabakasının kalınlığında azalma bildirilmiştir. Sonuçta; kanser inhibisyonu ile dokulardaki yağ tabakalarının kalınlığının azalması arasında yakın bir ilişki olduğu fikri savunulmaktadır [Lu ve ark., 2001].

Sarkar ve Bhaduri, siyah çay ve yeşil çay infüzyonu ile içerdikleri polifenollerin NO oluşumuna karşı oluşturdukları inhibitör etkiyi ve süperoksit anyonunu süpürücü etkilerini araştırmışlar ve siyah çayın NO oluşumunu inhibe edici ve radikal süpürücü etkilerinin yeşil çaydan daha ve hatta teflavin ve EGCG bileşiklerinde bile daha fazla olduğunu tespit etmişleridir. Sonuçta, siyah çay infüzyonunda bulunan bütün bileşiklerin additif etkileri olabileceği sonucuna varmışlardır [Sarkar ve Bhaduri, 2001].

Uesato ve arkadaşları, epi-kateşin (EC), epi-gallokateşin (EGC) ve epi-gallokateşin gallatın kolorektal ve hepatosellüler karsinoma hücreleri üzerine invitro inhibisyon etkilerini araştırmışlardır. Her bir kateşinin 10µl'lik porsiyonlar halinde hücrelere inkübasyonu sonucunda EGCG ve EGC'in pirogallol yapısını içermelerine bağlı olarak belirgin bir inhibisyon yetenekleri olduğu ve farmakokinetik özellikleri geliştirildikten sonra, kolon kanserinde kullanılabilecekleri belirtilmiştir [Uesato ve ark., 2001].

Yapılan diğerk bir çalışmada EC hariç, EGCG, EGC, ECG'in 100µM konsantrasyonda ve 50 µg/ml yeşil çay ekstresinin, reaktif oksijen türlerinin artışına ve mitokondrial depolarizasyona bağlı olarak gelişen prostat kanserinde hücrelerin büyümesini baskıladıkları ve apoptozu indükledikleri tespit edilmiştir. Kateşinlerin ECG>EGCG>EGC>EC şeklinde bir etki sıralamasının da yapılabileceği bildirilmiştir [Chung ve ark., 2001].

Yapılan bir derleme çalışmasında; kafeinsiz yeşil ve siyah çayın farelere içirilmesi ile 16 hafta sonra, kimyasal olarak indüklenmiş akciğer tümörlerinin çoğalmasının baskılandığı ve hacimlerinde belirgin bir azalma gözlendiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada mide kanseri üzerine yapılan 15 araştırmanın, 5'inde çayın mide kanseri riskine karşı koruyucu özelliği olduğu belirtilirken, 2 çalışma pozitif bir bağlantıdan bahsetmiştir. Diğer 8 alışma ise çay tüketimi ile mide kanseri arasında hiçbir bağlantının olmadığı açıklanmıştır [Yang ve ark., 2001].

2002 yılına ait bir derleme çalışmasında; siyah çay içirilen farelerde UV ışınıyla indüklenmiş olan deri tümörlerinin büyümesinin yavaşladığı ve çayın hızla tümördeki apoptoz indeksini arttırdığı belirtilmiştir. Çayın mutajen ve karsinojenlerin oluşumunu bloke ederek veya genotoksik karsinojenlerin biyokimyasal aktivasyonunu inhibe ederek ve buna benzer pek çok farklı mekanizmayla etkisini gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca genotoksik karsinojenler ve hücrede meydana gelen oksidatif proseslerin DNA'nın değişmesine yol açan reaktif oksijen türlerini oluşturduğu bilinmektedir. ay polifenolleri oksidatif hasarlara karşı etkili inhibitörler olduklarından, bu bileşiklerin kansere karşı da koruyucu etkisinin olduğu söylenmektedir. Aynı çalışmada, özofagus, ağız ve akciğer kanserinin sigara içimi ve tütün kullanımıyla bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Yeşil ve siyah çayın insanlardaki kanser riskini azalttığı da ve yeşil çay, anabileşikleri olan EGCG ile kafeinin nikotin türevi tütün

karsinojenlerinden nitrozaminlerin indüklediği akciğer tümörlerini inhibe ettiği bildirilmiştir ve bu inhibisyon mekanizması antioksidan aktivitesiyle ilişkilendirilebileceğinden söz edilmiştir. Çay, tütün karsinojenlerine bağlı mutajeniteyi de inhibe etmektedir. Sigara tüketen Japon erkeklerin, onlara nazaran daha az sigara içen Avrupalı erkeklere göre kansere yakalanma insidanslarının çok daha düşük olduğunu, bunun nedenin de; Japonların yağ ve kolesterolce fakir, fakat flavonoidce zengin besinleri tüketmesine bağlamışlardır. Aynı çalışmaya göre, *Helicobacter pylori* bakterisinin mide lezyonun içindeki gastrik mukozada hücre döngüsünü arttırdığı ve bunun da mide kanserine yakalanma riskini çoğalttığı belirtilmiştir. Çay polifenollerinin bakterisit ve bakteriyostatik etkileri bilinmektedir. Bu etkilerine bağlı olarak mide kanserine ve kronik gastrite karşı etkili olduğu savunulmaktadır [Weisburger ve Chung, 2002].

2002 yılında siyah ve yeşil çay infüzyonunun 0,2 ml/ 10g vücut ağırlığı dozda uygulandığında, farelerde kimyasal olarak indüklenmiş tümör büyümesi üzerine etkilerini araştıran bir çalışmanın sonucuna göre; 3 ayın sonunda hem siyah çay hemde yeşil çay verilen farelerde tümör büyümesinde belirgin bir azalma ve farelerin serum düzeylerinde superoksit dismutaz enziminde artış gözlenmiştir. Oksidatif stresin kanserin başlangıç fazını tetiklediği ve serumdaki superoksit dismutaz enzim değerinin, koruma mekanizmasının önemli bir göstergesi olduğu bilindiğinden; siyah ve yeşil çayın antioksidan etkilerine bağlı antitümöral aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır [Das ve ark., 2002].

Kinjo ve arkadaşları, yeşil çayın sulu ekstresinden elde ettikleri fraksiyonların, insan mide kanseri hücrelerine karşı antiproliferatif etkilerini araştırmışlar ve flavan-3-ol yapılarını içeren fraksiyonun etkili olduğunu tespit etmişlerdir. EGCG ve GCG en yüksek aktiviteye sahipken, EC'in en düşük antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir.

Buna göre pirogallol yapılarının varlığının etkiyi güçlendirmiş olabileceği belirtilmiştir [Kinjo ve ark., 2002].

2003 yılında yapılan bir derleme çalışmasına göre; hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde, UV ışık ve kimyasal olarak indüklenmiş tümörlere karşı yeşil çay, siyah çay ve izole edilen çay polifenollerin inhibisyon etkisinin olduğu bildirilmiştir. Çay ve bileşiklerinin deri akciğer, özofagus, mide, karaciğer, ince barsak, pankreas, kolon ve meme kanserine karşı inhibisyon etkisi tespit edilmiş fakat kafeinsiz yeşil çay ve siyah çayın UV ile indüklenmiş kanser oluşumuna karşı etkisiz olduğu söylenmiştir. İnsan üzerinde yapılan bazı çalışmalarda ise yeşil çayın fazlaca tüketildiği Japon ve Çin popülasyonunda gastrointestinal sistem kanserlerine karşı etkili olduğu savunulurken Japonya’da yapılan bir çalışmaya göre yeşil çay tüketimi ile mide kanseri arasında bir bağlantı tespit edilmediği bildirilmiştir. Ayrıca Hollandalılar, meme, klorektal ve mide kanser riskine karşı siyah çay tüketiminin hiçbir etkisinin olmadığını deneysel sonuçlarla göstermişlerdir. Fakat, Amerika’da yapılan bir çalışmada, siyah çay tüketiminin erkek ve kadın popülasyonunda kolon kanseri riskini azalttığı bildirilmiştir [Lanbert ve Yang, 2003].

2004 yılında yeşil çayın, kansere karşı etkilerinin derlendiği bir çalışma yapılmış ve yeşil çayın; fare, sıçan ve hamsterlarda farklı pek çok kimyasalla indüklenen kolorektal, akciğer, karaciğer, meme ve prostat kanserlerine karşı inhibisyon ve antitümöral etkilerinin saptandığı bildirilmiştir. Yeşil çayda bulunan major kateşin EGCG’ın da antikanserojen etkilerinin bulunmasına rağmen, yeşil çay infüzyonu kadar etkili olmadığı ve bu bileşik ile infüzyonda bulunan diğer bileşiklerin additif veya sinerjik etki yaratarak aktiviteyi güçlendirdikleri düşünülmektedir [Crespy ve Williamson, 2004].

2005 yılında yeşil çay polifenollerinin kanser hücrelerine karşı etkilerini derleyen diğer bir çalışmada; EGCG'nin 5 mg dozda topikal olarak uygulandığı farelerde kimyasal olarak indüklenen deri tümörlerini 20 haftanın sonunda tamamen yok ettiği bildirilmiştir. Ayrıca yeşil çay kateşinlerinden EGCG, EGC, ve ECG'nin doza bağlı olarak insanlarda akciğer kanserinin yayılmasını önlediği, EC'nin ise etkisiz olduğu bildirilmiştir. EC'nin kendisi etkisiz olsa bile, diğer kateşinlerle birlikte uygulandığında, bir sinerjizm yaratarak, etkili kateşinlerin aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir [Fujiki, 2005].

2005 yılında yapılan bir çalışma ile yeşil ve siyah çay ekstralarının EGCG'nin ve teaflavinlerin insan hücre proliferasyonunu baskıladığını saptamışlardır. Siyah çayın da yeşil çay kadar etkili olduğu ve teaflavinlerin bu etkiden sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır [Kundu ve ark., 2005].

1.7.1.3. Antimutajenik Etki

Çin kaynaklı yeşil çayın sulu ekstresi (TWE), çay polifenoller (TP-%80 saflıkta) ve çay kateşinlerinin (EGCG-%93 saflıkta, ECG-%92 saflıkta, EGC-%99 saflıkta, EC-%80 saflıkta) mitomiyozinin indüklediği gen mutasyonuna karşı etkileri in vitro olarak araştırıldığında; TWE, TP ve çay kateşinlerinin kimyasal olarak indüklenmiş kanserin başlangıç fazını indükleyen mitomiyozine karşı belirgin bir inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Çay kateşinleri arasında en etkili olanlar ECG ve EGCG olarak bildirilmiştir [Han, 1997].

Gallik asit, metil gallat, kateşinler, teaflavinler ve tannik asitin sulu çözeltilerinin in vitro olarak mutajen inhibisyon etkileri araştırılmış ve sonuçta; bu bileşiklerin direkt etkili mutajene karşı inhibisyon etkisinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Bunun nedeni olarak da;

fenolik bileşiklerin antimutajenik etkilerinin sitokrom P-450 enzimlerini inhibe ederek göstermesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir [Apostolides ve ark., 1997].

Gupta ve arkadaşları siyah çay infüzyonunun, teaflavin ve tearubigen bileşiklerinin erkek fareler üzerinde *Salmonella*'nın oluşturduğu bakteriyel mutajeniteye karşı etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta siyah çay infüzyonunun %20 konsantrasyonda ve teaflavin ile tearubigenin 100µl konsantrasyonda antimutajenik etkileri olduğu saptanmıştır. Ayrıca, teaflavinlerin tearubigenlere oranla 4-5 kat daha fazla antimutajenik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir [Gupta ve ark., 2002].

Yeşil çaydan izole edilen EC, EGC, ECG, EGCG bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri ve oksidatif DNA hasarına karşı trolox'la bir sinerjizma oluşturup oluşturmadığı araştırıldığında; trolox ile belirgin bir sinerjizma oluşturarak DNA'nın oksidatif hasarına karşı EC>ECG>EGCG> EGC sıralaması ile antioksidan aktivite gösterdikleri saptanmıştır [Wei ve ark., 2006].

1.7.1.4. Antienflamatuvar Etki

Kanser ve enflamasyon arasında yakın bir ilişki olduğu bilinmektedir. Enflamasyonlu hücrelerin, DNA zincirinin kırılması, mutasyon gibi genotoksik etkileri indüklemeye özellikte olduğu belirtilmiştir. Lindolm ve Gelin, kanserli hastalara antienflamatuvar ilaçlar verildiğinde hastalarda daha az ağrı ve yaşam sürelerinde uzama saptandığını bildirmişlerdir [Lindolm & Gelin, 1994].

Sur ve arkadaşları, *Camellia sinensis* bitkisinin köklerinden izole ettikleri TS-1 ve TS-2 saponinlerinin 10 mg/kg dozda, sıçan patilerinde, karragen ile indüklenmiş ödeme karşı belirgin bir antienflamatuvar etki gözlediklerini bildirmişleridir. Ve önceki

çalışmalarda çay bitkisinin kök ekstresinin antitümöral aktivitesinin bu ekstrede bulunan saponinlerin antioksidan ve antienflamatuvar etkilerinden kaynaklanabileceği vurgulanmıştır [Sur ve ark., 2001].

2002 yılında yapılan bir çalışmada farelerin ayaklarında karragenle oluşturulan enflamasyona karşı, hem siyah çay hem de yeşil çayın 2ml/100g vücut ağırığı dozda antienflamatuvar etki gösterdiği ve bu etkinin çay ekstrelerinin gösterdiği antitümöral aktivitenin farklı bir mekanizması olabileceği vurgulanmıştır [Das ve ark., 2002].

Chattopadhyay ve arkadaşları, *C. sinensis* bitkisinin kök ekstresinin 10 mg/ kg dozda, farklı kimyasallar kullanarak akut, subkronik ve kronik enflamasyona karşı etkisini araştırmışlar ve sonuçta; sıçanlarda kök ekstresinin, üç tip enflamasyona karşı da etkili olduğunu saptamışlardır. Dokulardaki ağırlaşmış enflamasyonun kanser gelişiminde rolü olduğunu belirten araştırmacılar antienflamatuvar etkinin antitümöral etkiyle bağdaştırılabileceğinden bahsetmişleridir [Chattopadhyay ve ark., 2004] .

2005 yılında siyah çay infüzyonunun Albino sıçanlarda farklı tip kimyasallarla indüklenmiş enflamasyona karşı etkileri araştırılmıştır. Siyah ay ekstresinin 200 ve 1000mg/kg dozda karregen, histamin prostaglandin ile indüklenmiş enflamasyonu belirgin şekilde inhibe ettiği ve ayrıca sıçanların ayaklarına yerleştirilen pamuk pelletlerinin oluşturduğu granülom oluşumuna karşı da inhibisyon etkisinin bulunduğu bildirilmiştir [Nag Chaudhuri ve ark., 2005].

2006 yılında yapılan bir çalışmada, yeşil çayın NF-kappa B ve AP-1'in aktivasyonunu inhibe ederek, kronik enflamasyon rahatsızlıklarında kilit rol oynayan TFN-alfa'yı (tümör nekroz faktörü) baskıladığı ve böylece kronik enflamasyona karşı koruyucu bir ajan olduğu bildirilmiştir. Bununla ilgili olarak farelerde yapılan çalışmada ise; 4 hafta boyunca yeşil çay ekstresi içirilen farelerde TFN-alfa'nın inhibisyonu gözlenmiştir. EGCG'nin da NF- kappa (nükleer faktör) ve AP-1 yolağını baskıladığı ve bu şekilde antienflamatuvar etki gösterdiği belirtilmiştir [Cheng, 2006].

1.7.2.Kardiyovasküler Hastalıklara Karşı Etkisi

1.7.2.1. Antiateroskleroz Etki

Kardiyovasküler hastalıklar dünyada en çok ölümle sonuçlanan vakalar olarak bilinmektedir. Bunlar arasında ise ateroskleroz en yaygın olanıdır. Aterosklerozun temel nedeni, düşük dansiteli kolesterolün oksidasyonu ve kan damarlarında fazla miktarda kolesterol birikimine neden olan hiperkolesterolemi'dir. Daha ileriki aşamalarda, kandaki lipitlerin oksidasyonu ile ciddi bir tablo oluşur. Yani kardiyovasküler sistemi korumak için, kandaki kolesterol düzeyinin yanında, lipit oksidasyonun da fazla olmaması gerekmektedir. Yeşil çay, siyah çay ve bunların polifenolik bileşiklerinin güçlü antioksidan aktivite gösterdikleri önceki bölümlerde anlatılmıştır. Bu etkiye bağlı olarak lipit oksidasyonunu inhibe ettiği de bilinmektedir. Bu etkinin ateroskleroza karşı koruyucu özellikte olduğu da çok açıktır. Hiperkolesterolemik sıçanlara, 8 hafta boyunca kolesterolce zengin bir diyetin yanında yeşil çay infüzyonu verilmiş ve hayvanların serum ve karaciğer kolesterol düzeyinde belirgin bir azalma gözlemlendiği bildirilmiştir ve etkiden sorumlu olduğu düşünülen EGCG ve ECG'nin bu açıdan

değerlendirilebilecek bir potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır [Yang ve Koo, 1997; Morton ve ark., 2000] .

2000 yılında yapılan bir derlemede; yeşil ve siyah çay ekstraktları eşit antioksidan aktiviteye sahiptir. Fakat teaflavinlerin EGCG'a göre süperoksit radikaliyle reaksiyona girmesinin 10 kat daha hızlı olduğu vurgulanmaktadır. Yeşil çayın ve etkili bileşiklerinin in vitro vazorelaksasyon mekanizmasına sahip olduğu ve EGCG'ın aspirin ile kıyaslanabilecek kadar, kollajenle indüklenmiş platelet agregasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. EC ve gallatları ise sıçanlarda Ca iyonlarının hücre içine akışını inhibe ederek vazorelaksasyon yaptığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca hiperkolesterolemik sıçanlarda yeşil ve siyah çayın kolesterol düzeyini düşürdüğü ve bunu in vitro kolesterolü çöktürerek, in vivo kolesterol absorpsiyonunu azaltarak sağladığını belirtmişlerdir. %3'lük yeşil ve siyah çayın yemeklerine katılarak verildiği sıçanlarda ise lipid peroksidasyonunu eşit ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir. Köpeklerle 10ml/kg dozda siyah çayın intragastrik uygulanmasıyla platelet aktivitenin azaldığı bildirilmiştir. Yeşil çaydan izole edilen polifenollerin 100mg/gün dozda insanlara 4 hafta boyunca verildiğinde, platelet agregasyonun belirgin bir azalma tespit edilmiştir [Vinson, 2000].

Yang ve Koo, hiperkolesterolemik sıçanlara, %2 ve %4 konsantrasyondaki yeşil çay infüzyon uygulamasının, sıçanların serum kolesterol düzeyinde belirgin bir azalma meydana getirdiğini bildirmişleridir. Bu etkinin mekanizmasını incelemek için lipidleri metabolize eden enzim düzeylerini araştırmışlar ve enzim değerlerinde bir değişim gözlemediklerini fakat sıçanların, feçesleriyle safra asitleri ve kolesterol atımının arttığını ve yeşil çayın hipokolesterolemik etkisinin, feçesteki safra asitlerinin ve kolesterol miktarının arttırmasıyla doğrudan ilişkili olduğunu vurgulamışlardır [Yang ve Koo, 2000].

2001 yılında yapılan bir derleme çalışmasında, 4 hafta boyunca günde 4 bardak siyah ve yeşil çay tüketiminin serum kolesterol düzeyinde bir değişiklik yapmadığı bildirilmişken, önceki çalışmalarda günde 5 bardak ve fazlası çay tüketiminin serum kolesterol ve kan basıncını hafif bir şekilde düşürdüğü belirtilmiştir. Yine aynı derleme çalışmasında; yeşil ve siyah çay polifenollerinin 3 g/1 oranında tüketilmesiyle LDL oksidasyonunun azaldığı fakat kolesterol ile beslenmiş dişi tavşanlarda oluşan aortik aterosklerotik lezyonları iyileştirmediği tespit edilmiştir. İnsanlar üzerinde ise aterosklerotik lezyonlar üzerine yapılmış bir çalışma bulunmadığı vurgulanmıştır [Riemersma ve ark., 2001].

Hasegawa ve arkadaşları, yüksek yağ diyeti ile beslenen sıçanlarda günde 130mg yeşil çayın oral uygulanmasıyla lipid metabolizmasına etkilerini araştırmışlar ve sıçanlarda vücut ağırlığının baskılandığını total plazma kolesterol seviyesi azalırken, total karaciğer kolesterol seviyesinde herhangi bir değişiklik gözlemediklerini bildirmişlerdir. Sonuçlara göre; yeşil çayın hipokolesterolemik aktivitesinin karaciğerde kolesterol sentezinin inhibe etmesinden kaynaklanabileceği vurgulanmıştır [Hasegawa ve ark., 2003].

2004 yılında yapılan bir çalışmada ise, yeşil çayın ana kateşini olan EGCG'nin hiperkolesterolemik farelerde oluşan aterosklerotik lezyonlara karşı etkisi araştırılmış ve EGCG'nin 10 mg/kg intraperitoneal enjeksiyonlarından sonra; lokal vasküler dokuda antioksidan kapasite artışı, düz kaslarda hücre proliferasyonunda ve aterosklerotik plak oluşumunda azalma gözlemlendiği bildirilmiştir [Chyu ve ark., 2004].

Sigara içiminin, LDL oksidasyonunu yükselterek ve oksidatif stresi arttırarak koroner hastalıklar ve ateoskleroz için major bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Ayrıca sigara içiminin, platelet agregasyonunun neden olduğu vasküler hasarı tetiklediği bilinmektedir. Platelet aktivasyonunun indüklediği P-selektin, sigara içen bireylerde içmeyenlere nazaran daha yüksektir. 2005 yılında yapılan bir çalışma ile ticari yeşil çayın infüzyonu (hergün total 600ml) sigara içen erkek deneklere verilmiş ve bu deneklerin kontrol grubuna nazaran P-selektin ve okside olmuş LDL plazma konsantrasyon düzeylerinde belirgin bir azalma gözlemlendiği bildirilmiştir [Lee ve ark., 2005].

1.7.2.2. Obeziteye Karşı Etkisi

Vücutta fazla miktarda lipit bulunmasının obeziteyi indüklediği bilinmektedir. Obezite, serum lipit düzeyiyle yakın bir ilişki göstermektedir. Yüksek kan kolesterol seviyesi, damar duvarlarında lipit depolanmasına ve buna bağlı olarak koroner hastalıklar ateroskleroza neden olmaktadır. Buna ek olarak, günümüzde hiperlipidemi ve şeker hastalığı insidansı, obeziteye bağlı olarak artış göstermektedir.

2004 yılında yapılan bir çalışma ile; tip II diabet geliştirilen farelerde 400 mg/kg dozda yeşil çay ekstresinin antihiperglisemik ve antilipidemik etkileri araştırılmıştır. Sonuçta; yeşil çay infüzyonu verilen farelerde kan şekerinin yükselmesi, kilo alımı ve vücuttaki yağ seviyesinin azaldığı bildirilmiştir [Maeda ve ark., 2005].

Chan ve arkadaşları, polikistik over sendromu olan ve obez 34 Çinli kadının (yaş aralığı 25-40) yeşil çay tükettikten sonra biyokimyasal hormonal profillerini ve kilo kaybedip kaybetmediklerini araştırmışlardır. Obez kadınların yeşil çay kapsüllerini oral olarak içmelerinden 3 ay sonra yapılan testlerde, lipit ve glukoz metabolizmalarında bir değişiklik meydana gelmediğini ve belirgin bir kilo kaybı gözlemediklerini bildirmişleridir [Chan ve ark., 2005].

Diepvens ve arkadaşları; 46 kilo fazlası olan, sağlıklı kadın denekler (yaş aralığı 19-57) üzerinde yeşil çayın metabolik ve kilo verdiren etkilerini araştırmışlar ve sonuçta, düşük enerji diyeti ile besledikleri bireylere her öğünden sonra yeşil çay ekstresini içeren kapsül oral olarak uygulanmıştır. Deneklerin kan parametrelerinde hiçbir değişiklik gözlenmediğini fakat hafif bir kilo kaybı meydana geldiğini ve bu kilo kaybına bağlı olarak kolesterol düzeyinde ve kan basıncında bir düzelme kaydettiklerini bildirmişlerdir [Diepvens ve ark., 2006].

1.7.3.Antimikrobiyal Etki

1.7.3.1. Antibakteriyel Etki

1995 yılında yapılan bir derleme çalışmasına göre; siyah ve yeşil çay ekstrelerinin *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteria*, *Vibrio cholerae*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili olduğu ve ayrıca yine her iki çay ekstresinin stafilokokal aflatoksinin hemolitik aktivitelerini inhibe ettiklerini açıklamışlardır [Hamilton-Miller, 1995].

Yam ve arkadaşları; yeşil çay ve siyah çay infüzyonlarının *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia enterocolitica* bakterilerine karşı belirgin bir antibakteriyel etki gösterdiklerini ve gallokateşin ve bunların gallatlarının bu etkiden sorumlu olduğunu, epi- formlarının ise çok daha etkili bulunduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak, siyah çayda teaflavin ve gallatlarının bu etkiye sahip olduğunu tespit ettiklerini bildirmişleridir [Yam ve ark., 1997].

2000 yılında yapılan bir çalışmada, *Escherichia coli* K12 suşuna karşı yeşil çay polifenollerinin antibakteriyel etkisinin çok düşük olarak gözlemlendiği bildirilmiştir [Amarowicz, ve ark., 2000].

2001 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise; yeşil çay ekstraktlarının çiftlik hayvanlarından izole edilen patojen bakterilerin büyümelerine karşı ve buzağuların intestinal florasına etkileri araştırılmıştır. Sonuçta yeşil çay ekstraktlarının, *Staphylococcus* türleri, *Streptococcus* türleri, *Escherichia coli*, *Salmonella* türleri ve *Corynebacterium suis*'e karşı antibakterial aktivite gösterdikleri ve bu etkilerin galloil grubu taşıyan polifenoliklerde daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, yeşil çay ekstresi verilen buzağuların intestinal florasında *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türlerinin azalma oranı yavaşlarken *Corynebacterium perfirens*'in azalmasının hızlandığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, total bakteri sayısının azalma oranında ve diğer bakteri miktarlarında değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Buzağılarda, taşınma ve büyüme koşulları gibi pek çok stres faktörüne bağlı olarak patojenik olmayan diyareye rastlandığı ve yeşil çay ekstresinin bu tip bir diyareye karşı koruyucu etkisinin olduğu tespit edilmiştir [Ishira ve ark., 2001].

%1'lik siyah çay ekstresinin albino sıçanlarda 2 saat içinde diyareyi inhibe ettiği bildirilmiştir. Kimyasal içeriğinin çok zengin olduğu bilinen siyah çayın bu etkisinden sorumlu bileşik grubunun daha sonraki araştırmalarda aydınlatılmaya çalışılacağı belirtilmiştir [Besra ve ark., 2003].

Taguri ve arkadaşları, EGCG, EGC ve taflavinlerinlerin *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Vibrio* tipi gıda bakterilerine karşı antibakteriyel etkilerini araştırmışlar ve teaflavinlerin bu bakterilere karşı orta derecede antibakteriyel aktivite gösterirken, EGC ve EGCG'ın kuvvetli aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir [Taguri ve ark., 2004].

2004 yılında yapılan bir aktivite çalışmasında ise *S. mutans* bakterisinin cam yüzeyinde tutunmasını inhibe eden bitkisel ekstreler in vitro olarak araştırılmış ve sonuçta siyah çayın %0.3 konsantrasyonda dahi güçlü bir inhibisyon etki gösterdiği bildirilmiştir [Limsong ve ark., 2004].

Dokulardaki bazı enzim veya bakterilerin proteinleri parçalamasına bağlı olarak metil merkaptan gibi kötü kokulu bileşiklerin açığa çıktığı bilinmektedir. Yeşil ay polifenollerinin, bu kötü kokulu bileşiklerin (amonyak, amin) kokusunu baskılama özelliği olduğu yapılan GC/MS çalışmalarıyla gösterilmiştir. Kateşinlerin taşıdıkları hidroksil gruplarının tiol ve amino grupları ile reaksiyona girerek bu bileşiklerin miktarını azalttığı bildirilmiştir. Kateşinlerin etilamin yzerine gösterdikleri deodorize etki sıralaması EGCG>gallik asit>EGC>ECG>etil gallat> kateşin=EC olarak tespit edilmiştir [Yamamoto ve ark, 1997; Kida ve ark., 2002] .

2006 yılında yapılan bir çalışma ile, yeşil çay ekstraktının gıda patojenlerinden *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* DT104, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* ile diyare nedenlerinden biri olan *Bacillus cereus* patojenine karşı güçlü antibakteriyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Yeşil ay ekstraktının

içerdiği polifenollerden en etkili aktivite gösterenler, ECG ve EGCG olarak tespit edilmiştir. EGCG'nin özellikle *S. aureus*'a karşı çok belirgin bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu aynı çalışmada belirtilmiştir. Bu çalışmada yeşil çayın polifenolik kompozisyonu ile antibakterial etkisi arasında direkt bir ilişki olduğu saptanmıştır [Si ve ark., 2006].

Diş çürükleri, ağız mikroflorasının neden olduğu ağız boşluğunda oluşan enfeksiyonel hastalıklardır. *Streptococcus mutants* bakterisi yiyecek ve içeceklerde bulunan sukrozdan suda çözünmeyen glukanoları sentezleyerek diş çürüklerinde kilit bir rol oynamaktadır. Ve diş plakları olarak adlandırılan bu glukanolarda mikroorganizmalar gelişip çürüklere neden olmaktadır. Yeşil çay polifenollerinin özellikle *S. mutants* ve diğer bakterilere karşı kuvvetli antibakteriyel aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır. Ve ayrıca bu polifenollerin –özellikle ECG ve EGCG- bakteriyel bir enzim olan glukozil tranferaz enzimini inhibe edip, bakterilerin glukanol sentezlemesini bloke ederek ve bunlara tutunmalarını azaltarak, diş çürüklerine karşı koruyucu etki oluşturduğu belirtilmiştir. Yeşil çayın diş çürüklerine karşı etkisinin içerdiği florürden değil kateşinlerinden kaynaklandığı belirtilmiştir [Yamamoto ve ark., 1997; Moynihan, 2000; Koo ve Cho, 2004].

1.7.3.2. Antiviral Etki

Siyah çay ekstresinin Influenza virüsüne karşı 0,1µl/ml konsantrasyonda etkili bulunduğu ve yeşil çay polifenollerinin bu virüse karşı gösterdikleri etki sıralaması ise GCG, EGCG (4µM)>CG ECG (64µM)>GC, EGC (256µM)>C,EC (8192µM) olarak tespit edilmiştir [Tao, 2002].

Major çay kateşini olarak ta bilinen EGCG'nın HIV-1 virüsüne karşı etkisi araştırılmış ve sonuçta; bu bileşiğin 1µM'dan büyük konsantrasyonlarda virüs partiküllerini yok edici, vücuda girdikten sonraki post-adsorbisyonu ve reverse transkripsiyonunu (RT) inhibe edici etkilerine bağlı olarak antiviral bileşikler sınıfına girebileceği düşünülmüş ve ayrıca 10µm'dan daha yüksek konsantrasyonda proteaz kinetiklerini baskıldığı bildirilmiştir [Yamaguchi, ve ark., 2002].

Yapılan çalışmalara göre siyah çay ve yeşil çayın HIV-1 virüsüne karşı etkili olduğu ve etkiden sorumlu bileşikler olarak da yeşil çay kateşinleri- özellikle EGCG- ve siyah çay teaflavinleri gösterilmiştir. Teaflavinlerin kateşinlere nazaran daha güçlü anti HIV-1 aktivitesi olduğu da belirtilmiştir [Nance ve Shearer, 2003; Liu ve ark., 2006].

1.7.4. Diğer Etkileri

1.7.4.1. Tetanoz Toksinine Karşı Etki

Siyah çaydan izole edilen tearubigen fraksiyonu tetanoz toksini (4µg/ml) ile birlikte karıştırılarak 800µg/10ml dozda sıçanlara verildiğinde invivo olarak tetanoz toksininin etkilerini bloke ettiği bildirilmiştir. 2µg/ml tetanoz toksini ile 8 mg tearubigen fraksiyonun karıştırılarak uygulanması ise, toksinin paralitik etkisine karşı koruyucu bir özellik göstermiştir. Tearubigenlerin yapıları bilinmediğinden, bu toksini inaktive eden bir bileşiğin bulunduğu fakat yapısı ve mekanizması hakkında çalışmaların yapılması gerekliliği vurgulanmıştır [Satoh ve ark., 2001].

1.7.4.2. Alzheimer'a Karşı Etki

Alzheimer hastalığının, 65 yaş civarı bireylerde sıklıkla görülen demansın en yaygın görülen formu olduğu bildirilmiştir. Alzheimer'da görülen en belirgin semptomlar, algılama disfonksiyonu ve hafıza kaybıdır. Bunlara, hastalığın ileri safhasında konuşma bozukluğu depresyon, ajitasyon gibi davranış bozukluğu ve kavrama yeteneğinde kayıp eşlik etmektedir. Hafıza kaybına neden olan nöropatolojik oluşumun nedeninin, Alzheimer'ın ciddiyetini belirleyen kolinerjik eksiklik olduğu vurgulanmaktadır. Bu nedenle Alzheimer'a karşı geliştirilen hedef ilaçlarda; nöronal sinaptik bölümde asetilkolin varlığını uzatmak ve kolinerjik reseptörlerin uyarımını sağlamaktır [Howes ve ark., 2003].

Okello ve arkadaşları, yeşil çay ve siyah çayın demansın tedavisiyle bağlantılı anti- β -sekretaz ve antikolinesteraz etkilerini araştırmışlar ve 0,03 mg/ml yeşil çayın ve 0,06 mg/ml siyah çayın invitro asetilkolinesteraz ve bütilesterazı inhibe ettiğini ve yine yeşil çayın 0,03 mg/ml dozda β -sekretazı bloke ettiğini tespit etmişlerdir. Bu sonuca göre, *C. sinensis* bitkisinin Alzheimer ve hafıza kaybına neden olan diğer hastalıklarda kullanılabilecek bir potansiyel olduğu, ancak çay infüzyonlarının serebral kolinerjik sisteme ve β -sekretaza olan etkilerinin bu enzimlerin beyindeki düzeylerine (hastalığın ciddiyetine), çayın kimyasal içeriğine, infüzyon konsantrasyonuna ve doza bağlı olduğunu ve üzerinde araştırma yapılması gerektiğini vurgulamışlardır [Okello ve ark., 2004] .

Yeşil ve siyah çayın Alzheimer hastalığına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu in vitro ve hayvan çalışmalarında tespit edilmiş olsa da araştırmacılara göre bu etkinin, pek çok parametreye bağlı olduğu bildirilmiştir. Bunlar; kateşinlerin biyoyararlanımı, bu bileşiklerin beyne ne şekilde ulaştığı, çayın içeriği, hazırlanma şekli ve konsantrasyonudur. Ayrıca, beslenme ile nörodejeneratif rahatsızlıklar arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Çayın ve diğer pek çok içeceğin bileşiminde bulunan kafeinin de sinir sistemini stimüle etme ve adenosin reseptörlerini bloke etme özelliğinden dolayı Alzheimer'a karşı etkili olan bileşikler arasında olduğu düşünülmektedir [Williamson, 2005].

1.7.4.3. Parkinson'a Karşı Etki

Parkinson hastalığı, titreme, vücutta esneklik kaybı, duruş bozukluğu ile karakterize olan yetişkin ve yaşlılarda görülen nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu hastalık dopaminerjik reseptörlerin kaybına bağlı dopamin eksikliğinin neden olduğu bir patolojik durumdur. Yeşil çay polifenollerinin Parkinson'a karşı terapötik etki mekanizmalarının aşağıdaki şekilde olduğu düşünülmektedir;

- Polifenollerin antioksidan etkilerine bağlı olarak bu hastalığın tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Serbest radikal ve bunların oluşturduğu toksinlerin Parkinson hastalığının ortaya çıkmasında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Yeşil çaydaki kateşin miktarının, siyah çaya oranla daha fazla olduğu bilindiğinden; yeşil çayın Parkinson hastalığının tedavisinde daha etkili olabileceği görüşü yaygındır.
- Yeşil çay polifenollerinin DAT'a (dopamin transporter) bağlı nörotoksin alımını inhibe etme özelliğine bağlı olarak, bu hastalığın tedavisi için kullanılabilecek bir potansiyel olduğu belirtilmektedir. Yeşil çay polifenollerinin dopaminerjik nöron yaralanmasına karşı nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiş olsa da benzer inhibisyon etkiyi insanlarda gösterip göstermeyeceği hala bilinmemektedir.
- Yeşil çay kateşinlerinin, Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan levodopa biyoyararlanımını ve sinaptik dopamin konsantrasyonunu arttırarak bu ilaçın etkisini güçlendirdiğı belirtilmektedir.

Hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, EGCG'nin 25 mg/kg dozda, dopaminerjik nöronların kaybını önlediği ve dopamin miktarındaki azalmayı durdurduğu bildirilmiştir.

Çay polifenollerinin, bu biyolojik aktivitelere sahip olmasından dolayı, Parkinson hastalığına karşı koruyucu ve tedavi edici etkisinin bulunabileceği, ama daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu vurgulanmaktadır [Pan ve ark., 2003; Zaveri, 2006].

1.8. Yeşil ve Siyah Çayın Toksisitesi

Çayın, genelde güvenilir, toksik olmayan ve tüketiminde bir yan etki beklenmeyen içecekler arasında olduğu düşünülse de bir bardak yeşil çayın yaklaşık 10-15 mg kafein içerdiği ve aşırı içilmesine bağlı olarak iritasyon, uykusuzluk, sinirlilik ve taşikardi yapabildiği bildirilmiştir.

Teratojenik etki çalışmaları olmadığından, hamilelik sırasında kafein tüketimi yapılmaması önerilmektedir. Ayrıca emziren kadınlarda, bebeğin uyku problemi yaşamaması için sınırlı sayıda kahve veya çay tüketilmesi tavsiye edilmektedir. Kansere karşı koruyucu etkilerinin olduğu bilinen bu içeceğin, bu etkiyi sağlayabilmesi için fazla miktarda tüketilmesi gerekliliği üzerinde durulsa da son yıllarda yapılan çalışmalar, çay tüketiminin dikkatle yapılması gerektiğini göstermektedir [Thorne Research, 2000] .

Son yıllara kadar bu ticari ürünlerin üzerinde toksisite çalışması bulunmamaktadır.

1999 yılında yapılan bir çalışmada, siyah ve yeşil çay %1, %10 ve %20 konsantrasyonda farelere rektal yolla verilmiş ve çay ekstrelerinin, farelerde indükledikleri konvülzan etkileri akut (30 dakika) ve kronik (2 hafta) olarak incelenmiştir. Sonuçta; her iki çay ekstresinin de %10 ve %20 konsantrasyonda deney hayvanlarında konvülzan ajanların oluşturdukları etkileri arttırdıkları ve bu etkiye bağlı olarak sıçanlarda ölüm oranında bir artış meydana getirdiği bildirilmiştir [Gomes ve ark., 1999].

2006 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise, gallik asit artığı içeren fenolik asitler ve kateşinlerin, izole edilen sıçan karaciğer hücreleri üzerine sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bu bileşiklerin sitotoksik etki sıralaması EGCG >propil gallat >ECG >gallik asit= EGC>EC olarak tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin sitotoksik mekanizmaları, mitokondriyal membran yıkımı ve ROS oluşumu olarak bildirilmiştir. Gallik asit artığı içeren çay polifenollerinin içermeyenlere nazaran çok daha toksik olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca çay fenolikleri, farelere i.p. olarak uygulandığında farelerde karaciğer harabiyetine neden olduğu belirtilmiştir [Galati ve ark., 2006].

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada kullanılan bitkisel materyaller, *Camellia sinensis* (L.)O.Kuntze bitkisinin ikibuçuk yaprağı ile bu yapraklardan hareketle ticari ürün haline getirilmek üzere gerekli işlemlerden geçirilmiş olan yeşil çay ve siyah çaydır. Bu örnekler, Rize’de bulunan ve ÇAY-KUR bünyesinde hizmet veren Taşlıdere fabrikasından 2004 yılında temin edilmiştir.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Mekanik karıştırıcı	:Gallenkamp Handilab Minor
Hassas terazi	: Scaltec Instruments SBC22 15909133
Derin dondurucu	:SANYO-MDF-U5186S
HPLC Cihazı	:SSI Allience Esence HPLC Workstation System
Dedektör	: SSI Lab Allience Esence UV-Vis
GC/MS Cihazı	: GC-17A Shimadzu/MSQP 5000
Rotavapor	: Buchi Rotavapor R 200
Liyofilizatör	: Christ-Gamma 2-16 LSC
SPME holder	: Supelco manual holder
SPME fibre	: Supelco- PDMS (100µm)

2.3. Yöntem

2.3.1. Antioksidan Aktivite

2.3.1.1. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılacak Ekstrelerinin Hazırlanması

C. sinensis bitkisinin yaprakları ile bu yapraklardan hazırlanan ticari ürünlerden yeşil ve siyah çay numunelerinin su, etanol, metanol kloroform, etilasetat, hekzan ile ekstreleri hazırlandı [Wiseman ve ark., 1996]. Bunun için;

1g yeşil çay, 100 ml etanol ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = YE ekstre

1g yeşil çay, 100 ml metanol ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = YM ekstre

1g yeşil çay, 100 ml kloroform ile 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = YK ekstre

1g yeşil çay, 100 ml etilasetat ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = YEt ekstre

1g yeşil çay, 100 ml hekzan ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = YH ekstre

5g yeşil çay üzerine 500 ml kaynar su ilave edildi ve 5 dakika 100°C'de ısıtılıp, infüzyonu hazırlandı = YS ekstre

1g siyah çay, 100 ml etanol ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = SE ekstre

1g siyah çay, 100 ml metanol ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = SM ekstresi

1g siyah çay, 100 ml etilasetat ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = SEt ekstresi

1g siyah çay, 100 ml kloroform ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = SK ekstresi

1g siyah çay, 100 ml hekzan ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = SH ekstresi

5g siyah çay üzerine 500 ml kaynar su ilave edildi ve 5 dakika 100°C'de ısıtılıp, infüzyonu hazırlandı = SS ekstresi

1g işlem görmemiş çay yaprakları, 100 ml etanol ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = DE ekstresi

1g işlem görmemiş çay yaprakları, 100 ml metanol ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = DM ekstresi

1g işlem görmemiş çay yaprakları, 100 ml kloroform ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = DK ekstresi

1g işlem görmemiş çay yaprakları, 100 ml etilasetat ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = DEt ekstresi

1g işlem görmemiş çay yaprakları, 100 ml kloroform ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = DK ekstresi

1g işlem görmemiş çay yaprakları, 100 ml hekzan ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca devamlı karıştırılarak ekstre edildi ve süzüldü = DH ekstresi

5g işlem görmemiş çay yaprakları üzerine 500 ml kaynar su ilave edildi ve 5 dakika 100°C'de ısıtılıp, infüzyonu hazırlandı = SS ekstresi

2.3.1.2. Antioksidan Aktivite Tayini

2.3.1.2.1. DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) Testi

0.004 g DPPH tartılıp, 5 ml metanolde çözüldükten sonra balonjojede 100ml'ye tamamlandı. Bu standart çözeltinin A_0 değeri UV-spektrofotometresinde 517 nm'de ölçülüp kaydedildi. 2950 µl DPPH standart çözeltisi ve 50 µl 'lik ekstreler aynı ortamda iyice karıştırılıp 20 dakika boyunca karanlıkta bekletilerek reaksiyona girmesi sağlandı. Bu sürenin sonunda her bir ekstre ve DPPH standart çözeltisini içeren tüplerdeki karışım için 517 nm'de ölçüm yapıldı ve elde edilen absorbans değerleri kaydedildi. Böylece ekstrelerin içeriğinin DPPH· radikali ile reaksiyona girerek, radikalın oluşturduğu mavi rengin şiddetindeki azalmaya bağlı olarak elde edilen IC_{50} değerleri, Troloks standart çözeltisinden elde edilen veriler ile karşılaştırıldı.

- 0,5 mg/ml konsantrasyondaki Troloks stok çözeltisinden hareketle hazırlanan 0,0166, 0,00833 ve 0,00416 mg /ml dilüsyonları kullanılarak Troloks'un IC_{50} değerleri hesaplandı.
- Her bir ekstrenin 0.166 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisinden hareketle, 0,0833, 0,04166 mg/ml dilüsyonları

hazırlandı, absorbans değerleri okunduktan sonra % inhibisyonları hesaplandı.

- 0,04166 mg/ml konsantrasyonda dahi çok yoğun etki gözlediğimiz örneklerin daha düşük konsantrasyonları kullanılarak absorbans ölçümlerini yapmak için 0,00833, 0,004166 ve 0,00166 mg/ml dilüsyonları hazırlandı ve örneklerin % inhibisyonları hesaplandı.

$$\% \text{ Inhibisyon: } [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$$

A₀: Standart çözeltinin başlangıç absorbansı

A_t: Standart ve numune çözeltisinin 20 dakika sonra ölçülen absorbansı

formülü kullanılarak çalışılan örneklerin % inhibisyonları bulunduğundan sonra, konsantrasyona karşı % inhibisyon grafiğinden IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir.

2.3.1.2.2. ABTS(2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) Testi

Bu test, ortamda H₂O₂ ve metmyoglobin varlığında ABTS bileşiğinden ABTS^{•+} radikal katyonunun oluşturulması ve ortama radikal süpürücü etkisi olan bileşiklerin ilave edilmesiyle oluşturulan ABTS^{•+} radikalinin açığa çıkmasının, konsantrasyona bağlı olarak geciktirilmesi esasına dayanır. Bunun için; 200 µmol/L ABTS bileşiği ve 4,5 µmol/L myoglobin içeren fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) ve ayrıca, 300 µmol/L H₂O₂ çözeltisi hazırlandı. ABTS ve myoglobin içeren fosfat tampon çözeltisi ve H₂O₂ çözeltisinin karışımının absorbans değerleri UV-spektrofotometresinde 734 nm'de 3 dakika boyunca 30 saniyede bir ölçülüp elde edilen absorbans değişimi kaydedildi (A₁₈₀-A₀). Böylece ekstrelerin içeriği, oluşan ABTS[•] radikali

için elde edilen IC₅₀ değerleri, Troloks standart çözeltisinden elde edilen veriler ile karşılaştırıldı.

- 0,5 mg/ml konsantrasyondaki Troloks stok çözeltisinden hareketle hazırlanan 0,0166, 0,00833 ve 0,00416 mg /ml dilüsyonları kullanılarak Troloks'un IC₅₀ değerleri hesaplandı.
- Her bir ekstrenin 0.166 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisinden hareketle, 0,0833, 0,04166 mg/ml dilüsyonları hazırlandı, absorbans değerleri okunduktan sonra % inhibisyonları hesaplandı.
- 0,04166 mg/ml konsantrasyonda dahi çok yoğun etki gözlediğimiz örneklerin daha düşük konsantrasyonları kullanılarak absorbans ölçümlerini yapmak için 0,00833, 0,004166 ve 0,00166 mg/ml dilüsyonları hazırlandı ve örneklerin % inhibisyonları hesaplandı.

$$\% \text{ Inhibisyon: } [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$$

A₀: Standart çözeltinin başlangıç absorbansı

A_t: Standart ve numune çözeltisinin 3 dakika sonra ölçülen absorbansı.

formülü kullanılarak çalışılan örneklerin % inhibisyonları bulunduğundan sonra, konsantrasyona karşı % inhibisyon grafiğinden IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir.

2.3.2. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Aktivite tayininde kullanılan referans mikroorganizmalar

- **Antibakteriyel aktivite için;**

Gram pozitif bakteriler

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Bacillus subtilis ATCC 6633

Gram negatif bakteriler ,

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

- **Antifungal aktivite için;**

Candida albicans ATCC 10231

C. parapsilosis ATCC 90018

2.3.2.1. Disk Agar Difüzyon Yöntemi

Whatman kağıdından hazırlanmış 6 mm çapındaki diskler otoklavda steril edildi ve kurutuldu. 12,5 mg /ml bitki ekstresi içeren, uygun çözücüleri ile hazırlanmış örnekler, her bir diske 10 µl emdirildi (125 µg/disk) ve diskler 37°C'de 4-5 saat kurutuldu. Ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan çözücüler (Etanol, metanol, etilasetat, hekzan ve kloroform) aynı oranda (125 µg) disklerle emdirilerek kontrol olarak kullanıldı.

Bakteriler Mueller-Hinton Agar'da (MHA), mayalar ise Sabouraud Dextrose Agar'da (SDA) kültüre alındı. Burada üreyen bakteri kolonilerinden 2-3 koloni Mueller-Hinton Broth'a (MHB), maya kolonileri Sabouraud liquid besiyerine (SLB) pasajlanarak 36°C'de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürlerin bulanıklığı steril serum fizyolojik ile Mc Farland 0,5 standardına göre ayarlandı. Buradan final konsantrasyon bakteriler için 5×10^6 cfu /ml, mayalar için $2,5-3 \times 10^5$ cfu /ml olacak şekilde ayarlandı. 100µl bakteri kültürlerinden MHA plak yüzeyine, 100µl maya kültürlerinden SDA plak yüzeyine koyuldu ve steril eküvyon yardımı ile tüm yüzeye yayıldı. Mikroorganizma yayılmış besiyeri üzerine bitki ekstraları emdirilmiş diskler yerleştirildi. Ampisilin, ofloksasin, flukanozol (10 µg) içeren diskler pozitif kontrol olarak kullanıldı. Plaklar 1 saat laminar flow kabinde, oda sıcaklığında bekletildi. Tüm plaklar 36 °C'de bakteriler için 24 saat, mayalar için 48 saat inkübe edildi. Duyarlılık durumları National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 'e göre değerlendirildi [NCCLS, 1998]. İnkübasyon sonunda disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları ölçülerek bitki ekstralarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri değerlendirildi. Deneyler üç kez yapılarak ortalamaları alındı.

2.3.2.2. Agar-well Difüzyon Yöntemi

Bitki ekstralarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri agar- well difüzyon yöntemi ile araştırıldı [Perez ve ark., 1990]. Bakteriler için MHA, mayalar için SDA hazırlandı. Sıvı besiyerlerinde (MHB; SLB) hazırlanan standard bakteri (5×10^6 cfu/ml) ve maya kültürleri ($2,5-3 \times 10^5$ cfu/ml) uygun besiyerleri yüzeyine steril eküvyon ile yayıldı. Agar yüzeyine steril silindirler yerleştirildi. Silindirler içine stok konsantrasyonu 12,5 mg/ml olan ekstraksiyon solusyonlarından 50 µl koyuldu (625 µg /kuyucuk). Dimetil sülfoksit (DMSO) negatif kontrol olarak, ampisilin, ofloksasin, flukanozol pozitif kontrol olarak

kullanıldı. Ekstrelerin ve kontrollerin diffüze olmaları için plaklar 1 saat laminar-flowda oda sıcaklığında bekletildikten sonra 36 °C'de inkübe edildiler. Bakteri inoküle edilen plaklar 24 saat, maya inoküle edilen plaklar 48 saat sonra değerlendirildi. İnhibisyon zon çapının büyüklüğü ölçülerek antibakteriyel ve antifungal aktivite değerlendirildi. İnhibisyon zon çapı olmaması aktivite olmadığı şeklinde yorumlandı. Deneyler üç kez yapıldı ve ortalamalar alındı.

2.3.2.3. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC)

Bitkilerin etanol, metanol, etilasetat, hekzan, kloroformlu ekstreleri ile sulu ekstrelerinin iki Gram pozitif, iki Gram negatif bakteri ve iki maya türüne karşı MIC değerleri broth mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı [NCCLS, 1996; NCCLS, 2002]. Ofloksasin ve ampisilin standart antibakteriyel ajanlar olarak, flukonazol ise standard antifungal ajan olarak kullanıldı. Ofloksasin ve flukonazol steril distile suda, ampisilin pH'sı 8 olan fosfat tampon çözeltisinde hazırlandı. Bitki ekstrelerinin stok konsantrasyonu 2048 µg/ml'ye ayarlandı, dilüsyonlar sonucu bitki ekstrelerinin 1024,512, 256,128, 64, 32, 16, 8, 4 ve 2 µg/ml konsantrasyonları sağlandı. Standart ajanlar 64- 0,125 µg/ml konsantrasyonlarda kullanıldı. Bakterilerin final konsantrasyonu MHB'da 5×10^5 cfu/ml, mayaların final konsantrasyonu pH 'ı 7 olan, 3-[N-morpholino]-propansülfonik asid (MOPS) ile tamponlanmış, L-glutaminli RPMI-1640 ile $2,5 \times 10^3$ cfu/ml konsantrasyona ayarlandı. Mikropleytler 36 °C'de bakteriler için 24 saat, mayalar için 48 saat nemli ortamda inkübe edildiler. İnkübasyon sonunda pozitif kontrole göre bulanıklığın olmadığı kuyucuklar ekstraktların mikroorganizmaları inhibe ettiği minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) olarak kaydedildi.

2.3.3. Ekstrelerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analizi

Bu çalışmada hedeflenen, kuvvetli antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gözlediğimiz ekstrelerin HPLC analizlerinin yapılması olduğundan; YE, YM, YS, SE, SM, SS, DE, DM ve DS ekstrelerinin analizleri yapılarak kimyasal profilleri çıkarıldı. Çalışma sırasında kullanılan HPLC koşulları aşağıda belirtilmiştir.

HPLC Analiz Koşulları

Cihaz	:SSI Alliance Esence HPLC Workstation System
Kolon	:Shimpack CLC-ODS (M) (25 cm×0.45µm)
Pompa	:SSI Alliance Esence Series 4 LC pump
Dedektör	:SSI Lab Alliance Esence UV-Vis
Mobil faz	: Asetonitril (Çözücü A) %0,1 fosforik asit içeren su (Çözücü B)
Dalga boyu	: 270 nm
Akış hızı	: 1 ml/dak.
Numune miktarı	: 25µl

Çizelge 4: Gradient yönteme göre mobil faz değişimi

Zaman (dakika)	Akış(ml/dak)	% Solvan A	% Solvan B
0	1	8	92
5	1	8	92
40	1	11	89
62	1	18	82
80	1	23	77

Analizlerde mobil fazı hazırlamak için, HPLC saflığında asetonitril ve bidistile su (18Ω ohm) çözücüler kullanıldı. Bu çözücüler kullanılmadan önce Millipore süzme sisteminde süzülerek, Ultrasonik banyoda degaze edildi. Ekstreler de $0,45\mu\text{m}$ membran filtreden geçirildikten sonra HPLC cihazına enjekte edildi.

2.3.3.1. Gallik Asite Ait Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi ve Doğru Denkleminin Hesaplanması

Ekstrelerde bulunan gallik asidin miktar tayini, doğrusal kalibrasyon grafiği çizilerek yapıldı. Hassas olarak tartılan gallik asitten 2 mg/ml stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden hareketle 0,05-500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığında gallik asit çözeltileri hazırlanıp, 25 μl 'lik 3 enjeksiyon yapılarak pik alanları ölçüldü. Kalibrasyon grafiği 0,05-25 $\mu\text{g/ml}$ aralığında olacak şekilde en doğrusal bölgede gallik asit konsantrasyonu X, pik alanları Y eksenine konarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Böylece, gallik asit için $y = mx+n$ doğru denklemi ve R^2 değeri bulundu. Doğru denkleminden yararlanılarak gallik asidin YE, YM, YS, SE, SM, SS, DE, DM ve DS ekstrelerindeki miktarları hesaplandı.

2.3.3.2. Kateşine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi ve Doğru Denkleminin Hesaplanması

Ekstrelerde bulunan kateşin miktar tayini, doğrusal kalibrasyon grafiği çizilerek yapıldı. Hassas olarak tartılan kateşinden 2 mg/ml stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden hareketle 0,05-500µg/ml konsantrasyon aralığında kateşin çözeltileri hazırlanıp, 25µl'lik 3 enjeksiyon yapılarak pik alanları ölçüldü. Kalibrasyon grafiği 0,05-50 µg/ml aralığında olacak şekilde en doğrusal bölgede kateşin konsantrasyonu X, pik alanları Y eksenine konarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Böylece, kateşin için $y = mx+n$ doğru denklemi ve R^2 değeri bulundu. Doğru denklemden yararlanılarak kateşinin YE, YM, YS, SE, SM, SS, DE, DM ve DS ekstrelerindeki miktarları hesaplandı.

2.3.3.3. Epigallokateşin gallata Ait Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi ve Doğru Denkleminin Hesaplanması

Ekstrelerde bulunan EGCG miktar tayini, doğrusal kalibrasyon grafiği çizilerek yapıldı. Hassas olarak tartılan EGCG'tan 2 mg/ml stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden hareketle 0,01-500µg/ml konsantrasyon aralığında EGCG çözeltileri hazırlanıp, 25µl'lik 3 enjeksiyon yapılarak pik alanları ölçüldü. Kalibrasyon grafiği 0,01-500 µg/ml aralığında olacak şekilde en doğrusal bölgede EGCG konsantrasyonu X, pik alanları Y eksenine konarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Böylece, EGCG için $y = mx+n$ doğru denklemi ve R^2 değeri bulundu. Doğru denklemden yararlanılarak EGCG'ın YE, YM, YS, SE, SM, SS, DE, DM ve DS ekstrelerindeki miktarları hesaplandı.

2.3.4. C. sinensis Yaprakları ile Yeşil ve Siyah Çayın Uçucu Bileşiklerinin Analizi

Solid faz mikroekstraksiyon yöntemi (SPME) kullanılarak her üç örneğin ayrı ayrı uçucu bileşikleri kalitatif ve kantitatif olarak tespit edildi. Bunun için; ilk önce 200 mg tartılarak vialde konulan örnekler ağzı parafilm ile kapatılarak 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek ve oda sıcaklığında bekletilmeden 70°C’de ekstraksiyon yapıldı. Bir diğer deneme çalışmasında örnekler vialde 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek ve bekletilmeden 80°C’de ekstraksiyon yapıldı. Pik ayırımlarının en iyi ve verimli olduğu tespit edilen ve aşağıda ayrıntılı olarak açıklanan yöntemle analizlere devam edilmesi kararlaştırıldı.

- *C. sinensis* bitki yaprakları 200 mg tartılarak 20ml’lik vialde kondu ve vialin ağzı parafilmle kapatılarak, 70°C’de 30 dakika boyunca polidimetil siloksan (100µm film kalınlığında) fiberi kullanılarak yaprakların uçucu bileşiklerinin ekstraksiyonu yapıldı.
- Yeşil çay örneği 200 mg tartılarak 20ml’lik vialde kondu ve vialin ağzı parafilmle kapatılarak, 70°C’de 30 dakika boyunca polidimetil siloksan (100µm film kalınlığında) fiberi kullanılarak yeşil çayın uçucu bileşiklerinin ekstraksiyonu yapıldı.
- Siyah çay örneği 200 mg tartılarak 20ml’lik vialde kondu ve vialin ağzı parafilmle kapatılarak, 70°C’de 30 dakika boyunca polidimetil siloksan (100µm film kalınlığında) fiberi kullanılarak siyah çayın uçucu bileşiklerinin ekstraksiyonu yapıldı.

Ekstraksiyon tamamlanır tamamlanmaz, uçucu bileşikleri adsorblamış olan fiber, GC/MS'in enjektör kısmına yerleştirilerek 3 dakika beklendi ve uçucu bileşikler belirtilen koşullarda ve kapiler kolonda sıcaklık programlaması yapılarak analiz edildi ve ayrılan maddelerin kütle spektrumları alındı.

GC/MS Analiz Koşulları

Cihaz	:ShimadzuGC-17A/QP5000 GCMS
Kolon	:Supelcowax-10 (30m×0,32mm, 0.25 µm film kalınlığı)
Kolon sıcaklığı	:40°C(2dak),40°C-220°C (2°C/dak), 220°C (30dak)
Enjektör ve Dedektör sıcaklığı	:200°C ve 250°C
He akış hızı	:1,8 ml
Split oranı	:Splitless
İyonizasyon voltajı	:70eV

3. BULGULAR

3.1. Antioksidan Aktivite Tayini

C. sinensis bitkisinin yaprakları ile bu yapraklardan hazırlanan ticari ürünlerden yeşil ve siyah çay örneklerinden su, etanol, metanol, kloroform, etilasetat, hekzan ile hazırlanan total 18 ekstrenin antioksidan aktivite tayini, DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılarak 0.166 - 0,00166 mg/ml konsantrasyon aralığında yapılmış ve yeşil çay ve doğal çay örneklerinin sulu, metanollü ve etanollü ekstreleri ile siyah çayın sulu ve metanollü ekstreleri antioksidan aktivite gösterirken tüm örneklerin kloroform, etilasetat ve hekzanlı ekstrelerinde ve siyah çayın etanollü ekstresinde antioksidan aktiviteye rastlanmamıştır. Bu çalışmaların sonuçları **Çizelge 5** 'de gösterilmiştir.

Çizelge 5: *C. sinensis* bitkisinin yaprakları ile bu yapraklardan elde edilen yeşil çay ve siyah çay ekstraktları üzerinde DPPH ve ABTS yöntemleri ile yapılan antioksidan etki sonuçları

Ekstreler	DPPH Yöntemi			ABTS Yöntemi		
	C (mg/ml)	%Inh.	IC₅₀ (mg/ml)	C (mg/ml)	%Inh.	IC₅₀ (mg/ml)
YS ekstresi	8,33x10 ⁻³	50,04	0,0079	8,33x10 ⁻³	33,12	0,0153
YM ekstresi	8,33x10 ⁻³	35,57	0,0122	8,33x10 ⁻³	32,82	0,0172
YE ekstresi	8,33x10 ⁻³	25,80	0,0190	8,33x10 ⁻³	23,24	0,0307
YK ekstresi	-	-	-	-	-	-
YEt ekstresi	-	-	-	-	-	-
YH ekstresi	-	-	-	-	-	-
SS ekstresi	8,33x10 ⁻³	29,52	0,0159	8,33x10 ⁻³	32,52	0,0185
SM ekstresi	8,33x10 ⁻²	41,68	0,0167	8,33x10 ⁻³	29,08	0,0176
SE ekstresi	-	-	-	-	-	-
SK ekstresi	-	-	-	-	-	-
SEt ekstresi	-	-	-	-	-	-
SH ekstresi	-	-	-	-	-	-
DS ekstresi	8,33x10 ⁻³	38,76	0,0112	8,33x10 ⁻³	32,55	0,0220
DM ekstresi	8,33x10 ⁻³	47,73	0,0087	8,33x10 ⁻³	22,58	0,0221
DE ekstresi	4,16x10 ⁻²	28,82	0,0750	8,33x10 ⁻³	10,70	0,1180
DK ekstresi	-	-	-	-	-	-
DEt ekstresi	-	-	-	-	-	-
DH ekstresi	-	-	-	-	-	-
Troloks	8,33x10 ⁻³	67,93	0,0043	8,33x10 ⁻³	39,57	0,0087

(-) etki gözlenmedi; **c** konsantrasyon; % **Inh.** %inhibisyon

3.2. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

C. sinensis bitkisinin yaprakları ile bu yapraklardan hazırlanmış olan ticari ürünlerden yeşil ve siyah çay örneklerinden su, etanol, metanol, kloroform, etilasetat, hekzan ile hazırlanan total 18 ekstrenin antimikrobiyal aktivite tayininde önce, disk ve kuyu yöntemi kullanıldı ve bu yöntemlerde zon vermeyen maddelerin MIC değerleri çalışılmadı.

Disk ve kuyu yönteminde zon verenlerin MIC değerleri tabloda gösterildi. Zon küçük olupda MIC değerlerinin dikkate değer gözlenmesi, maddelerin disk ve kuyu içinde, çözücülerinin uçması sonucunda çökmesi veya çözünme sorunu nedeniyle katı besiyeri içine diffüze olmamasına bağlanabilir.

Etilasetat, hekzan, kloroform ve etanolün denenen konsantrasyonlarda mikroorganizmalara karşı öldürücü etkisinin bulunmadığı saptandı. Çözücülerin etkili dozları; maddelerin etkilerinin değerlendirilmesinde dikkate alındı.

Yeşilçayın hem sulu (23 no'lu madde), hem de metanol ekstresinin (3 no.lu madde) özellikle *S. aureus* üzerine etkili olduğu saptandı. (sırasıyla 16 ve 8 µg/ml) .

Doğalçayın sulu (21 no.lu madde) ve etanollü ekstresinin (11 no.lu ektre), *B. subtilis*'e (16 µg/ml) karşı aktivite gösterdiği saptandı.

Ekstreler içinde 3 no.lu yeşilçay metanol ekstresi (8 µg/ml) *S. aureus*'a, 7 no.lu siyahçay kloroformlu ekstresi *C. parapsilosis*'e, 11 no.lu doğalçay etanol ve 21 no.lu doğal çay sulu ekstreleri (16 µg/ml) *Bacillus subtilis*'e, 13 no.lu doğalçay metanol ekstresi (16 µg/ml) ise *P. aeruginosa*'ya karşı diğerlerinden daha iyi aktivite göstermişlerdir.

Yeşilçay, doğaçay hekzan / yeşilçay, doğaçay kloroform ve doğaçay etilasetat ekstralarının hiç birinde, disk diffüzyon ve agar well yöntemlerinden sonuç alınamadığı için, MIC değerleri araştırılmamıştır. Etkili bulunan tüm ekstraların canlılar üzerine toksik etkisi olup olmadığı da araştırılmalıdır. Yapılan disk difüzyon, kuyu ve MIC analizlerinin sonuçları **Çizelge 6** 'da verilmiştir.

Çizelge 6: Çay yaprakları, yeşil çay ve siyah çaydan hazırlanan ekstreler ile kullanılan standartların disk diffüzyon, kuyu ve MIC yöntemleri kullanılarak elde edilen antimikrobiyal etki sonuçları

Ekstre	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Candida albicans</i>			<i>Candida parapsilosis</i>		
	Disk *	Kuyu	MIC. (µg/ml)	Disk *	Kuyu	MIC. (µg/ml)	Disk *	Kuyu	MIC. (µg/ml)	Disk *	Kuyu	MIC. (µg/ml)	Disk *	Kuyu	MIC. (µg/ml)	Disk *	Kuyu	MIC. (µg/ml)
YS Ek.	13		16								14	32						
YM Eks	16		8		14			13	64				13		128		12	128
YE Eks	13		64		13	64		13	32									
YEt Eks		10	512															
YK Ekst																		
YH Eks																		
SS Eks	10		16															
SM Eks					15	32												
SE Eks		15	128					18	32					15	512			
SEt Eks																		
SK Eks	12		32	10		32		22	32							15	16	
SH Eks																		
DS Eks	12		16		14	16					14	32						
DM Eks	12		32								10	16				17	128	
DE Eks		15	128															
DEt Eks																		
DK Eks																		
DH Ekst																		
Kafein sulu çöz.	9		512															
Metanol													16		512			
Etanol								13	1024							14	512	
Etilasetat																		
Kloroform														17	128			
Hekzan)																		
AMP	30		2	30		0,25	10	2	R									
OFX	34		0,125	38		0,125	40	1	22		4							
FLU													17		4	10		4

* Disklerdeki ekstre konsantrasyonu 125µg/ml, antibiyotik ve antifungal disk konsantrasyonu 10µg/ml



Şekil 7: Ekstrelerin *Staphylococcus aureus* üzerine etkisi. **9:** Siyah çay etanollü ekstre, **11:** doğal çay etanollü ekstre



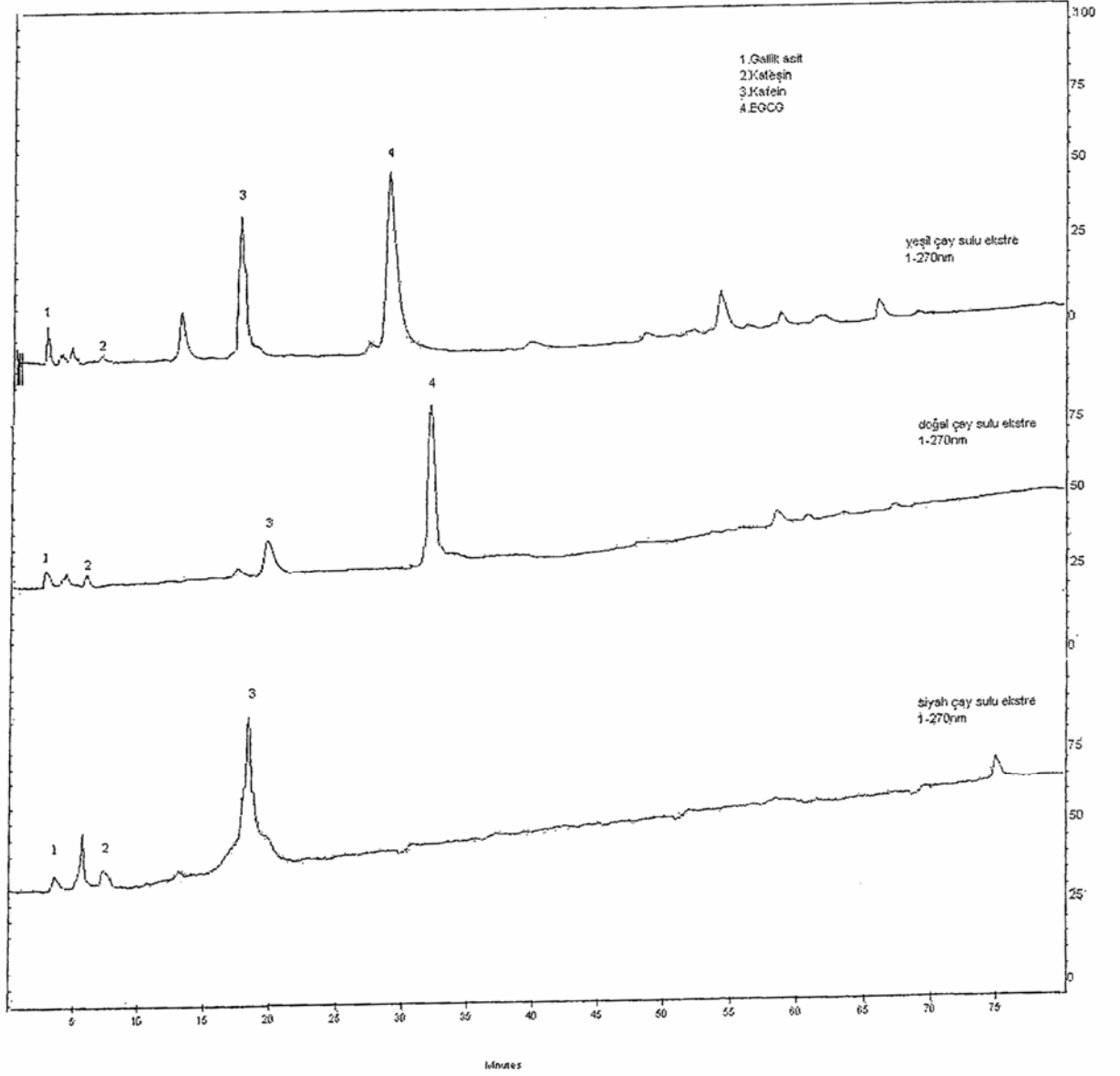
Şekil 8: Ekstrelerin *Candida albicans* üzerine etkisi. **4:** yeşil çay etanollü ekstre, **6:** siyah çay etilasetatlı ekstre; **11:** doğal çay etanollü ekstre

3.3. HPLC İle Çalışılan Örneklerdeki Standart Bileşiklerin Miktar Tayinleri

3.3.1. HPLC ile *C. sinensis* Yaprakları, Yeşil çay ve Siyah çay Sulu Ekstrelerindeki Gallik Asit, Kateşin ve Epigallokateşin gallat Miktar Tayinleri

Araştırılan üç örnekten hareketle hazırlanan sulu ekstrelerin gallik asit, kateşin ve EGCG içeriği 2.3.3. bölümünde belirtilen HPLC koşulları kullanılarak tespit edildi. Bileşiklerin miktarlarını hesaplarken, 3 enjeksiyon sonucu elde edilen pik alanlarının ortalaması kullanıldı.

Üç örneğin sulu ekstrelerindeki gallik asit, kateşin ve EGCG'nın; her biri için ayrı ayrı bulunan kalibrasyon denkleminde, bileşiklerin ortalama alanlarının Y değerine konulmasıyla elde edilen konsantrasyonları - X değerleri- $\mu\text{g/ml}$ cinsinden saptandı. Buradan bileşiklerin $\text{mg}/100\text{ml}$ ve % miktarlarına geçildi. **Çizelge 7**'de çay yapraklarının, yeşil çay ve siyah çayın sulu ekstrelerinde tespit edilen gallik asit, kateşin ve EGCG değerleri $\mu\text{g/ml}$, $\text{mg}/100\text{ ml}$ ve % cinsinden verildi. Örneklerin sulu ekstrelerine ait HPLC analizleri ait kromatogram görüntüleri **Kromatogram 1**'de verilmiştir.



Kromatogram 1: Çay yaprakları, yeşil çay ve siyah çayın sulu ekstrelerinin HPLC analizine ait kromatogram.

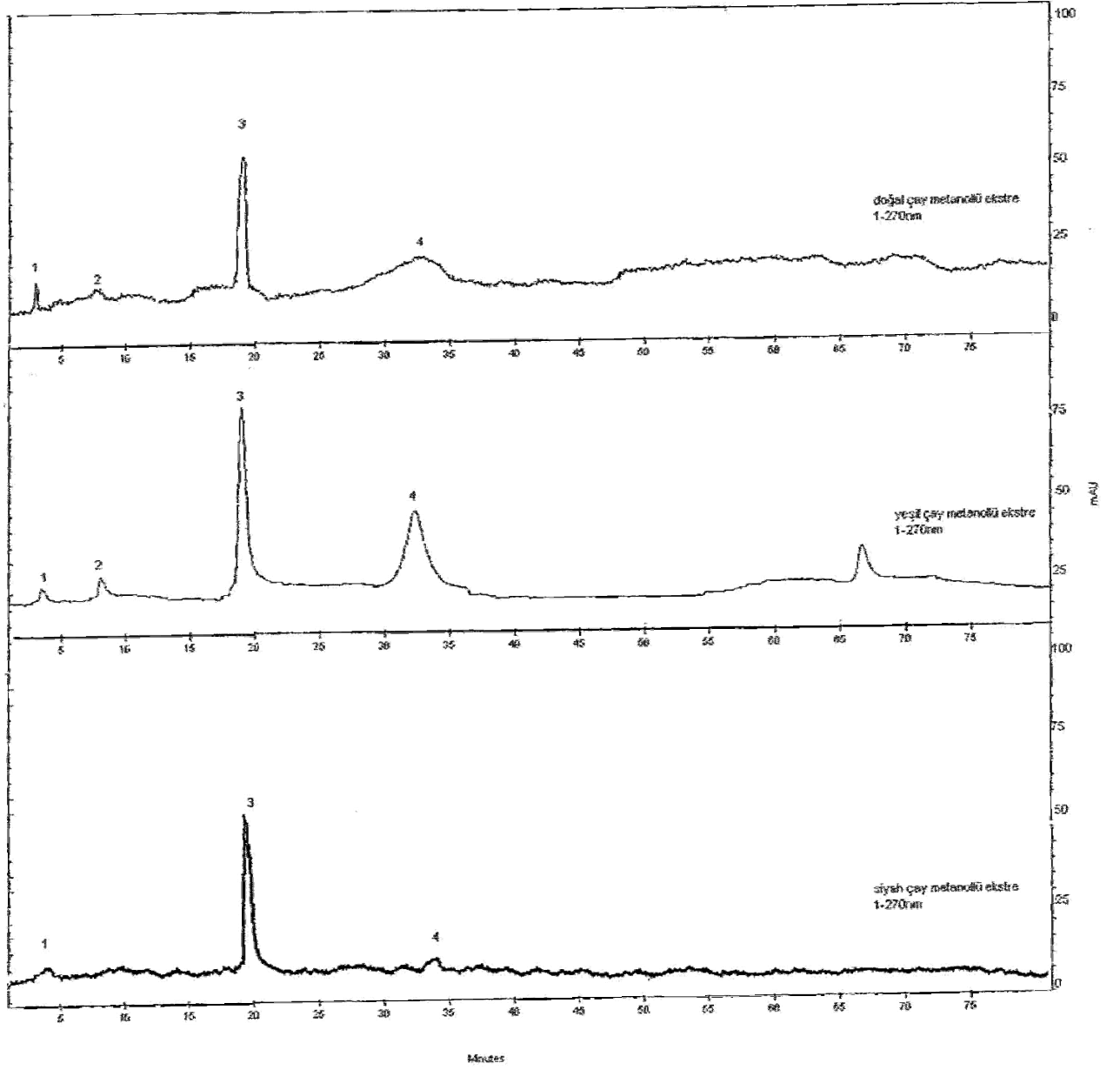
Çizelge 7: Çay yapraklarının, yeşil çay ve siyah çayın sulu ekstresinde tespit edilen gallik asit, kateşin ve EGCG değerleri µg/ml, mg/100 ml ve % cinsinden değerleri

	<i>Doğal Çay Sulu Ekstre</i>			<i>Yeşil çay Sulu Ekstre</i>			<i>Siyah Çay Sulu Ekstre</i>		
	µg/ml	mg/100ml	%±SD	µg/ml	mg/100ml	%±SD	µg/ml	mg/100ml	%±SD
Gallik asit	3,38	0,338	0.085±0,01401	13,41	1,341	0,34±0,0052	2,16	0,216	0,054±0,0025
Kateşin	1,85	0,185	0,046±0,00180	1,41	0,141	0,036±0,0027	1,09	0,109	0,027±0,00162
EGCG	91,60	9,160	2,290±0,01801	195,32	19,53	4,87±0,01808	-	-	-

3.3.2. HPLC ile *C. sinensis* Yaprakları, Yeşil çay ve Siyah çay Metanollü Ekstrelerindeki Gallik Asit, Kateşin ve Epigallokateşin gallat Miktar Tayinleri

Her üç örnekten hareketle hazırlanan metanollü ekstrelerin gallik asit, kateşin ve EGCG içeriği 2.3.3. bölümünde belirtilen HPLC koşulları kullanılarak tespit edildi. Bileşiklerin miktarlarını hesaplarken, 3 enjeksiyon sonucu elde edilen pik alanlarının ortalaması kullanıldı.

Üç örneğin metanollü ekstrelerindeki gallik asit, kateşin ve EGCG'ın; her biri için ayrı ayrı bulunan kalibrasyon denkleminde, bileşiklerin ortalama alanlarının Y değerine konulmasıyla elde edilen konsantrasyonları - X değerleri- $\mu\text{g/ml}$ cinsinden saptandı. Buradan bileşiklerin $\text{mg}/100\text{ml}$ ve % miktarlarına geçildi. **Çizelge 8**'de çay yaprakları, yeşil çay ve siyah çayın metanollü ekstrelerinde tespit edilen gallik asit, kateşin ve EGCG değerleri $\mu\text{g/ml}$, $\text{mg}/100\text{ ml}$ ve % cinsinden verildi. Örneklerin metanollü ekstrelerine ait HPLC kromatogram görüntüleri **Kromatogram 2**'de verildi.



Kromatogram 2: Çay yaprakları, yeşil çay ve siyah çayın metanollü ekstraktlarının HPLC analizine ait kromatogram.

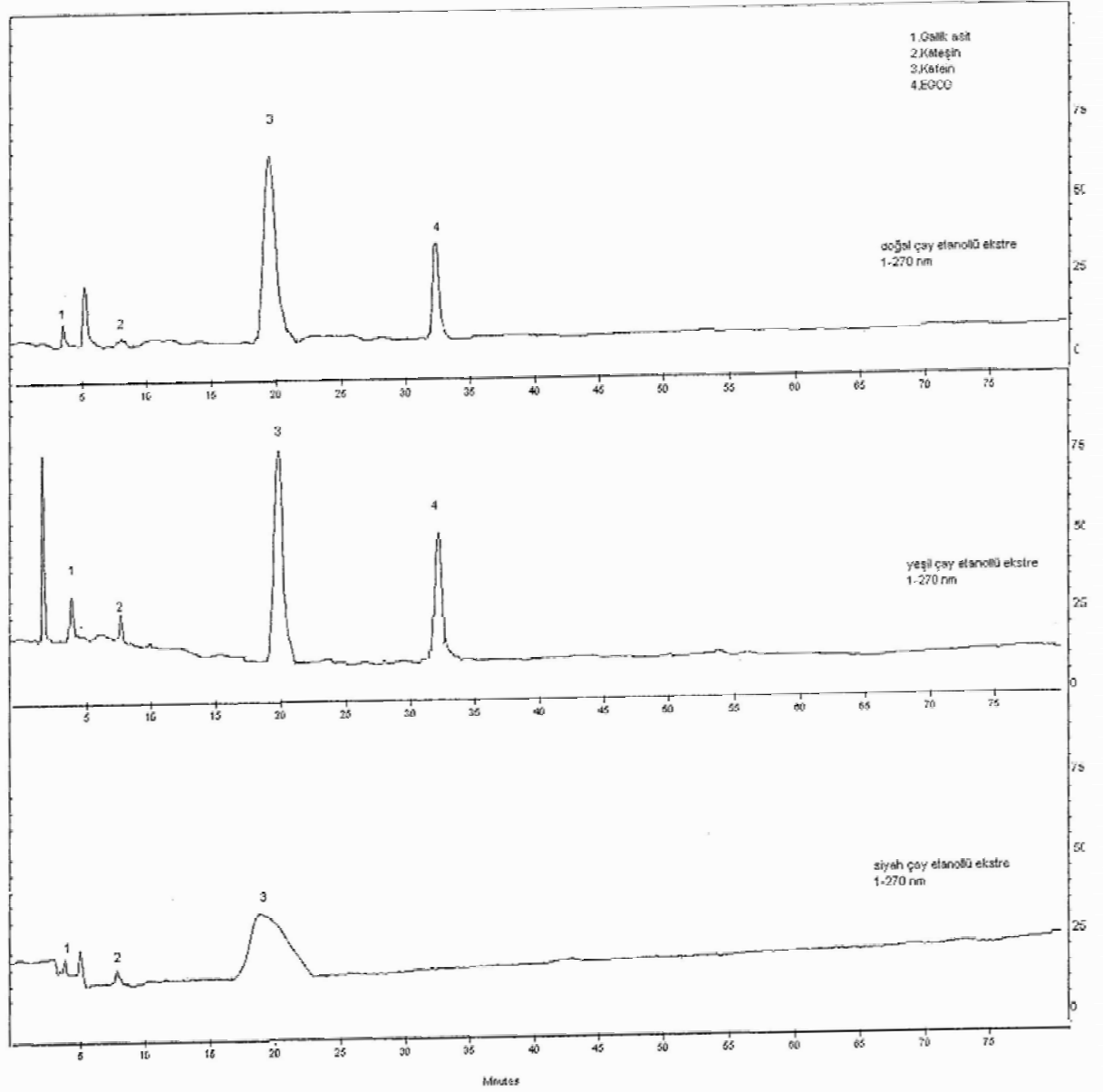
Çizelge 8: Çay yapraklarının, yeşil çay ve siyah çayın metanollü ekstresinde tespit edilen gallik asit, kateşin ve EGCG değerleri µg/ml, mg/ 100 ml ve % cinsinden değerleri.

	<i>Doğal Çay MeOH Ekstre</i>			<i>Yeşil çay MeOH Ekstre</i>			<i>Siyah Çay MeOH Ekstre</i>		
	µg/ml	mg/ 100ml	%±SD	µg/ml	mg/ 100ml	%±SD	µg/ml	mg/ 100ml	%±SD
Gallik asit	1,72	0,172	0,043±0,00260	1,45	0,145	0,036±0,0008	0,93	0,093	0,023±0,0010
Kateşin	0,23	0,023	0,0058±0,00101	8,65	0,865	0,22±0,0062	–	–	–
EGCG	42,24	4,224	1,06±0,01070	195,44	19,54	4,88±0,0025	3,58	0,358	0,009±0,0017

3.3.3.HPLC ile *C. sinensis* Yaprakları, Yeşil çay ve Siyah çay Etanollü Ekstrelerindeki Gallik Asit, Kateşin ve Epigallokateşin gallat Miktar Tayinleri

Her üç örnekten hareketle hazırlanan etanollü ekstrelerin gallik asit, kateşin ve EGCG içeriği 2.3.3. bölümünde belirtilen HPLC koşulları kullanılarak tespit edildi. Bileşiklerin miktarlarını hesaplarken, 3 enjeksiyon sonucu elde edilen pik alanlarının ortalaması kullanıldı.

Üç örneğin etanollü ekstrelerindeki gallik asit, kateşin ve EGCG'ın; her biri için ayrı ayrı bulunan kalibrasyon denkleminde bileşiklerin ortalama alanlarının Y değerine konulmasıyla elde edilen konsantrasyonları - X değerleri- $\mu\text{g/ml}$ cinsinden saptandı. Buradan bileşiklerin $\text{mg}/100\text{ml}$ ve % miktarlarına geçildi. **Çizelge 9**'da çay yapraklarının, yeşil çay ve siyah çayın etanollü ekstrelerinde tespit edilen gallik asit, kateşin ve EGCG değerleri $\mu\text{g/ml}$, $\text{mg}/100\text{ ml}$ ve % cinsinden verildi. Örneklerin etanollü ekstrelerine ait HPLC kromatogram görüntüleri **Kromatogram 3**'te verilmiştir.



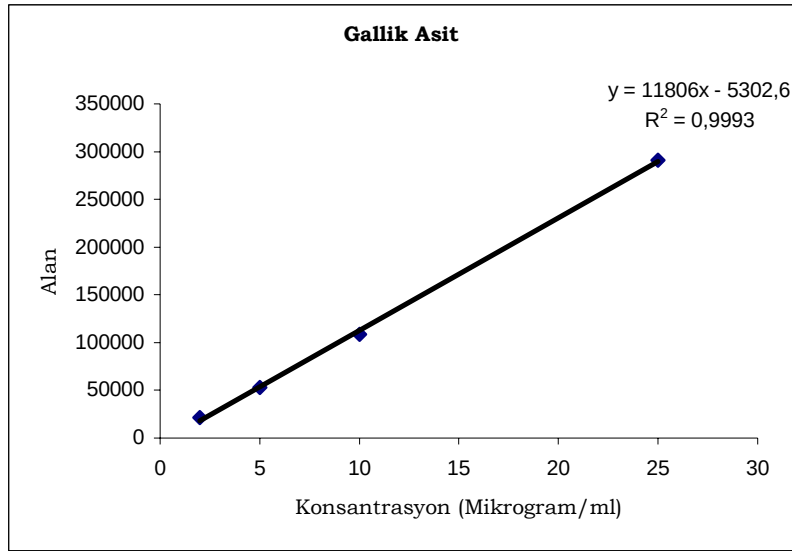
Kromatogram 3: Çay yaprakları, yeşil çay ve siyah çayın etanolü ekstrelerinin HPLC analizine ait kromatogram

Çizelge 9: Çay yapraklarının, yeşil çay ve siyah çayın etanollü ekstresinde tespit edilen gallik asit, kateşin ve EGCG değerleri µg/ml, mg/100 ml ve % cinsinden değerleri.

	<i>Doğal Çay EtOH Ekstre</i>			<i>Yeşil çay EtOH Ekstre</i>			<i>Siyah Çay EtOH Ekstre</i>		
	µg/ml	mg/100ml	%±SD	µg/ml	mg/100ml	%±SD	µg/ml	mg/100ml	%±SD
Gallik asit	2,4	0,24	0,060	3,838	0,3838	0,097±0,001237	0,52	0,052	0,013±0,00345
Kateşin	1,63	0,1630	0,040±0,01440	3,270	0,3270	0,082±0,0086	1,904	0,1904	0,048±0,0081
EGCG	41,71	4,171	1,04±0,01550	77,02	7,702	1,93±0,00198	–	–	–

3.3.4. Standart Bileşiklere Ait Kalibrasyon Eğrileri ve Doğru Denklemleri

3.3.4.1. Gallik Asite Ait Kalibrasyon Eğrisi ve Doğru Denklemi

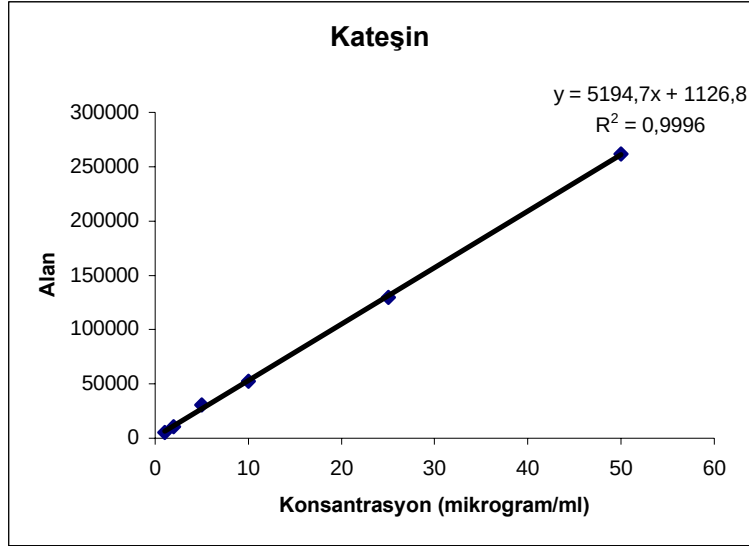


Şekil 9: Gallik asite ait kalibrasyon eğrisi

Çizelge 10: Gallik asite ait denklem, R^2 , LOQ ve LOD değerleri

Bileşik	Denklem	R^2	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)
Gallik asit	$Y = 11806x - 5302,6$	0,0093	0,03	0,01

3.3.4.2. Kateşine Ait Kalibrasyon Eğrisi ve Doğru Denklemi

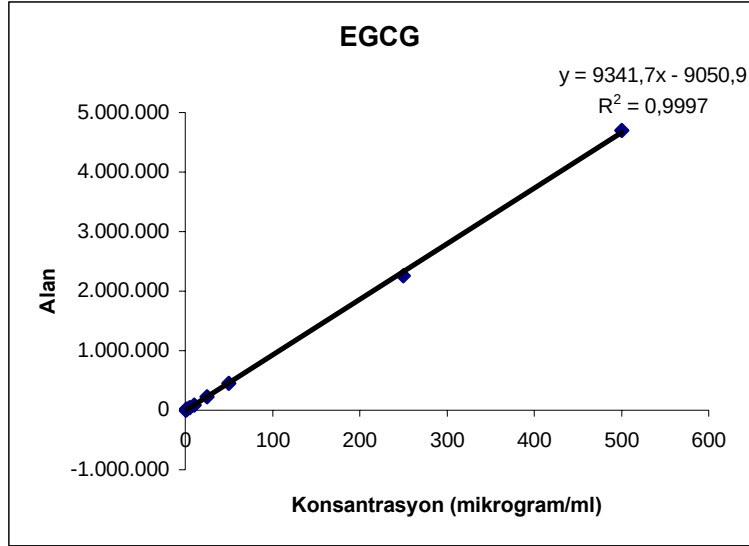


Şekil 10: Kateşine ait kalibrasyon eğrisi

Çizelge 11: Kateşine ait denklem, R^2 , LOQ ve LOD değerleri

Bileşik	Denklem	R^2	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)
Kateşin	$Y = 5194,7x - 1126,8$	0,0096	0,025	0,083

3.3.4.3. Epigallokateşin gallata Ait Kalibrasyon Eğrisi ve Doğru Denklemi



Şekil 11: EGCG'a ait kalibrasyon eğrisi

Çizelge 12: EGCG'a ait denklem, R^2 , LOQ ve LOD değerleri

Bileşik	Denklem	R^2	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)
EGCG	$Y = 9341,7x - 9050,9$	0,0097	0,005	0,0175

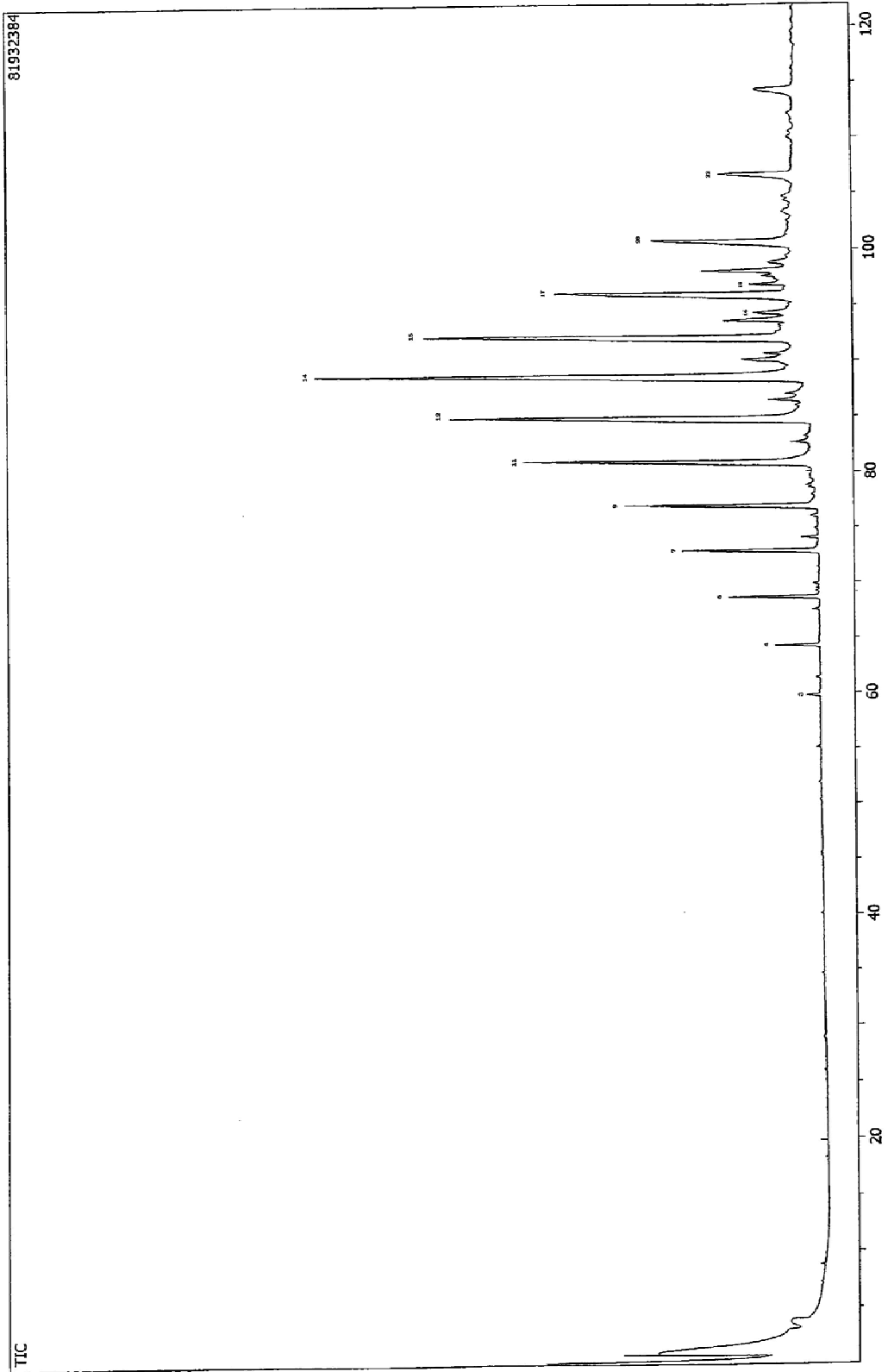
3.4. *C. sinensis* Yaprakları, Yeşil çay ve Siyah çay Uçucu Bileşiklerinin Kalitatif ve Kantitatif Analizi

Her üç örneğin Solid Faz Mikroekstraksiyon (SPME) tekniği ile Polidimetil siloksan fiberi kullanılarak, 70°C’de 30dak. boyunca ekstre edilmesi sonucu elde edilen uçucu bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizi için GC/MS yöntemi uygulanmıştır. Maddelerin teşhisleri, kütle spektrumlarının Wiley Library kütüphanesi ile standart bileşiklerin kütle spektrumlarıyla, alıkonma zamanları ve literatür verileriyle kıyaslanarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

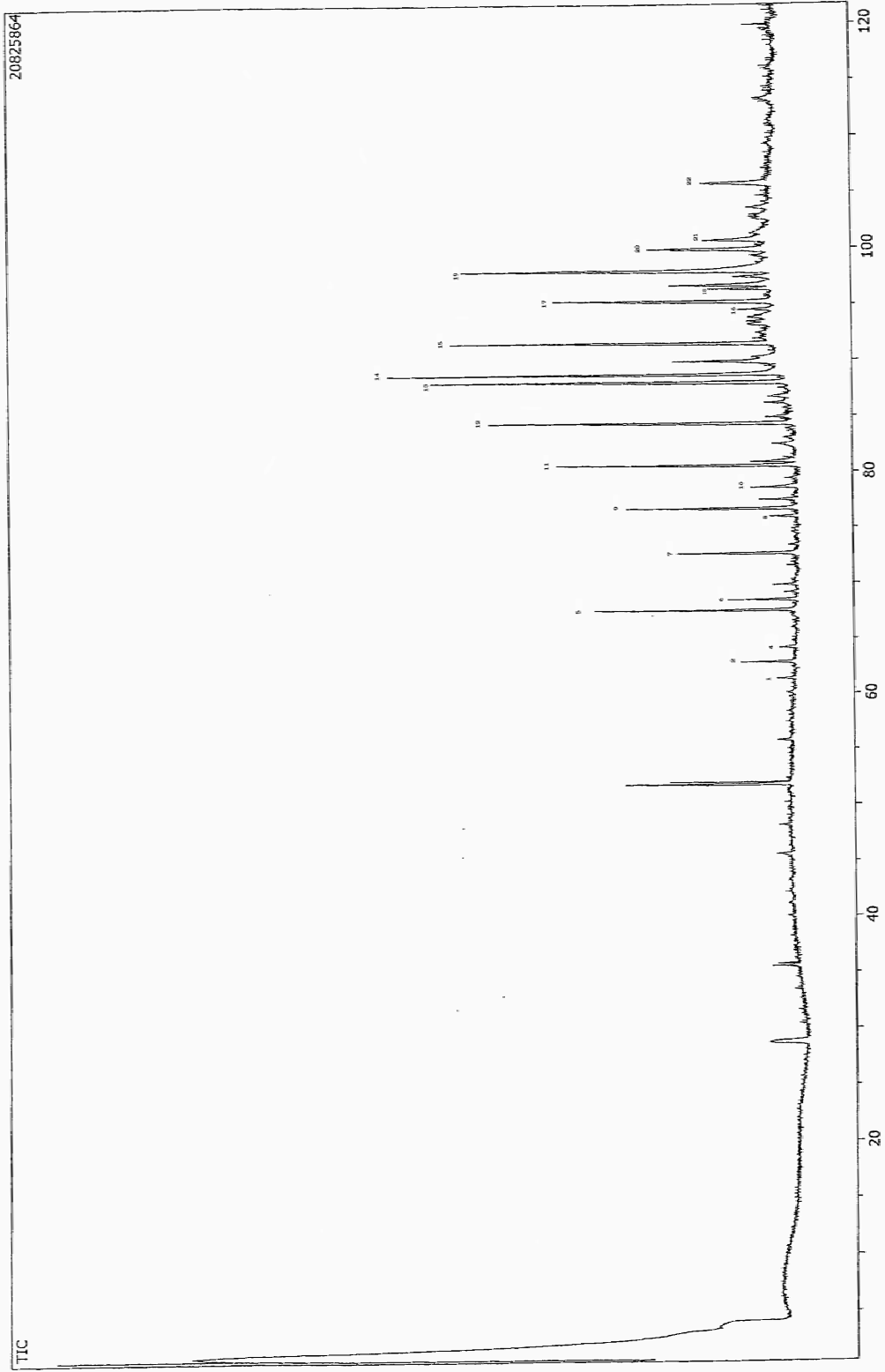
Analizler sonucu elde edilen her üç örneğe ait kromatogram görüntüleri **Kromatogram 4, 5 ve 6**’da ve % miktarları **Çizelge 13**’de verilmiştir.

Çizelge 13: *C. sinensis* bitkisinin yaprakları, yeşil çay ve siyah çayın uçucu bileşikleri ve % miktarları.

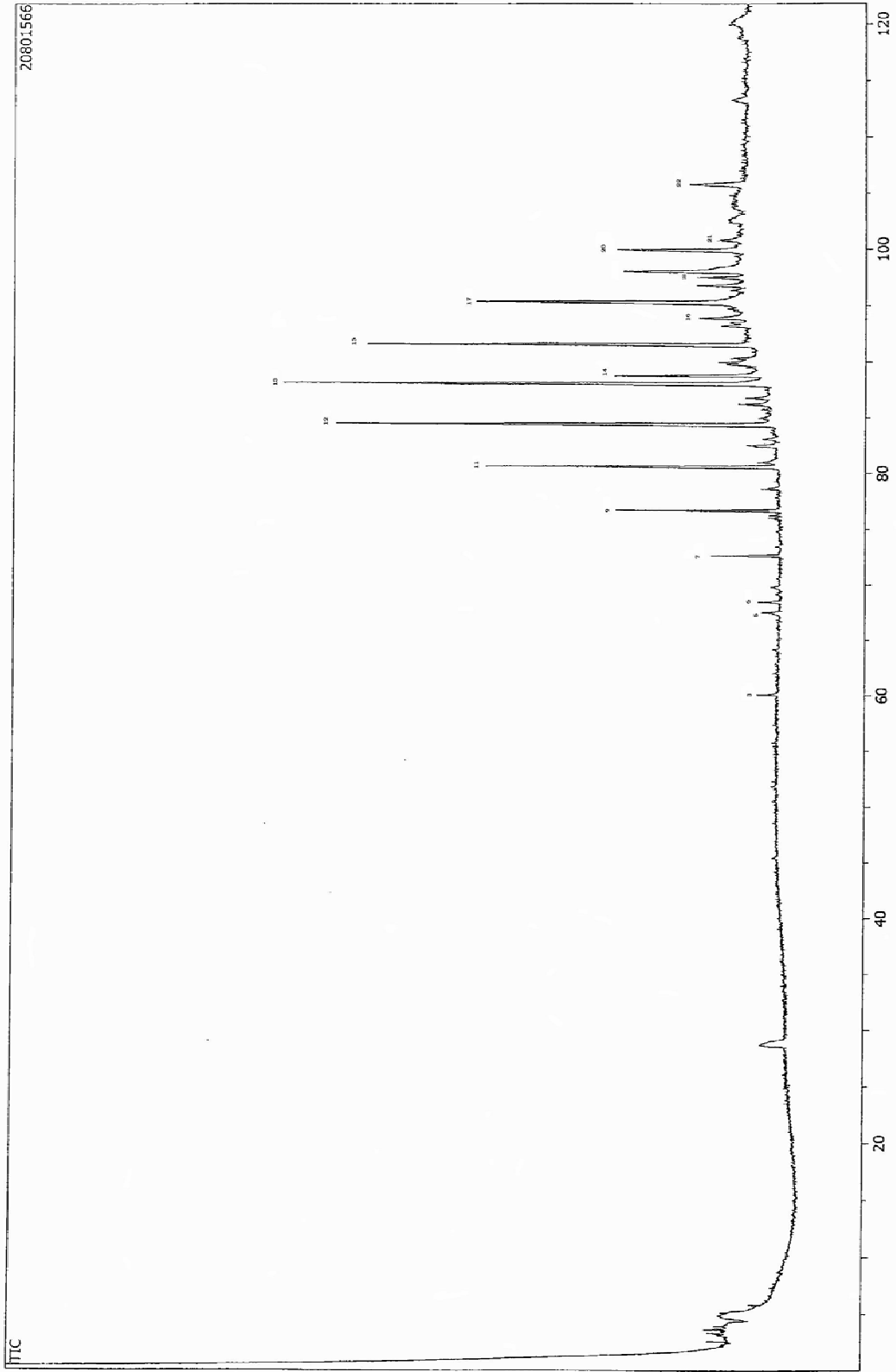
No	Bileşikler	Doğal çay	Yeşil çay	Siyah çay
1	n-hekzanal	-	0,31	-
2	Cis-3-hekzenal	-	0,95	-
3	1-penten-3-on	0,053	-	0,34
4	1-penten-3-ol	0,17	0,49	-
5	Trans-2-hekzenal	-	3,09	0,32
6	Pentanol	0,43	1,19	0,31
7	n-hekzanol	0,78	2,45	0,95
8	Nonanol	-	0,62	-
9	Cis-3-hekzenol	1,69	3,37	2,12
10	Furfural	-	1,15	-
11	Trans-2-hekzenol	3,51	4,63	4,92
12	n-nonanal	7,50	6,66	8,09
13	n-dekanal	-	8,02	9,93
14	n-oktanol	12,98	8,55	3,15
15	2,6,6-trimetil-2-hidroksisiklohekzanon	14,20	7,06	8,10
16	Geraniol	1,48	0,62	2,27
17	Fenilasetaldehit	14,14	5,40	11,26
18	Benzilasetat	3,02	1,32	2,92
19	Cis-3-hekzenil hekzanoat	-	11,26	-
20	α -iyonon	11,66	3,72	5,20
21	Geranil aseton	-	2,45	1,90
22	β -iyonon	7,17	2,45	3,33



Kromatogram 4: Çay yapraklarının uçucu bileşiklerinin Gaz kromatogramı.



Kromatogram 5: Yeşil çayın uçucu bileşiklerinin Gaz kromatogramı.



Kromatogram 6: Siyah çayın uçucu bileşiklerinin Gaz kromatogramı.

4.TARTIŞMA

Bu çalışmada; *Camellia sinensis* bitki yaprakları ile bu yapraklardan ticari ürün haline getirilmek üzere elde edilen yeşil ve siyah çaydan hareketle farklı polaritede çözücüler kullanılarak hazırlanan ekstrelerin antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin tespit edilmiş ve en iyi aktivite gösteren ekstrelerin HPLC analizi ile kimyasal profilleri çıkarılmıştır. Bu amaçla, her üç örneğe ait total 18 ekstrenin DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve örneklerin sulu, metanollü ve etanollü ekstreleri antioksidan aktivite gösterirken kloroform, etilasetat ve hekzanlı ekstrelerde antioksidan aktiviteye rastlanmamıştır. Aktiviteden sorumlu olan ana grubun flavonoidler olduğu düşünüldüğünde bu sonuçlar şaşırtıcı değildir. Troloks standardının gösterdiği aktivite ile mukayese edildiğinde ise etki tespit edilen ekstrelerden en belirgin ve güçlü aktiviteye sahip olanlar yeşil çay sulu ekstre, yeşil çay metanollü ekstre, yeşil çay etanollü ekstre, siyah çay sulu ekstre, siyah çay metanollü ekstre, doğal çay sulu ekstre ve doğal çay metanollü ekstreleridir. Buna karşılık siyah çay etanollü ve doğal çay etanollü ekstrelerinde daha az miktarda aktivite gözlenmiştir. Daha önce yapılan antioksidan aktiviteye ait çalışmalarda hem yeşil çayın hem de siyah çayın, farklı analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirilen sonuçlarına göre yeşil çayda antioksidan aktiviteden sorumlu grup kateşinlerken, siyah çayda bu etkiden sorumlu bileşik grubu kateşinlerin fermentasyon ile polimerizasyonu sonucu oluşan teaflavinler olduğu bildirilmiştir. Özellikle üretim prosesi başta olmak üzere, farklı pek çok parametreye bağlı olarak yeşil çay ve siyah çayın kimyasal içeriklerinin değiştiği ve böylece %50 inhibisyonu gerçekleştiren konsantrasyon aralığının da farklılık gösterdiği gözlenmiştir.

Yeşil çay ve siyah çay ekstralarında güçlü antioksidan etki tespit eden araştırmacılar, daha sonra bu ekstralarda bulunan ve antioksidan aktiviteden sorumlu olan bileşiklerin ayrı ayrı aktivitesini incelemişler ve sonuçta, $TF_3 > ECG > EGCG \geq TF_2B \geq TF_2A > TF_1 \geq EC > EGC$ sıralamasına göre antioksidan aktiviteye sahip olduklarını bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önce farklı çay örnekleriyle yapılan antioksidan aktivite çalışmalarının verileriyle uyum göstermektedir [Miller ve ark., 1996; Nanjo ve ark., 1996; Liebert ve ark., 1999; Sung ve ark., 2000 ; Leung ve ark., 2001; Fahdel ve Arman, 2002; Kunjo ve ark., 2002].

Antimikrobiyal aktivite tayini için örneklerden 12.5 mg/ml bitki ekstresi içerecek şekilde; su, metanol, etanol, kloroform, etil asetat ve hekzan ile total 18 ekstre hazırlanmıştır. Bunun için, bütün ekstralar, öncelikle disk difüzyon ve kuyu yöntemi ile antimikrobiyal aktivite açısından taranmış ve bu yöntemlerle güçlü bir aktiviteye sahip olduğu tespit edilen ekstraların MIC değerleri çalışılmıştır. Disk difüzyon ve kuyu yönteminde zon küçük olupta MIC değerlerinin dikkate değer gözlenmesi, maddelerin disk ve kuyu içinde çözücülerinin uçması sonucunda çökmesi veya çözünme sorunu nedeniyle katı besiyerine diffüze olmamasına bağlanabilir. Bu çalışmada çözücülerin etkili dozları, ekstraların etkilerinin değerlendirilmesinde dikkate alınmıştır. Buna göre; yeşil çay sulu ekstre, doğal çay sulu ekstre, siyah çay sulu ekstre ve yeşil çay metanollü ekstresinin sırasıyla 16µg/ml, 16µg/ml, 16 µg/ml ve 8µg/ml konsantrasyonlarda *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca, doğal çay etanollü ekstresi ve doğal çay sulu ekstresinin 16µg/ml konsantrasyonda *Bacillus subtilis*' e karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuçların tamamı değerlendirildiğinde; yeşil çay metanollü ekstresinin (8µg/ml) *S.aureus*'a, siyah çay kloroformlu ekstresinin (16 µg/ml) *Candida parapsilosis*'e, doğal çay etanollü ekstresinin (16µg/ml) ve doğal sulu ekstresinin (16 µg/ml) *B.subtilis*'e, doğal çay metanol ekstresi (16µg/ml) *Pseudomonas aeruginosa*'ya diğer ekstrelerle oranla çok

daha güçlü aktivite göstermişlerdir. Yeşil çay hekzan, doğal çay hekzan, yeşil çay kloroform doğal çay kloroform, doğal çay etilasetat ekstrelerinin hiçbirinde disk difüzyon ve kuyu yöntemleriyle pozitif sonuç alınmadığı için, MIC değerleri araştırılmamıştır. Araştırmamızda kullanılan bakteriler esas alınarak önceden yapılan çalışmalar tarandığında; bu çalışmalarda yeşil ve siyah çay infüzyonlarının *S. aureus*, *E.coli*'ye karşı etkili olduğu ve siyah çayda bulunan teaflavinlerin bu mikroorganizmalara karşı orta derecede aktivite gösterirken, kateşinlerin güçlü aktivite gösterdiğinin bildirildiği saptanmıştır [Hamilton-Miller, 1997; Ishira ve ark., 2001; Taguri ve ark., 2004; Si ve ark., 2006] . Yapılan bir çalışmada ise yeşil çay polifenollerinin *E.coli* K12 suşuna karşı antibakteriyel etkisinin çok düşük olduğunun gözlemlendiği bildirilmiştir [Amarowicz ve ark., 2000]. Literatür verilerinde çay ekstrelerinin antifungal etkilerine ait bir kayıt bulunmazken, bu çalışmada siyah çayın kloroformlu ekstresinin *Candida parapsilosis*'e karşı antifungal etkileri belirlenmiştir.

Antioksidan ve antimikrobiyal etki sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; yeşil çay sulu, yeşil çay metanollü, yeşil çay etanollü, siyah çay sulu, siyah çay metanollü, siyah çay etanollü, doğal çay sulu, doğal çay metanollü ve doğal çay etanollü ekstrelerinin belirgin antioksidan ve antimikrobiyal aktivite göstermesinden dolayı bu 9 ekstrenin HPLC yöntemi ile kimyasal profili çalışılmıştır. Bunun için bir çok farklı mobil fazlar denenmiş; asetonitril (Çözücü A) ve % 0,1 fosforik asit içeren su (Çözücü B) mobil fazının gradient uygulamasında en iyi ayırım sağlanmıştır. Yapılan analizler sonucu, çay yapraklarında 0,023- 0,185 mg/100ml kateşin, 4,171-9,160 mg/100 ml EGCG ve 0,172-0,338 mg/100 ml gallik asit tespit edilmiştir. Çay yapraklarına ait önceki çalışmalarda ise 0-1,77 mg/100ml kateşin ve 4,33-21,19 mg/100 ml EGCG bulunduğu bildirilmiştir. Çay yapraklarında gallik asitin varlığı tespit edilmiş fakat miktar tayini yapan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yeşil çayın 0,141-0,865 mg/100 ml kateşin, 7,702-19,54 mg/100ml EGCG

ve 0,145-1,341 mg/100 ml gallik asit içerdiği tarafımızdan tespit edilirken önceki çalışmalarda bu bileşikler için bulunan aralıklar sırasıyla, 0-27 mg/100ml, 0,95-156 mg/100ml ve 0,78-3,33 mg/100ml olarak bildirilmiştir. Siyah çayın ise kateşin içeriği 0-0,191 mg/100ml, EGCG içeriği 0-0,358 mg/100ml ve gallik asit içeriği 0,052-0,216 mg/100ml olarak bulunurken, önceki çalışmalarda bu örnekte bulunan bu bileşikleri sırasıyla 0-1,2 mg/100ml, 0,052-5,84 mg/100ml ve 0,18-12,5 mg/100ml değerleri arasında tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu örneklerdeki bileşiklerin miktarlarının iklim ve kültür koşullarına, çay yapraklarından yeşil ve siyah çay ürünlerini elde etmek için kullanılan proseslere ve ekstraksiyonda kullanılan çözücü, sıcaklık, örnek: çözücü oranına ve çayın partikül büyüklüğü ve ağırlığına bağlı olarak değişiklik gösterdiği kanıtlanmıştır [Brooner & Beecher, 1998; Wang ve ark., 2000; Zuo ve ark., 2002; Fernandez ve ark., 2003; Del Rio ve ark., 2004; Pellilo ve ark., 2004; Neilson ve ark., 2006].

Bu üç bileşiğe ait elde ettiğimiz veriler, diğer çalışmalara ait değerlerin bir kısmı ile uygunluk gösterse de önceki bazı çalışmalarda kateşin ve EGCG bileşiklerinin fazla miktarda bulunması yeşil ve siyah çayın üretiminde belki de bitki yaprakları yanında çiçeklerinin de bu işleme tabi tutulmuş olması ve fermentasyon işleminin kısa süreli yapılması ile açıklanabilir. Özellikle Çin'de üretim proseslerinde bitki çiçeklerinin de kullanıldığı bildirilmiş ve çiçeklerin total kateşin miktarının yapraklara nazaran daha fazla olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca kateşin ve EGCG'in ekstraksiyon sırasında sıcaklık ve zamandan çok etkilendiği ve ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak miktarlarının değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar ile daha önceki araştırmaların sonuçları **Tablo 14, 15 ve 16**'da gösterilmiştir [Lin ve ark., 2003; Labbe ve ark., 2006].

Çizelge 14: Yeşil çay sulu ekstresinin gallik asit, kateşin ve EGCG miktarları bakımından literatür verileriyle karşılaştırılması

	Brooner ve Beech	Wang ve ark.	Fernandez ve ark.	Zuo ve ark.	Del Rio ve ark.	Pellilo ve ark.	Neilson ve ark.	İncelenen örnek
Gallik asit	-	0,78-3,33 mg/100ml	-	0,74-1,84 mg/g	6 mg/L	-	-	1,341 mg/100ml
Kateşin	-	0-1,41 mg/100ml	-	-	270 mg/L	0,80 mg/100ml	-	0,141 mg/100ml
EGCG	3-5 mg/dl	0,95-32,6 mg/100ml	13,7-71,5 mg/100ml	51,1-62,4 mg/g	1255 mg/L	39,07 mg/100ml	105 mg/250ml	19,53 mg/100ml

(-) araştırılmamış

Çizelge 15: Siyah çay sulu ekstresinin gallik asit, kateşin ve EGCG miktarları bakımından literatür verileriyle karşılaştırılması

	Brooner&Beech	Zuo ve ark.	Neilson ve ark.	Del Rio ve ark.	İncelenen örnek
Gallik asit	-	2,06 mg/g	-	125 mg/L	0,216 mg/100ml
Kateşin	-	-	-	12 mg/L	0,109 mg/100ml
EGCG	11 mg/dl	3,79 mg/g	14,6 mg/250ml	19 mg/L	0

(-) araştırılmamış

Çizelge 16: Doğal çay sulu ekstresinin gallik asit, kateşin ve EGCG miktarları bakımından literatür verileriyle karşılaştırılması

	Lin ve ark.	Yao ve ark.	İncelenen örnek
Gallik asit	-	-	0,338 mg/100ml
Kateşin	0-1,77 mg/g	-	0,185 mg/100ml
EGCG	4,33-21,19 mg/ml	55,1 mg/g	9,160 mg/100ml

(-) araştırılmamış

Çay yaprakları ile yeşil ve siyah çayın SPME ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen uçucu bileşiklerinin GC/MS analiz sonucunda; çay yapraklarının major uçucu bileşikleri 2,6,6,-trimetil-2-hidroksisikloheksanon (%14,20), fenil asetaldehit (%14,14), n-oktanol (%12,98), α -iyonon (%11,66), β -iyonon (%7,17) ve n-nonanal (%7,50) olarak bulunurken, yeşil çayda tespit edilen ana uçucu bileşikler cis-3-hekzenil hekzanoat (%11,26), n-oktanol (%8,55), n-dekanal (%8,02) ve n-nonanal (%6,66)'dir. Siyah çayın içerdiği major uçucu bileşikler ise fenilasetaldehit (%11,26), n-dekanal (%9,93), 2,6,6-trimetil-2-hidroksisikloheksanon (%8,10) ve n-nonanal (%8,09) olarak bulunmuştur. Yeşil ve siyah çayın aroması üzerine yapılan önceki çalışmalarda, üretim proseslerinde kullanılan sıcaklığın aromayı çok etkilediği ve değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir. Çayın uçucu bileşikleri 1.Floral not, 2.Sebzemsi bir aroma, 3.Taze ve yapraksı not 4.Daha karmaşık fakat yeşilimsi bir koku notu veren bileşikler olarak gruplandırılmaktadır. Hem iklim ve kültür koşullarının, hem de üretim proseslerinin aromayı önemli ölçüde etkilediği ve genelde çayda bulunan hekzenal ve linalol miktarlarının aromayı, dolayısıyla ürün kalitesini etkileyen bir parametre olduğu da vurgulanmaktadır [Howard, 1978; Kato& Shibamoto, 2001; Yanagitomo ve ark., 2003]. . Ülkemizde kültürü yapılan bitkinin ve bundan üretilen çayların aromalarına bakıldığında, hekzenal ve türevlerini içerdikleri, ancak aromaya floral kokuyu veren linalolü taşımadıkları görülmektedir. Bu da elde edilen ürünlerin kokularının daha çok taze ve yapraksı koku notuna kaymasına neden olmaktadır.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Camellia sinensis (L.)O.Kuntze bitkisinin önemi; yapraklarının dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecek olan çayın hazırlanmasında kullanılmasından dolayıdır. Bu yüzden günümüzde bu bitkinin pek çok ülkede ticari amaçla kültürü yapılmaktadır.

C. sinensis bitkisinden ticari ürün hazırlanmasında en önemli işlem fermentasyondur. Bu fermentasyonun derecesi, çayın tipini ve kalitesini etkiler. Buna göre ticarete üç tip üründen söz edilir; yeşil çay, oolong çay ve siyah çay. Ülkemizde siyah çay üretimi uzun yıllar önce başlamış olmasına rağmen; 2004 yılından itibaren yeşil çay üretimi de yapılmaktadır. Oolong çay tipi ise ülkemizde üretilmemektedir. Yeşil çay içerisinde bulunan kateşin türevlerinin yüksek nutrasötik potansiyallerinin yanısıra önemli farmakolojik etkilerinin olduğu da bilinmektedir. Kateşin türevleri içerisinde epi-gallokateşin gallatın en fazla bulunması nedeniyle bu etkilerin çoğunlukla bu bileşikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu yüzden son yıllardaki çalışmalar, yüksek oranda epi-gallokateşin gallat bileşiği içeren yeşil çay ekstraktlarının hazırlanması ve bu bileşiğin izolasyonu yönüne kaymıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler ve önceki çalışmalar kıyaslandığında, bitkinin çeşitli gelişim periyotlarındaki örneklerin analizleri yapılarak, optimum periyodun belirlenmesi, floral notun güçlendirilmesi için üretim proses koşullarında değişiklik yapılarak en iyi ürüne ulaşmanın hedeflenmesi gerekmektedir.

ÖZET

Anadolu Kaynaklı *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar

Camellia sinensis (L.) O.Kuntze bitkisi Theaceae familyasına ait, Doğu ve Uzakdoğu ülkelerinde yetişen ve uygun iklim koşullarına sahip diğer ülkelerde de ticari amaçla kültürü yapılan, binlerce yıldan beri tanınan bir bitkidir. Bu bitkinin önemi; yapraklarının dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecek olan çayın hazırlanılmasında kullanılmasından dolayıdır. *C.sinensis* bitkisinden ticari ürün hazırlanmasında en önemli işlem fermentasyondur. Ticarete üç tip üründen söz edilir: Fermente olmamış çay (yeşil çay), yarı fermente olmuş çay (oolong çay) ve tam fermente olmuş çay (siyah çay). Önceki çalışmalardan bitkiden elde edilen ticari ürünlerin diğer aktiviteleri dışında, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri olduğu ancak bu aktivitelerin ürünlerin içeriğine bağlı olarak değişiklik gösterdiği bilinmektedir.

Bu çalışmada, *C. sinensis* bitkisinin yaprakları ile bu yapraklardan hazırlanan ticari ürünlerden yeşil ve siyah çay örneklerinin farklı polaritede ekstraktları hazırlanarak, her bir ekstrenin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır ve en güçlü aktivite gösteren ekstraktların, her üç örnek içinde; sulu, metanollü ve etanollü ekstraktlar olduğu saptandığı için bu ekstraktların HPLC analizleri yapılmıştır. Ekstraktların epigallokateşin gallat içerikleri %0-4,88 arasında değişmektedir. Ayrıca örneklerin SPME-GC/MS yöntemi ile uçucu bileşikleri tespit edilmiş ve sonuçta; her üç örneğe ait uçucu bileşiklerin kalitatif olarak benzerlik gösterirken, kantitatif açıdan farklılık gösterdiği saptanmıştır. İncelenen örneklerde çay yapraklarının 2,6,6,-trimetil-2-hidroksisikloheksanon'u (%14,20), yeşil çayın cis-3-hekzenil hekzenoat'ı (%11,26) ve siyah çayın ise fenil asetaldehit'i (%11,26) major bileşik olarak içerdiği tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Antioksidan etki, antimikrobiyal etki, *Camellia sinensis*, fenolik bileşikler, uçucu bileşikler.

SUMMARY

Pharmacognosic Researches on *Camellia sinensis* (L.)O.Kuntze Growing in Anatolia.

Camellia sinensis (L.)O.Kuntze which belongs to Theaceae family, is grown widely in the East and Fareast countries and also cultivated in the temperate parts of the world because of its economical value and has been known for ages. The importance of this plant is to be utilized to obtain the product named tea that is the most consumed beverage in the world, after water. In the earlier reports, it was mentioned that the products obtained from the leaves of *C. sinensis* had antioxidant and antimicrobial activity except the other effects but these activities could differ according to the chemical profiles of the products.

In this study, the leaves of *C. sinensis*, green tea and black tea were extracted by solvents that have different polarities. The antioxidant and antimicrobial activities of all these extracts were investigated. Because the aqueous, methanolic and ethanolic extracts showed the strongest activities these extracts were analyzed by using HPLC technique. According to the results of the present study, epigallocatechin gallate was found to differ in a range of %0-4,88 in these extracts. Additionally; the volatile compounds of the samples were determined by using SPME-GC/MS method and it was found that the volatile compounds of the three samples showed qualitative similarities but quantitative differences from each other. While the major volatile compound determined in the leaves of tea is 2,6,6,-trimethyl-2-hydroxycyclohexanon (14,20%), cis-3-hexenyl hexenoate (11,26%) is found in green tea as the most abundant compound. The major compound of black tea was determined as phenyl acetaldehyde (11,26 %).

Key words: Antioxidant activity, antimicrobial activity, *Camellia sinensis*, phenolic compounds, volatile compounds.

KAYNAKLAR

- AMAROWICZ, R., SHAHIDI F. (1996). A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea. *Food Research International*, **29**:71-76.
- AMAROWICZ, R., PEGG, R.B., BAUTISTA, D.A. (2000). Antibacterial Activity of Green Tea polyphenols against Escherichia coli K12. *Nahrung*, **44**: 60-62.
- APOSTOLIDES, Z., BALENTINA, D.A., HARBOWY, M.E., HARA, Y., WEISBURGER, J.H. (1997). Inhibition of PhIP Mutagenicity by Catechins, and by Theaflavins and Gallate Esters. *Mutation Research*, **389**:167-172.
- ARCE, L., RIOS, A., VARCALCEL, M. (1998). Determination of anticarcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system. *Journal of Chromatography A*, **827**: 113-120.
- ATOUI, A.K., MANSOURI, A., BOSKOU, G., KEFELAS, P. (2005). Tea and Herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, **89**: 27-36.
- BAILEY, R.G., NURSTEN, H.E., McDOWELL, I. (1991). Comparative Study of the Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of Black Tea Liquors with Special Reference to the Thearubigins. *Journal of Chromatography*, **542**:115-128.
- BALENTINA, D.A., WISEMAN, S.A. VE BOUWENS C.M. (1997). The Chemistry of Tea Flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **37**:693-704.
- BAPTISTA, J.A.B., TAVARES, J.F.P., CARVALHO, R.C.B. (1998). Comparison of catechins and aromas among different green teas using HPLC/SPME-GC. *Food Research International*, **31**:729-736.
- BAYTOP, T. (1999). Türkiye’de Bitkilerle Tedavi-Geçmiş ve Bugün-. Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul. s:180.
- BESRA, S.E., GOMES, A., GANGULY, D.K., VEDASIROMONI, J.R. (2003). Antidiarrhoeal Activity of Hot Water Extract of Black Tea. *Phytotherapy Research*, **17**:380-384.
- BIOLOGY-ONLINE (2006). Erişim: <http://www.biology-online.org/dictionary/Sesterterpenes>. Erişim Tarihi: 16.11.2006.
- BROONER, W.E and BEECHER G.R. (1998). Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **805**:137-142.

- BRUNETON, J.(1999a). Flavonoids. Pharmacognosy, Phytochemistry-Medicinal Plants. 2nd edition. Lavoisier Publishing, Paris, France, p: 310-311.
- BRUNETON, J.(1999b). Sesquiterpenoids. Pharmacognosy, Phytochemistry-Medicinal Plants. 2nd edition. Lavoisier Publishing, Paris, France, p: 479-482.
- CHAN, C.C.W., KOO, M.W.L., ERNEST, H.Y., OI-SHAN, T., YE ung W.S.B., HO, P.C. (2005). Effects of Chinese Green Tea on Weight, and Hormonal and Biochemical Profiles in Obese Patients with Polycystic ovary Syndrome- A Randomized Placebo- Controlled Trial. *Journal of Society Gynecologic Investigation*, **13**: 63-68.
- CHATTOPADHYAY, P., BESRA, S.E., GOMES, A., DAS, M., SUR, P., MITRA, S., VEDASIROMONI, J.R.(2004). Anti-inflammatory Activity of Tea (*Camellia sinensis*) Root Extract. *Life Sciences*, **74**:1839-1849.
- CHEN, M. (2002). Tea and Health – An Overview. *Tea-Bioactivity and Therapeutic Potential*. Taylor&Fancis. London. Edited by Young-su Zhen p:1-17.
- CHEN, Z., WANG H., YOU, X., XU, N. (2002). The Chemistry of Tea Non-volatiles. *Tea-Bioactivity and Therapeutic Potential*. Taylor & Fancis. London. Edited by Young-su Zhen p:57-89.
- CHEN, H., ZHANG, M., XIE, B. (2005). Components and Antioxidant Activity of Polysaccharide Conjugate from Green Tea. *Food Chemistry*, **90**:17-21.
- CHEN, Q., ZHAO, J., HUANG X., ZHANG, H., LIU, M.(2006).Simultaneous Determination of Polyphenols and Caffeine Contents of green Tea by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Microchemical Journal*, **83**: 42-47.
- CHENG, T.O. (2006). All Teas not Created Equal. The Chinese Green Tea and Cardiovascular Health-Review. *International journal of Cardiology*, **108**:301-308.
- CHUNG, L.Y., CHEUNG, T.C., KONG, S.K., FUNG, K.P., CHOY, Y.M., CHAN,Z.Y., KWOK, T.T. (2001).Induction of Apoptosis by Green Tea Catechins in Human prostate Cancer DU145cells. *Life Science*, **68**:1207-1214.
- CHYU, K.Y., BABIDGE, S.M., ZHAO, X. (2004). Differential Effects of Green Tea –Derived Catechin on Developing Versus Established Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Null Mice. *Circulation*, **109**:2248-2453.

- CLARKE, S.(2002).Essential Chemistry for Safe Aromatherapy. Elsevier Limited. Edinburgh.p:41-52.
- COOK, N.C and SAMMAN, S. (1996). Review: Flavonoids- Chemistry, Metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, **7**: 66-76.
- CPR PRESS (2002). Dictionary of Natural products on software [CD-ROM]. Chapman&Hall. England.
- CRESPY, V. and WILLIAMSON, G. (2004). A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins in Invivo Animal Models. *American Society for Nutritional Sciences*:3431S-3440S.
- DALLUGE, J.J., NELSON, B.C., THOMAS, J.B., SANDER, L.C. (1998). Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **793**:265-274.
- DALLUGE, J.J. and NELSON, B.C.(2000).Determination of tea catechins (Review). *Journal of Chromatography A*, **881**:411-424.
- DAS, M., SUR, P., GOMES, A., VEDASIROMONI,J.R., GANGULY, D.K. (2002). Inhibition of Tumor Growth and Inflammation by Consumption of Tea. *Phytotherapy Research*, **16**:S40-S44.
- DAVIS, P.H. (1967).*Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press, Volume II.
- DEL RIO, D., STEWARD, A.J., MULLEN, W., BURNS, J., LEAN, M.E.J., BRIGENTHI, F., CROZIER, A.(2004). HPLC-MS Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**:2807-2815.
- DEMET,M. Erişim: <http://www.biriz.biz./cay/yesilcay.htm>. Erişim Tarihi: 19.11.2006.
- DIEPVENS, K., KOVACS, E.M.R., VOGELS, N., WESTERTERP-PLANTENGA, M.S. (2006). Metabolic Effects of Green Tea and of Phase of Weight Loss. *Physiology & Behavior*, **87**: 185-191.
- FADHEL, Z.A. and AMRAN, S.(2002). Effects of Black Tea Extract on Carbon Tetrachloride-induced Lipid Peroxidation in Liver, Kidney and Testes of Rats. *Phytotherapy Research*, **16**:S28-S32.
- FERRARA,L., MONTESANO, D., SENATORE, A. (2001). The Distribution of Minerals and Flavonoids in the Tea Plant (*Camellia sinensis*). *II Farmaco*, **56**:397-401.

- FERNANDEZ, P.L., LOPEZ, A., PABLOS, F., GONZALES, A.G., MARTIN, M.J.(2003). The use of catechins and purine alkaloids as descriptors for the differentiation of tea beverages. *Microchimica Acta*, **142**:79-84.
- FINGER, A, KUHR,S., ENGELHARDT, U.H. (1992). Chromatography of Tea Constituents-Review. *Journal of Chromatography*, **624**:293-315.
- FLATEN, T.B.(2002). Aluminium in Tea- Concentrations, Speciation and Bioavailability. *Coordination Chemistry Reviews*, **228**:385-395.
- FUJIMORI, N. and ASHIHARA, H.(1990). Adenine Metabolism and the Synthesis of Purine Alkaloids in Flowers of *Camellia*. *Phytochemistry*, **29**:3513-3516.
- FUJIMORI, N., SUZUKI, T., ASHIHARA, H.(1991). Seasonal Variations in Biosynthetic Capacity for the Synthesis of Caffeine in Tea Leaves.*Phytochemistry*, **30**:2245-2248.
- FUJUKI, H.(2005). Green Tea: Health Benefits as Cancer Preventive for Humans. *The Chemical Record*, **5**:119-132.
- GALATI, G., LIN, A., SULTAN, A.M., O'BRIEN, P.J.(2006). Cellular and in vivo hepatotoxicity Caused by Green Tea Phenolic Acids and Catechins. *Free Radical Biology & Medicine*, **40**:570-580.
- GOLDBOHN, R.A., HERTOGE, M.G.L., BRANTS, H.A.M., VAN POPPEL, G., VAN DEN BRANDT, P.A.(1996). Consumption of Black Tea and Cancer Risk: a Prospective Cohort Study. *Journal of the National Cancer Institute*, **88**:93-100.
- GOMES, A., DAS, M., VEDASIROMONI, J.R., GANGULY, D.K.(1999). Proconvulsive Effect of tea (*Camellia sinensis*) in Mice. *Phytotherapy Research*, **13**:376-379.
- GOTO, T., YOSHIDA Y., KISO, M., NAGASHIMA, H. (1996). Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *Journal of Chromatography A*, **749**:295-299.
- GREEN TEA LOVERS.Erişim:
[<http://www.greentealovers.com/greenteahistory.html>.] Erişim tarihi:26.01.2006
- GULATI, A.and RAVINDRANTH, S.D. (1996). Seasonal Variations in quality of Kangra Tea (*Camellia Sinensis* (L.) O.Kuntze) in Himachal Pradesh. *Journal of Science and Food Agriculture*, **71**:231-236.
- GUPTA, S., AHMAD,N., NIEMINEN, A.L., MUKTHAR, H.(2000). Growth Inhibition, Cell-Cycle Dysregulation, and Induction of Apoptosis by Green Tea Constituents (-) Epigallocatechin-3-gallate in Androgen-Sensitive and Androgen-Insensitive Human Prostate Carcinoma Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **164**:82-90.

- GUPTA, S., CHAUDHURI, T., SETH, P., GANGULY, D.K., GIRI, A.K. (2002). Antimutagenic Effects of Black Tea and its two Active polyphenols Theaflavins and Tearibugins in Salmonella Assays. *Phytotherapy Research*, **16**:655-661.
- GÜNDOĞAN, S. Erişim: [<http://www.caykur.gov.tr/detay.asp?id=46>] Erişim tarihi: 31.03.2006.
- HAMILTON-MILLER, J.M.T. (1995). Antimicrobial Properties of Tea-Mini Review. *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*, **39**:2375-2377.
- HAN, C.(1997). Screeninig of Anticarcinogenic Ingredients in Tea Polyphenols. *Cancer Letters*, **114**:153-158.
- HARBOWY, M.E. and BALENTINA, D.A. (1997). Tea Chemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **16**:415-480.
- HASEGAWA, N., YAMDA, N., MORI, M.(2003). Powdered Gren Tea Has Antilipogenic Effect on Zucker Rats Fed a High Fat Diet. *Phytotherapy Research*, **17**:477-480.
- HEINRICH,M., BARNES, J., GIBBONS S., WILLIAMSON E.M. (2004). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Elsevier Science Ltd. New York p: 75-82.
- HIGASHI-OKAI, K., OTANI, S., OKAI, Y.(1998). Potent Suppressive Activity of Phephytin a and b from the Non-Phenolic Fraction Green Tea against tumor promotion in Mouse Skin. *Cancer Letters*, **129**:223-228.
- HIGASHI-OKAI, K., TANIGUCHI, M., OKAI, Y. (2000). Potent Antioxidative Activity of Non-phenolic Fraction of Green Tea (Camellia sinensis)- Association with pheophytins a and b. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 117-120.
- HORIE, H., MUKAI, T., KOHATA,K.(1997). Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **758**:332-335.
- HORIE, H. and KOHATA, K.(2000). Analysis of tea components by high performance liquid chromatography and high performance capillary electrophoresis (Review). *Journal of Chromatography A*, **881**:425-438.
- HOWARD, G.E. (1978). The Volatile Constituents of Tea. *Food Chemistry*, **4**: 97-106.
- HOWES, M.J.R., PERRY, N.S.L., HOUGHTON, P.J. (2003). Plants with Traditional Uses and Activities, Relevant to the Management of Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorder- Review. *Phytotherapy Research*, **17**:1-18.

- IMAI, K., SUGA, K., NAKACHI, K.(1997). Cancer-Preventive Effects of Drinking Green Tea among a Japanese Population. *Preventive Medicine*, **26**:769-775.
- ISHIRA, N., CHU, D.C., AKACHI, S., JUNEJA, L.R.(2001). Improvement of Intestinal Microflora Balance and prevention of Digestive and Respiratory Organ Diseases in Calves by Green Tea Extracts. *Livestock Production Science*, **68**:217-229.
- KATIYAR, S.K. and MUKHTAR, H. (1997). Tea Antioxidants in Cancer Chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry Supplements*, **27**:59-67.
- KATO, M. and SHIBAMOTO, T. (2001). Variations of Major Volatile Constituents in Various Green Teas From Southeast Asia. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **49**:1394-1396.
- KAUFMAN, P.B., CSEKE, L.J., WARBER, S., DUKE, J.A. VE BRIELMANN, H.L.(1999). Natural Products from Plants. CRC Press. Boston.p:8-17.
- KAWAKAMI, M., GANGULY, S.N., BANERJEE, J., KOBAYASHI,A.(1995). Aroma Composition of Oolong Tea and Black Tea by Brewed Extraction Method and Characterizing Compounds of Daejeeling Tea Aroma. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **43**:200-207.
- KHOKHAR, S., VENEMA,D., HOLLMAN, P.C.H., DEKKER, M., JONGEN,W. (1997). A RP-HPLC Method for the Determination of Tea Cathechins. *Cancer Letters*, **114**: 171-172.
- KIDA, K., SUZUKI, M., TAKAGAKI, A., NANJO, F. (2002). Deodorizing Effects of Catechins on Amines and Amonia. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **66**:373-377.
- KINJO, J., NAGAO, T., TANAKA, T., NONAKA, G., OKAWA, M., NOHARA, T., OKABE, H. (2002). Activity-Guided Fractionation of Green Tea Extract with Antiproliferative Activity against Human Stomach Cancer Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **25**:1238-1240.
- KOBAYASHI, K., TERUYA, T., SUENAGA, K., MATSUI, Y., MASUDA, H., KIGOSHI, H. (2006). Isotheasaponins B₁-B₃ from Camellia sinensis var. sinensis Tea Leaves. *Phytochemistry*, **67**:1385-1389.
- KOO, M.W.L. and CHO, C.H.(2004). Pharmacological Effects of Green Tea on the Gastroinsestinal System-Review. *European Journal of Pharmacology*, **500**:177-185.
- KUNDU, T., DEY, S., ROY, M., SIDDIQI, M., BHATTACHARYA, R.K. (2005). Induction of Apoptosis in Human Leukamia Cells by Black Tea and Its Polyphenol Theaflavin. *Cancer Letters*, **230**: 111-121.

- LABBE, D., ARAYA-FARIAS, M., TREMBLAY, A., BAZINET, L.(2005). Electromigration Feasibility of Green Tea Catechins. *Journal of Membran Science*, **254**:101-109.
- LABBE, D., TREMBLAY, A., BAZINET, L.(2006). Effect of Brewing Temperature and Duration on Green Tea Catechin Solubilization: Basis for production EGC and EGCG-enriched fractions. *Seperation and Purification Technology*, **49**:1-9.
- LANBERT, J.D. and YANG, C.S. (2003). Cancer Chemopreventive Activity and Bioavailability of Tea and Tea Polyphenols-Review. *Mutation Research*, **523-524**:201-208.
- LARGER, P.J., JONES, A.D., DACOMBE, C. (1998). Seperation of tea polyphenols using micellar electrokinetic chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, **799**: 309-320.
- LEE, B.L. and ONG, C.N.(2000). Comparative Analysis of Tea Catechins and Theaflavins by High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **881**:439-447.
- LEE, W., MIN, W.K., CHUN, S., LEE, Y.W., PARK, H., LEE, D.H., LEE, Y.K., SON, J.E.(2005). Long-term Effects of Green Tea Ingestion on Atherosclerotic Biological Markers in Smokers. *Clinical Biochemistry*, **38**:84-87.
- LEUNG, L.K., SU,Y., CHEN, R., ZHANG, Z., HUANG, Y., CHEN, Z.Y. (2001). Theaflavins in Black Tea and Catechins in Green Tea Are Equally Effective Antioxidants. *American Society for Nutritional Science*: 2248-2251.
- LEWIS, J.R., DAVIS, A.L., CAI, Y., DAVIES, A.P., WILKINS, J.P.G., PENNINGTON, M.(1998). Theaflavate B, Isotheaflavin-3'-O-gallate and Neotheaflavin-3-O-gallate: Three polyphenolic Pigments from Black Tea. *Phytochemistry*, **49**:2511-2519.
- LI, SD. (2002). Biochemical and Cellular Bases For Tea Activity. *Tea-Bioactivity and Therapeutic Potential*. Taylor & Francis. London. Edited by Young-su Zhen p:121-130.
- LIANG, Y., LU, J., ZHANG, L., WU, S., WU, Y.(2003).Estimation of Black Tea Quality by Analysis of Chemical Composition and Colour Difference of Tea Infusions.*Food Chemistry*, **80**: 283-290.
- LIEBERT, M., LICHT, U., BOHM, V., BITSCH, R.(1999). Antioxidant Properties and Total Phenolics Content of Green and Black Tea Under Different Brewing Conditions. *Zeitschrift Fuer Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A*, **208**:217-220.
- LIMSONG, J., BENJAVONGKULCHAI, E., KUVATANASUCHATI, J.(2004). Inhibitory Effect of Some Herbal Extracts on Adherence Streptococcus mutans. *Journal of Ethnopharmacology*, **92**:281-284.

- LIN, Y.S., WU, S.S., LIN, J.K. (2003). Determination of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea flowers (*Camellia sinensis*) and Their Hydroxyl Radical Scavenging and Nitric Oxide Suppressing Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**:975-980.
- LINDOLM, K. and GELIN, J. (1994). Antiinflammatory treatment may Prolong Survival Time in Undernourished Patients with Metastatic Solid Tumour. *Cancer Research*, **54**:5602-5604.
- LIU, S., LU, H., ZHAO, Q., HE, Y., NIU, J., DEBNATH, A.K., WU, S., JIANG, S. (2006). Theaflavin derivatives in Black Tea and Catechin Derivatives in Green Tea Inhibit HIV-1 Entry by Targeting gp41. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1723**:270-281.
- LU, Y., UMEDA, T., YAGI, A., SAKATA, K., CHAUDHURI, T., GANGULY, D.K., SARMA, S. (2000). Triterpenoid Saponins from the Roots of Tea plant. *Phytochemistry*, **53**: 941-946.
- LU, Y.P., LOU, Y.R., LIN, Y., SHIH, W.J., HUANG, M.T., YANG, C.S., CONNEY, A.H. (2001). Inhibitory Effects of Orally Administered Green Tea, Black Tea and Caffeine on Skin Carcinogenesis in Mice Previously Treated with Ultraviolet B Light :Relationship to Decreased Tissue Fat. *Cancer Research*, **61**:5002-5009.
- LUCZA, J. W. and SKRZDLEWSKA, E. (2005). Antioxidant Properties of Black Tea. *Preventive Medicine*, **40**:910-918.
- LUYPAERT, J., ZHANG, M.H., MASSART, D.L. (2003). Feasibility study for the use of near infrared spectroscopy in the qualitative and quantitative analysis of green tea, *Camellia sinensis* (L.). *Analytica Chimica Acta*, **478**:303-312.
- MA, S.J., WATANABE, N., YAGI, A., SAKATA, K. (2001). (3R, 9R)-3-hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol disaccharide glycoside is an Aroma Precursor in Tea Leaves. *Phytochemistry*, **56**:819-825.
- MAEDA, K., HASEGAWA, T., MURABAYASHI, K., FUKUYAMA, A., OHYA, M. (2005). Effects of Long-term oral Administration of Green Tea Cultivated in Different District in Japan on Body Weight, Blood Lipid and Glucose levels on db/db Mice. *Journal of Food Biochemistry*, **29**:295-304.
- MCKENNA, D.J., JONES K., HUGHES K., HUMPHERY S. (2002). Botanical Medicines The Desk Reference for Major Herbal Supplements. The Haworth Press: New York p: 600-601.
- MILLER, N.J., CASTELLUCCIO, C., TIJBURG, L., RICE-EVANS, C. (1996). The Antioxidant Properties of Theaflavins and Their Gallate Esters- Radical Scavengers or Metal Chelators?. *FEBS Letters*, **392**:40-44.

- MORTON, L., CACETTA, R.A.A., PUDDEY, I.B., CROFT, K.D. (2000). Chemistry and Biological Effects of Dietary Phenolic Compounds: Relevance to Cardiovascular Disease- Brief Review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **27**:152-159.
- MOYNIHAN, P. (2000). Foods and Factors that Protect against Dental Caries-Review. *Nutrition Bulletin*, **25**:281-286.
- MUKHTAR, H. and AHMAD, N.(2000). Tea Polyphenols: Prevention of Cancer and Optimizing Health. *American Society for Clinical Nutritional*, **71**:1689S-1702S.
- NABORS, M.W. (2004). *Introduction to Botany*. San Francisco: Benjamin Cummings, Chapter 1.
- NAG CHAUDHURI, A.K., KARMAKAR, S., ROY, D., PAL, M., SEN, T. (2005). Antiinflammatory Activity of Indian Black Tea. *Pharmacological Research*, **16**: 169-175.
- NANCE, C.L. and SHEARER, W.T. (2003). Is Green Tea Good for HIV-1 Infection?. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **112**:851-853.
- NANJO, F., GOTO, K., SETO, R., SUZUKI, M., SAKAI, M., HARA, Y.(1996). Scavenging Effects of Tea Catechins and Their Derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, **21**: 895-902.
- NATIONAL COMMITTEE FOR LABORATORY STANDARDS (1996). Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Yeast; Approved Standard, M27-A, 15, 10, VA Medical Centre, Tuscon.
- NATIONAL COMMITTEE FOR LABORATORY STANDARDS (1998). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing, 8th Informational Supplements, M100-S8: NCCLS, Villanova, PA.
- NATIONAL COMMITTEE FOR LABORATORY STANDARDS (2002). Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 3rd edition Approved Standard, NCCLS Document M100-S12, NCCLS, Wayne, PA, USA.
- NEILSON, A.P., GREEN, R.J., WOOD, K.V., FERUZZI, M.G.(2006). High-throughput Analysis of Catechins and Theaflavins by High Performance Liquid Chromatography with diode Array Detection. *Journal of Chromatography A*, **1132**: 132-140.
- OKELLO, E.J., SAVELEV, S.U., PERRY, E.K. (2004). In vitro Anti- β -secretase and Dual Anti-cholinesterase Activities of *Camellia sinensis* (tea) Relevant to Treatment of Dementia. *Phytotherapy Research*, **18**:624-627.

- OWUOR, P.O. and McDOWELL, I. (1994). Changes in Theaflavin Composition and Astringency During Black Tea Fermentation. *Food Chemistry*, **51**:251-254.
- OWUOR, P.O., OBANDA, M., NYIRENDA, H.E., MPHANGWE, N.I.K., WRIGHT, L.P., APOSTOLIDE, Z. (2006). The relationship between Some Chemical Parameters and Sensory Evaluations for plain Black Tea Produced in Kenya and Comparison with Similar teas from Malawi and South Africa. *Food Chemistry*, **97**:644-653.
- PAN, T., JANKOVIC, J., LE, W. (2003). Potential Therapeutic properties of Green Tea Polyphenols in Parkinson's Disease. *Drugs Aging*, **20**:711-721.
- PELLILO, M., BONOLI, M., BIGUZZI, B., BENDINI, A., GALLINA TOSCHI, T., LECKER, G. (2004). An Investigation in the use of HPLC with UV and MS- Electrospray Detection for Quantification of Tea Catechins. *Food Chemistry*, **87**:465-470.
- PEREZ, C., PAUL, M., BAZERQUE, P. (1990). Antibiotic Assay by Agar-Well Diffusion Method. *Acta Biologica et Medicine Experimentalist*, **15**:13-115.
- PERVA-UZUNALIC, A., SKERGET, M., KNEZ, Z., WEINREICH, B., OTTO, F., GRUNER, S. (2006). Extraction of Active Ingredients from Green Tea (*Camellia sinensis*): Extraction Efficiency of Major Catechins and Caffeine. *Food Chemistry*, **96**:597-605.
- PETERSON, J., DWYER, J., JACQUES, P., RAND, W., PRIOR, R., CHUI, K. (2004). Tea Variety and Brewing Techniques Influence Flavonoid Content of Black Tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, **17**:397-405.
- PETERSON, J., DWYER, J., BHAGWAT, S., HAYTOWITZ, D., HOLDEN, J., ELDRIDGE, A.L., BEECHER, G., ALADESANMI, J. (2005). Major Flavonoids in Tea. *Journal of food Compositional and Analysis*, **18**:487-501.
- PINDER, A.R. (1960). *The Chemistry of The Terpenes*. Chapman & Hall Ltd.. London p:28.
- PRICE, W.E and SPITZER J.C. (1993). Variations in the amounts of individual flavonols in a range of green teas. *Food Chemistry*, **47**:271-276.
- RAH, D.K., HAN, D.W., BAEK, H.S., HYON, S.H., PARK, J.C. (2005). Prevention of reactive Oxygen Species-induced Oxidative Stress in Human Microvascular Endothelial Cells by Green Tea Polyphenols. *Toxicology Letters*, **155**: 269-275.

- REEVES, S.G., GONE, F., OWUOR, P.O.(1985). Theaflavin Analysis of Black Tea-Problems and Prospects. *Food Chemistry*, **18**:199-210.
- RENOLD, W., MULLER, R.N., KELLER, U., WILLHALM, B., OHLOFF, G. (1974). An Investigation of the Tea Aroma Part 1:New Volatile Black Tea Constituents. *Helvetica Chimica Acta*, **57**:1301-1308.
- RIEMERSMA, R.A., RICE-EVANS, C.A., TYRRELL, R.M., CLIFORD, M.N.(2001). Tea Flavonoids and Cardiovascular Health. *International Journal of Medicine (QJM)*, **94**:272-282.
- ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., TYLER V.E. (1996). Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. Williams & Wilkins Company. Baltimor. p:80-107.
- ROBERTSON, A. and BENDALL, D.S.(1983). Production and HPLC Analysis of Black Tea Teaflavins and Tearubigins During Invitro Oxidation. *Phytochemistry*, **22**:883-887.
- ROBERTSON, A. and HALL, M.N. (1989). A Critical Investigation into Flavognost Method for Theaflavin Analysis in Black Tea. *Food Chemistry*, **34**:57-70.
- ROW, K.H.& JIN, Y. (2006). Recovery of Catechine Compounds from Korean Tea by Solvent Extraction. *Bioresource Technology*, **97**: 790-793.
- SADZUKA, Y., SUGIYAMA, T., SONOBE, T.(2000).Efficacies of Tea Components on Doxorubicin Induced Antitumor Activity and Reversal Multidrug Resistance. *Toxicology Letters*, **114**:155-162.
- SAEKI, K., HAYAKAWA, S., ISEMURA, M., MIYASE, T.(2000). Importance of a Pyrogallol-type Structure in Catechin Compounds for Apoptosis-Inducing Activity. *Phytochemistry*, **53**:391-394.
- SARKAR, A. and BHADURI, A. (2001). Black Tea is a Poweful Chemopreventor of ReactiveOxygen and nitrogen Species: Comparison with Its Individual Catechin Constitüents and Gren Tea. *Biochemical and Biophysical research Communications*, **284**:173-178.
- SATOH, E., ISHII, T., SHIMIZU, Y., SAWAMURA, S.I., NISHIMURA, M.(2001). Black Tea Extract, Thearubigin Fraction, Counteracts the Effect of Tetanus Toxin in Mice. *Experimental Biology and Medicine*, **226**:577-580.
- SEKINE, T., ARITA, J., YAMAGUCHI,A., SAITO, K., OKONOJI, S., MORISAKI, N., IWASAKI, S., MURAKOSHI,I.(1991). Two Flavonol Glycosides from seeds of Camellia sinensis. *Phytochemisry*, **30**:991-995.
- SHARMA, V., GULATI, A., RAVINDRANATH, S.D.(2005). Extractability of Tea Catechins as a Function of Manufacture Procedure and Temperature of Infusion. *Food Chemistry*, **93**:141-148.

- SHARMA, V., GULATI, A., RAVINDRANATH, D., KUMAR, V. (2005). A Simple and Convenient Method for Analysis of Tea Biochemicals by Reverse phase HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**:583-594.
- SI, W., GONG, J., TSAO, R., KALAB, M., YANG, R., YIN, Y. (2006). Bioassay-guided Purification and Identification of Antimicrobial Components in Chinese Green Tea Extract. *Journal of Chromatography A*, **1125**: 204-210.
- STEWART, A.J., MULLEN, W., CROZIER, A.(2005). Online High Performance Liquid Chromatography Analysis of the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Green and Black Tea. *Molecular Nutrition and Food Research*, **49**:52-60.
- SUNG, H., NAH, J., CHUN, S., PARK, H., YANG, S.E., MIN, W.K.(2000). In vivo Antioxidant Effect of Green Tea. *European journal of Clinical Nutrition*, **54**:527-529.
- SUR, P., CHAUDHURI, T., VEDASIROMONI, J.R., GOMES, A., GANGULY, D.K.(2001). Antiinflammatory and Antioxidant Property of Saponins of Tea Root Extracts. *Phytotherapy Research*, **15**:174-176.
- TAGURI, T., TANAKA, T., KOUNO, I.(2004). Antimicrobial Activity of 10 Different plant Polyphenols against Bacteria Causing Food-Borne Disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **27**:1965-1969.
- TAO, P.Z. (2002). Antimicrobial Activity of Tea Products. *Tea-Bioactivity and Therapeutic Potential*. Taylor&Fancis. London. Edited by Young-su Zhen p:169-192.
- TEREHARA,N., TEKADA, Y., NESUMI,A., HONDA,T.(2001). Anthocyanins from red flower tea (Benibana-cha), *Camellia sinensis*. *Phytochemistry*, **56**: 359-361.
- THORNE RESEARCH (2000). Monograph-Green Tea. *Alternative Medicine Review*, **5**:372-375.
- TUZLACI, E.(2006). Şifa Niyetine- Türkiye'nin Bitkisel Halk İlaçları- Alfa Basım Yayım Dağıtım Ltd.Şti. İstanbul. p:59.
- UESATO, S., KITAGAWA, Y., KAMISHIMOTO, M., KUMAGAI, A., HORI, H., NAGASAWA,H.(2001). Inhibition of Green Tea Catechins Against the Growth of Cancerous Human Colon and Hepatic Epithelial Cells. *Cancer Letters*, **170**:41-44.
- VINSON, J.A. (2000). Black and Green Tea and Heart Disease: A Review. *Biofactors*, **13**: 127-132.
- WANG, H. and HELLIWELL, K. (2001). Determination of flavonols in green tea and Black Tea Leaves and Green Tea Infusions by High Performance Liquid Chromatography. *Food Research International*, **34**: 223-227.

- WANG, H., HELLIWELL, K., YOU, X.(2000). Isocratic elution system for determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chemistry*, **68**:115-121.
- WANG, H.F., TSAI,Y.S., LIN, M.L., OU, A.S.(2006). Comparison of Bioactive components in GABA tea and Green tea produced in Taiwan. *Food Chemistry*, **96**: 648-653.
- WEI, Q.Y., ZHOU, B., CAI, Y.J., YANG, L., LIU, Z.L. (2006). Synergistic effect of Green Tea Polyphenols with on Free Radical-Induced Oxidative DNA Damage. *Food Chemistry*, **96**: 90-95.
- WEISS, D.J., AUSTRIA,E.J., ANDERTON, C.R., HOMPESCH, R., JANDER,A.(2006).analysis of Green tea Extract Dietary Supplements by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1117**: 103-108.
- WEISBURGER, J.H.(1997). Tea and health: a historical perspective. *Cancer Letters*, **114**:315-317.
- WEISBURGER, J.H., RIVENSON,A., GARR, K., ALIGA, C.(1997). Tea or Tea and Milk, Inhibit Mammary Gland and Colon Carcinogenesis in Rats. *Cancer Letters*, **114**:323-327.
- WEISBURGER, J.H. & CHUNG, F.L.(2002). Mechanisms of Chronic Disease Causation by Nutritional Factors and tobacco Products and Their prevention by Tea Polyphenols-Review. *Food and Chemical Toxicology*, **40**:1145-1154.
- WHEELER, D.S. and WHEELER, W.J.(2004). The Medicinal Chemistry of Tea. *Drug Development Research*, **61**:45-65.
- WIKIPEDIA. (2006).Wikipedia. Dandelion Botany.
Erişim:[<http://en.wikipedia.org/wiki>].Erişim tarihi:14.10.2006.
- WILLIAMSON, C.(2005). Tea Drinking Prevents Memory Loss?.*Nutrition Bulletin*, **30**:2-5.
- WINKEL-SHIRLEY, B. (2001). Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnology. *Plant Physiology*, **126**:485-493.
- WISEMAN, H., PLITZANOPOULOU, P., O'REILLY, J. (1996). Antioxidant Properties of Ethanolic and Aqueous Extracts of Green Tea Compared to Black Tea. *Biochemical Society Transactions*, **24**:390S.
- YAM, T.S., SHAH, S., HAMILTON-MILLER, J.M.T.(1997). Microbiological Activity of Whole and Fractioned Crude Extracts of Tea and of Tea Components. *FEMS Microbiological Letters*, **152**: 169-174.
- YAMAGUCHI, K. and SHIBAMOTO, T.(1981). Volatile Constituents of Green Teai Gyokuro. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, **29**:366-370.

- YAMAMOTO, T., JUNEJA L.R, CHU D., KIM M. (1997). *Chemistry and Applications of Green tea*. CRC Press. New York p:1.
- YAMAGUCHI, K., HONDA, M., IKAGAI, H., HARA, Y., SHIMAMURA, T. [2002]. Inhibitory Effects of (-)-Epigallocatechin Gallate on the Life Cycle of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1). *Antiviral Research*, **53**:19-34.
- YANAGIDA, A., SHOJI, A., SHIBUSAWA, Y., SHINDO, H., TAGASHIRA, M., IKEDA, M., ITO, Y. (2006). Analytical Separation of Tea Catechins and Food-Related Polyphenols by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1112**:195-201.
- YANAGIMOTO, K., OCHI, H., LEE, K.G., SHIBAMOTO, T. (2003). Antioxidative Activities of Volatile Extracts from Green Tea, Oolong Tea and Black Tea. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **51**:7396-7401.
- YANG, T.T.C. and KOO, M.W.L. (1997). Hypcholesterolemic Effects of Chinese Tea. *Pharmacological Research*, **35**:505-512.
- YANG, T.T.C. and KOO, M.W.L. (2000). Chinese Green Tea Lowers Cholesterol Level Through an Increase in Fecal Lipid Excretion. *Life Science*, **66**:411-423.
- YANG, C.S., PRABHU, S., LANDAU, J. (2001). Prevention of Carcinogenesis by Tea Polyphenols. *Drug Metabolism Reviews*, **33**: 237-253.
- YAO, L., JIANG, Y., DATTA, N., SINGANUSONG, R., LIU, X., DUAN, J., RAYMONT, K., LISLE, A., XU, Y. (2004). HPLC Analyses of Flavanols and Phenolic Acids in the Fresh Young Shoots of Tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chemistry*, **84**:253-263.
- YAO, L., LIU, X., JIANG, Y., CAFFIN, N., D'ARCY, B., SINGANUSONG, R., DATTA, N., XU, Y. (2006). Compositional Analysis of Teas from Australian Supermarkets. *Food Chemistry*, **94**:115-122.
- YOSHIKAWA, M., MORIKAWA, T., LI, N., NAGATOMO, A., LI, X., MATSUDA, H. (2005). Bioactive Saponins and Glycosides. XXIII. Triterpene Saponins with Gastroprotective Effect from the Seeds of *Camellia sinensis*-Theasaponins E₃, E₄, E₅, E₆ and E₇. *Chemistry of Pharmaceutical Bulletin*, **53**:1559-1564.
- ZAVERI, N.T. (2006). Green Tea and Its polyphenolic Catechins: Medicinal Uses in Cancer and Noncancer Applications. *Life Science*, **78**:2073-2080.
- ZUO, Y., CHEN, H., DENG, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, oolong, black and pu-erh teas using HPLC with photodiode array detector. *Talanta*, **57**:307-316.

ÖZGEÇMİŞ

SOYADI ADI AĞCA CAN Aslı
DOĞUM YERİ, YILI Ankara, 1975

EĞİTİM

2000- **ANKARA ÜNİVERSİTESİ**
 Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı
 Doktora Programı

1997-2000 **ANKARA ÜNİVERSİTESİ**
 Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı
 Tezli Yüksek Lisans Programı

1993-1997 **ANKARA ÜNİVERSİTESİ**
 Eczacılık Fakültesi
 Derece: 73.03/100

1986-1993 **TED ANKARA KOLEJİ**

KATILDIĞI KONGRELER

1.20-22 Mayıs 1998, 12. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Hacettepe Üniversitesi, **ANKARA**.

“Composition of The Essential Oil of Salvia pomifera L. from Anatolica.”

Engin Şarer, Aslıhan Beyan, Aslı Can, Elif Şentürk

2.31 Ağustos- 4 Eylül 1998, 46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, **VIYANA**.

“Composition of Essential Oils of Two Endemic Salvia Species from Turkey”

Engin Şarer, Aslıhan Beyan, Aslı Can

3.26-30 Temmuz 1999, 2000 Years of Natural Product Research- Past, Present and Future” **AMSTERDAM**

“The Investigation on The Essential Oils of Some Lamiaceae Species”

Engin Şarer, A.Alper Şahin, Aslı Can, Nurten Altanlar

4.16-19 Eylül 2000 6th European Congress of Pharmaceutical Sciences
BUDAPEŞTE

“The Investigation on the Volatile oil of *Vitex agnus-castus* L. and Its Antimicrobial Activity”

Engin Şarer, Aslı Can Ağca, Nurten Altanlar

5.6-9 Ekim 2004 XV. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı **ANTALYA**

“*Vitex agnus-castus* (L.) Bitkisinin Uçucu Yağının Kimyasal Kompozisyonu”

Engin Şarer, Aslı Can Ağca

6.25-29 Ekim 2004 Second Global Summit on Medicinal and Aromatic Plants **NEW DELHI**

“Investigations on Volatile Oils of Summer Cultures from *Coriandrum sativum* L.”

Engin Şarer, Aslı Can Ağca, Neşet Aslan

7.13-16 Haziran 2006 8th International Symposium on Pharmaceutical Sciences **ANKARA**

“The Caffeine Content in Both Green Tea and Black Tea Manufactured from *Camellia sinensis* grown in Anatolia”

Engin Şarer, Aslı Can Ağca

8.10-13 Eylül 2006 37th International Symposium on Essential Oils **GRASSE**

“The Essential Oil Composition of *Salvia vermifolia* from Turkey”

Engin Şarer, Aslı Can Ağca

KATILDIĞI ÇALIŞTAYLAR

1. 1 Eylül 1998 WORKSHOP I, Viyana, AVUSTURYA

Prof. Dr. Ch. Franz, Viyana, AVUSTURYA

“Plant Protection Products: Use and Residues in Medicinal Plants”

H.Sammer, Ommen, ALMANYA

“Why Pesticides and Herbicides in Medicinal Plants”

Dr. B. Steinhoff, Bonn, ALMANYA

“Plant Protection Products and Their Legal Requirements”

Prof.Dr. H.Schilcer, Münih, ALMANYA

“Official, Routine and More Sophisticated Methods for the Determination of Pesticide- Residues in Medicinal Plants ?”

Dr. L. Kabelitz, Vestenbergsgreuth, ALMANYA

“Heavy Metals in Herbal Medicinal Products”

2. 3 Eylül 1998 WORKSHOP III, Viyana, , AVUSTURYA

Prof. Dr. H. Winterhoff, Münster, ALMANYA

“Herbal Medicinal Products for Treatment of BPH”

Dr. L. Konrad, Marburg, , ALMANYA

“Invitro Studies of Plant Extracts on Epithelial and Stromal Cells of The Human Prostate”

Dr. J.J. Lichius, Marburg, , ALMANYA

“Invivo Studies of Plant Extracts on Experimentally Induced Mouse Prostatic Hyperplasia”

C. Muth, Marburg, , ALMANYA

“Invivo Studies on Spontaneously Occuring Non-Bacterial Prostatics in Old Rats”

YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI

Vitex agnus-castus L. Bitkisinin Uçucu Yağının Kimyasal Kompozisyonu ve Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması

SEMİNER ÇALIŞMASI

1. *Trigonella foenum- graecum* L.’un Etkili Bileşikleri ve Eczacılık Alanında Kullanımı

2. *Passiflora incarnata* L.Bitkisi ve Biyolojik Aktivitesi

3. *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze Bitkisi ve Farmakolojik Etkileri

4. Bitki büyüme Oranındaki Değişimlerin Tayininde Yaprak Gelişiminin Rolü

KATILDIĞI PROJELER

“Seçilmiş Kişniş (*Coriandrum sativum* L.) Hatlarında Yazlık ve Kışlık Ekimin Ürün Kalitesine Etkisi” Proje No: 2000-08-03-015 Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri.