

SİYAH VE YEŞİL ÇAYLARDAKİ FENOLİK BİLEŞİKLERİN KARAKTERİZASYONU VE ANTİOKSİDAN KAPASİTE POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Haşim KELEBEK¹, Sevgin DIBLAN¹, Pınar KADİROĞLU¹,
Onur SEVİNDİK², Serkan SELLİ²

¹ Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

² Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

1. Giriş

1

Çay (*Camellia sinensis* L.), sudan sonra dünyadaki en çok tüketilen içecektir ve içerdiği biyoaktif bileşenler, tadı ve aroması ile son derece değerlidir.

2

Siyah, yeşil ve beyaz gibi çeşitleri bulunan çay, zengin fenolik içeriği ile fonksiyonel olarak adlandırılan gıdaların başında gelmektedir

3

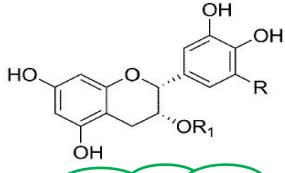
- (i) kolesterol düzenleyici,
- (ii) kardiyovasküler problemleri azaltıcı,
- (iii) reaktif oksijen bağlayıcı,
- (iv) tümör-nekroz ve interleukin gibi rahatsızlıkları engelleyici,
- (v) lenfositlerdeki DNA bozulmalarına ve
- (vi) kansere karşı birçok önleyici etkilere sahiptir



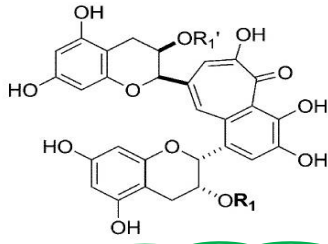
1 (Peluso & Serafini, 2017; Tang et al., 2015)

2 (Hajiaghaalipour, Sanusi, & Kanthimathi, 2016; Pelvan & Özilgen, 2017; Shannon, Jaiswal, & Abu-Ghannam, 2018; Šilarová, Česlová, & Meloun, 2017)

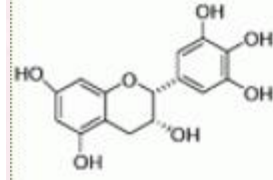
3 (Pereira-Caro et al., 2017).



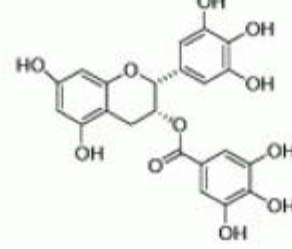
Çay yapraklarındaki
kateşin bileşikleri



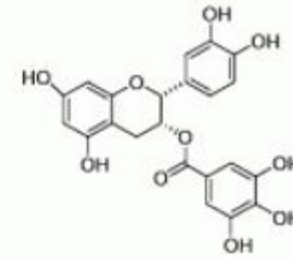
Theaflavin bileşikleri



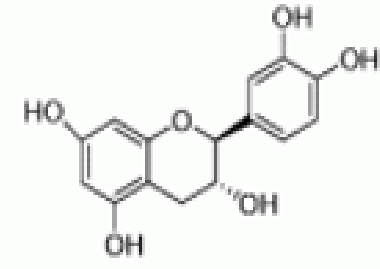
(-)-epigallocatechin



(-)-epigallocatechin gallate



(-)-epicatechin gallate



(-)-catechin

- Çayın içerdiği polifenollerin sağladığı antioksidan ve antiinflamatuvar etki, insan plazma örneklerinde, çay tüketimi sonrasında enzimatik olmayan antioksidan aktivitenin artışıyla saptanmıştır.
- Çayda en yüksek miktarda bulunan polifenol grubu; kateşinler ve theaflavinlerdir.
- Kateşinler içerisinde ise epikateşin (EC), epikateşin gallat (ECG), epigallokateşin (EGC) ve epigallokateşin gallat (EGCG) en önemli çay kateşinleri olarak değerlendirilmektedir.
- Epigallokateşin gallat ve epikateşin gallat formları siyah çayda bulunan toplam kateşin miktarının %27'sini oluşturmaktadır (Serpen et al., 2012).



- Çayın içerdiği fenolik madde miktarı başta çayın çeşidi olmak üzere, demleme süre ve sıcaklığına bağlı olarak değişebilmektedir.
- Örneğin son zamanlarda Tayvan'da popüler olan yöntemde çay, çay yapraklarının soğuk (4°C) veya oda sıcaklığındaki suda 2 saat süre bekletilmesi ile elde edilmektedir.
- Yine de tüm çay çeşitleri için en fazla tercih edilen içim şekli, çay yaprağının 1-10 dakika süre ile 70-100°C sıcaklıktaki suda bekletilerek tüketilmesidir.

(Hajiaghaalipour et al., 2016)





Çay çeşitleri arasında beyaz ve yeşil çay fermente olmamış özellikte iken, oolong yarı fermente ve siyah çay fermente edilerek üretilmektedir.

Bu nedenle, bu çay çeşitleri birbirlerinden görünüş, tat, kimyasal özellikleri bakımından farklılık göstermektedir.

(Chauhan, Bhattacharya, AlDhubaib, & Ahmed, 2012; Morikawa et al., 2013)

Yapılan araştırmalar sonucunda;

siyah çayın demlenmesinde kısa süre yüksek derece önerilirken, **yeşil çayda** ise uzun süre soğuk demleme önerilmektedir.

Yeşil çay

Beyaz çay

Oolong

Siyah çay

Fermente olmamış

Yarı fermente

Tam fermente

EN ÇOK TERCİH EDİLEN

Dünyada üretilen ve tüketilen toplam çay miktarının

- % 78'i siyah,
- % 20'si yeşil,
- % 2'si ise oolong çaydır.

Siyah çay Batı ülkelerinde ve bazı Asya ülkelerinde tüketilirken, **yeşil çay** Hindistan, Çin, Japonya ve Kuzey Afrika ve Orta Doğu'nun bazı ülkesinde tüketilmektedir.



Yapılan çalışmalarda siyah çayın fenolik madde içeriğinin yeşil çaydan daha düşük olduğu bildirilmiştir.



Siyah çaydaki fenolik madde içeriğinin yeşil çaya göre düşük olmasının sebebi ise, siyah çayın **fermentasyonu** sırasında görülen **polifenol oksidaz** enzimi aktivitesi neticesinde, çayın içerdiği **flavan-3-ol**'leri theaflavins veya thearubigin gibi yüksek molekül ağırlıklı kompleks yapılara polimerize olmalarıyla açıklanmaktadır.

(Pereira-Caro et al., 2017).



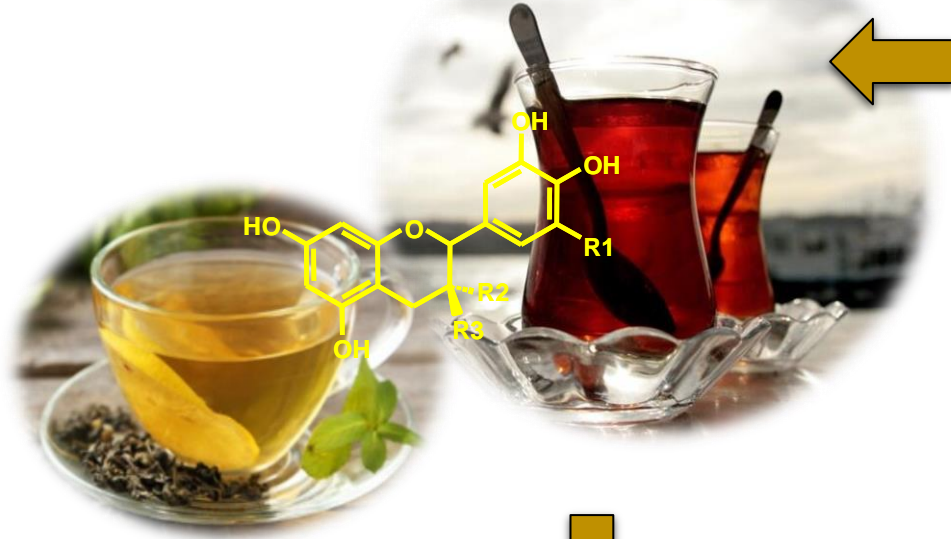
Bu çalışmada, ülkemizde tüketilen siyah ve yeşil çayların fenolik bileşik içerikleri hem spektrofotmetrik hem de **LC-DAD-ESI-MS/MS** tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

Ayrıca ay örnekleri arasındaki antioksidan kapasite potansiyelleri **DPPH** ve **ABTS** yöntemleri ile karşılaştırılmıştır.



2. Materyal & Metot

Çayların hazırlanması



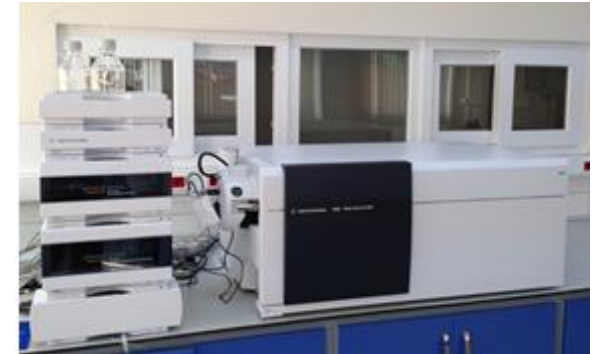
~ 100°C / 12 dk.

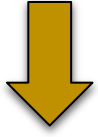


2 gr Siyah çay (Trebolu) /
2 gr Yeşil çay (Kardelen)



Oda sıcaklığı 24°C





LC-DAD-ESI-MS/MS ANALİZLERİ



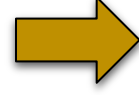
Fenolik bileşiklerin tanımlanmasında LC-DAD-ESI-MS/MS analizlerinde **standart maddelerin** enjeksiyonuyla elde edilen **alınma zamanlarından, DAD ve MS/MS spektrumlarından** yararlanılmıştır.

Bileşiklerin tanımlanması LC-MS/MS kullanılarak pozitif ve negatif modda gerçekleştirilmiştir.

Pozitif modda teobromine ve kafein,

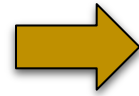
Negatif modda kateşinler, kuinik asit esterleri, ve flavonoller tanımlanmıştır.

RENK ANALİZLERİ



Örneklerin renk analizleri **Hunter LAB** cihazında yapılmış ve L^* , a^* ve b^* değerleri belirlenmiştir.

TOPLAM FENOL ve ANTIOKSİDAN KAPASİTESİ



Yapılan çalışmada çay örneklerinin toplam fenol içerikleri Gallik asit cinsinden belirlenmiştir.

Antioksidan aktivite **DPPH** ve **ABTS** olmak üzere iki farklı yöntemle belirlenmiştir.

Bu yöntemlerde UV-Vis (Agilent –Cary 60) spektrofotometresi kullanılmış ve ölçülen absorbans değerleri mmol/L trolox cinsinden bildirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

1. RENK DEĞERLERİ

	L*	a*	b*	C	h
Siyah çay	89,20±1,19	-7,11±1,01	44,24±0,02	44,80±0,52	99,13±0,21
Yeşil çay	67,65±1,13	20,43±1,04	72,55±0,01	75,37±0,21	74,28±0,41

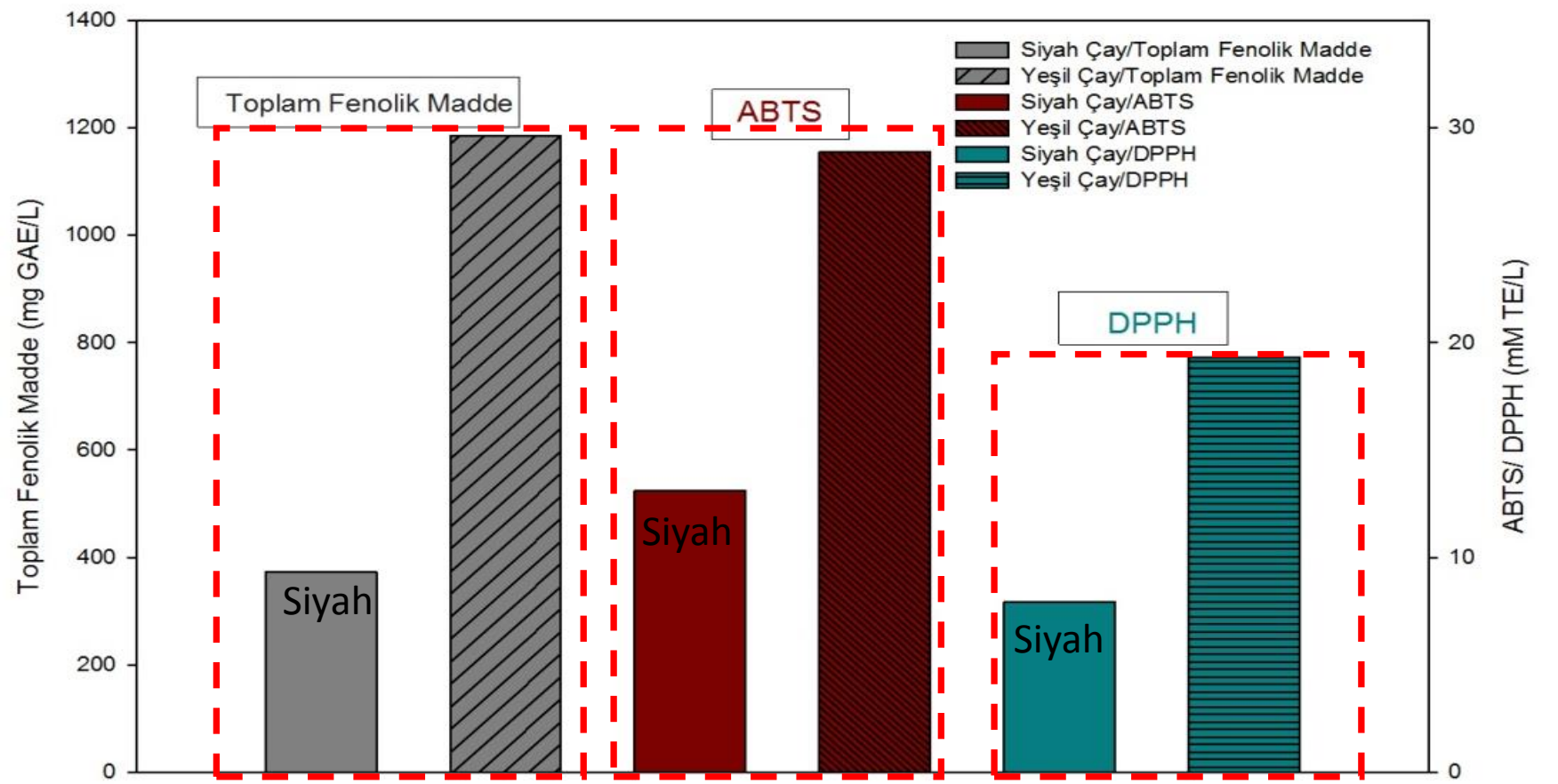


Siyah çayın sahip olduğu koyu rengin, demleme sırasında meydana gelen yüksek molekül ağırlıklı polifenolik bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yeşil çayın b* değerinin yüksek olması ise, sarımsı-turuncu renge sahip flavonollerin yeşil çayda yüksek olarak bulunmasından kaynaklanmaktadır.



2. TOPLAM FENOLİK M. ve ANTIOKSİDAN KAPASİTESİ



Elde edilen sonuçlara göre, çayların toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan kapasite potansiyelleri her iki çayda da orantılı olarak farklılıklar göstermiştir.

Mevcut literatürde de belirtildiği üzere, yeşil çayın fenolik içeriği ve buna bağlı olarak da antioksidan kapasitesi siyah çaya oranla daha yüksektir (Atoui, Mansouri, Boskou, & Kefalas, 2005).

3. SİYAH VE YEŞİL ÇAYLARIN FENOLİK PROFİLLERİ

Bu çalışmada **LC-DAD-ESI-MS/MS** tekniği kullanılarak siyah ve yeşil çaylarda

- gallik asit ve türevleri (2 adet),
- kateşinler (6 adet),
- kuinik asit esterleri (3 adet),
- flavonoller (16 adet),
- teaflavinler (2 adet), ve
- purin alkaloid türevleri (2 adet)

toplam **31 adet** fenolik bileşik tespit edilmiştir.

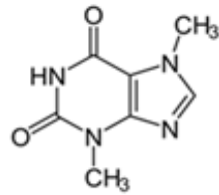
Yeşil çayda tespit edilen fenolik gruplardan **kateşinler, kuinik asit esterleri, purin alkaloidler ve flavanoller** siyah çaya göre daha yüksek miktarlarda bulunmuştur.

Öte yandan siyah çayın ise yeşil çaya göre daha yüksek konsantrasyonlarda **gallik asit ve türevleri, teaflavin ve türevlerini** içerdiği gözlemlenmiştir.



Peak	Rt (dak)	Bileşikler	Formüller	UV max (nm)	^a [M-H] ⁺ / ^b [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)
1	16.61	Gallik asit	C ₇ H ₆ O ₅	270	169 ^a	125
2	17.01	5-O-Gallo kuinik asit	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	274	343 ^a	191,169
3	20.63	Theobromin	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	272	181^b	138, 108
4	23.50	(-)-Gallokateşin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	275	305 ^a	261, 221, 219, 179
5	26.23	(-)-Epigallokateşin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	275	305 ^a	261, 221, 219, 179
6	29.49	3- p- Kumarilkuinik asit	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	325	337 ^a	163
7	30.04	Kafein	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	280	195^b	138, 110
8	30.53	(+)-Kateşin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	280	289 ^a	245,205
9	31.28	5-Kaffeil kuinik asit	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	326	353 ^a	191, 179, 135
10	36.32	(-)-Epikateşin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	270	289 ^a	245, 205, 179
11	38.07	4- p-Kumarilkuinik asit	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	325	337 ^a	173, 155, 111
12	38.13	(-)-Epigallokateşin-3-gallat	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	275	457 ^a	305, 169, 125
13	38.82	Theaflavin	C ₂₉ H ₂₄ O ₁₂	457	563 ^a	545, 527, 519, 501, 407, 379
14	40.12	4''-O-Glukozilviteksin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	328	593 ^a	413, 293
15	40.93	Kuersetin-3-O-galaktozil-ramnozil-glukozit	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	353	771 ^a	609, 463, 301
16	41.41	Kuersetin-3-O-glukozil-ramnozil-glukozit	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	353	771 ^a	609, 463, 301
17	41.89	Rhamnosylviteksin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	326	577 ^a	413, 293
18	42.13	2''-O-Rhamnosylviteksin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	328	577 ^a	457, 413, 293
19	42.76	Kuersetin-3-O-rutinozit	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	358	609 ^a	301, 300, 255, 179, 151
20	43.51	(-)-Epikateşin-3-gallat	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	280	441 ^a	289, 169
21	43.64	Kaempferol-3-O-glukozil-ramnozil-glukozit	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	353	755 ^a	593, 447, 285
22	44.38	Kuersetin -3-O-galaktozit	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	353	463 ^a	301 , 300, 179
23	44.64	Kuersetin-3-O-glukozit	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	356	463 ^a	301, 300, 255, 179
24	46.08	Kaempferol -3-O-galaktozit	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	348	447 ^a	285 , 284
25	46.23	Kaempferol-3-O-rutinozit	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	346	593 ^a	285, 447
26	47.01	Kaempferol-3-O-glukozit	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	348	447 ^a	285, 284, 255, 227
27	48.13	Kuersetin-3-O-glukozit- ramnozil-(p-coumaroyl-hexosyl)-hexoside	C ₄₈ H ₅₅ O ₂₈	353	1079 ^a	933, 915, 301
28	49.11	Kuersetin-3-(2G-p-coum-trans-3G)-2G-arabinosyl-3R-glucosylrut	C ₄₇ H ₅₄ O ₂₇	353	1049 ^a	903, 301
29	50.51	Kuersetin -3-(2G-p-coum-trans-3G)-2G-arabinosyl-3R-rutinozit	C ₄₇ H ₅₄ O ₂₆	353	1033 ^a	887, 301
30	51.13	Kaempferol-3-(2G-p-coum-cis-3G)-2G-arabinosyl-3R-glukozil-rutinozit	C ₄₇ H ₅₄ O ₂₆	353	1033 ^a	887, 285
31	52.60	Theaflavin-3-gallat	C ₃₆ H ₂₈ O ₁₆	450	715 ^a	563, 545, 527, 501, 407

Theobromin



181

181.0000

138

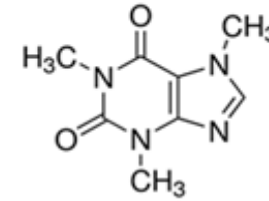
138.0000

109.0000

251.9000

384.1000

Kafein

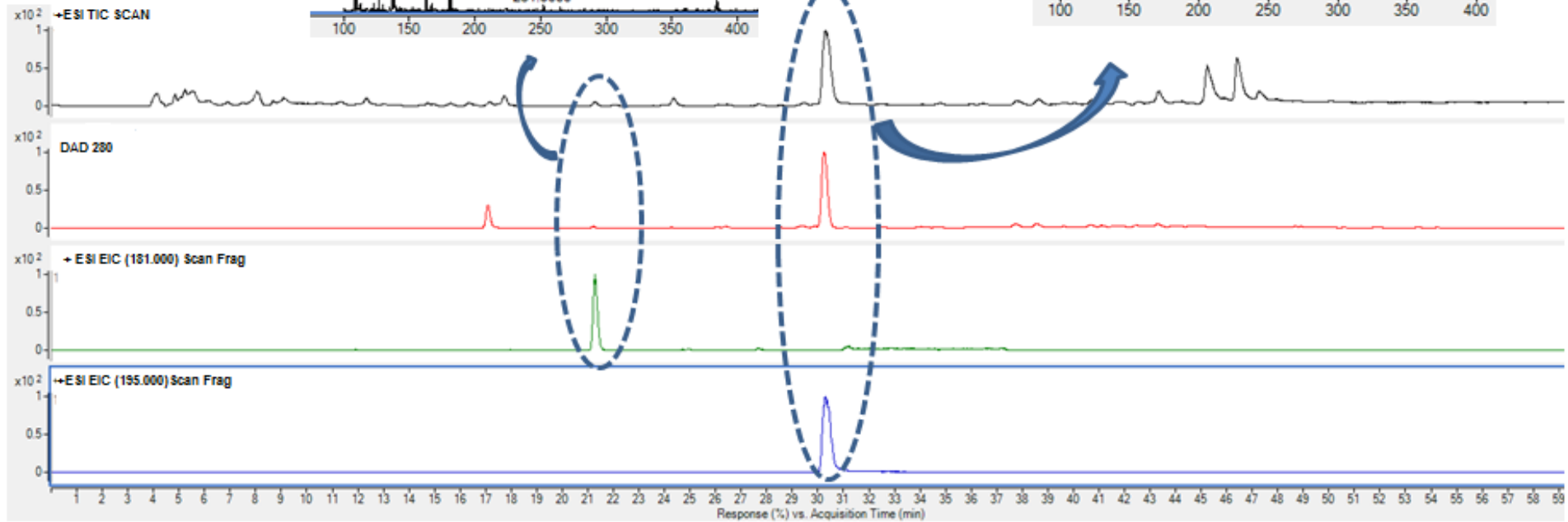


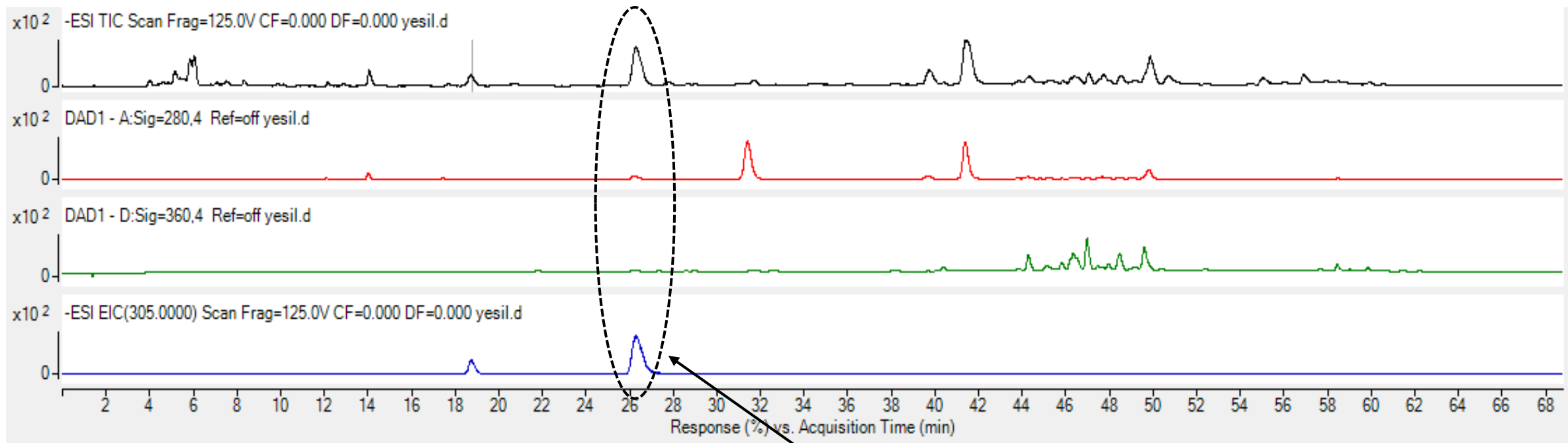
195

195.1000

138

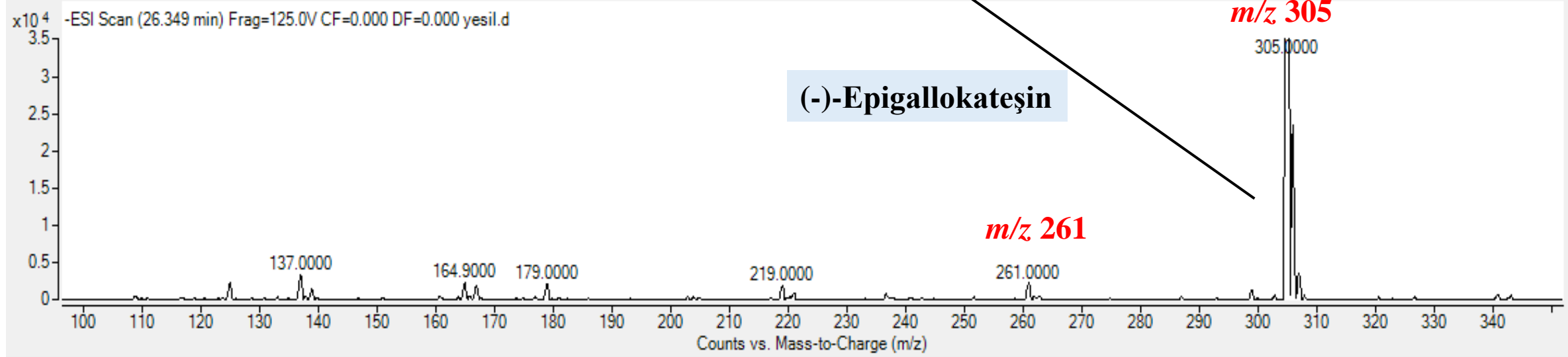
138.0000

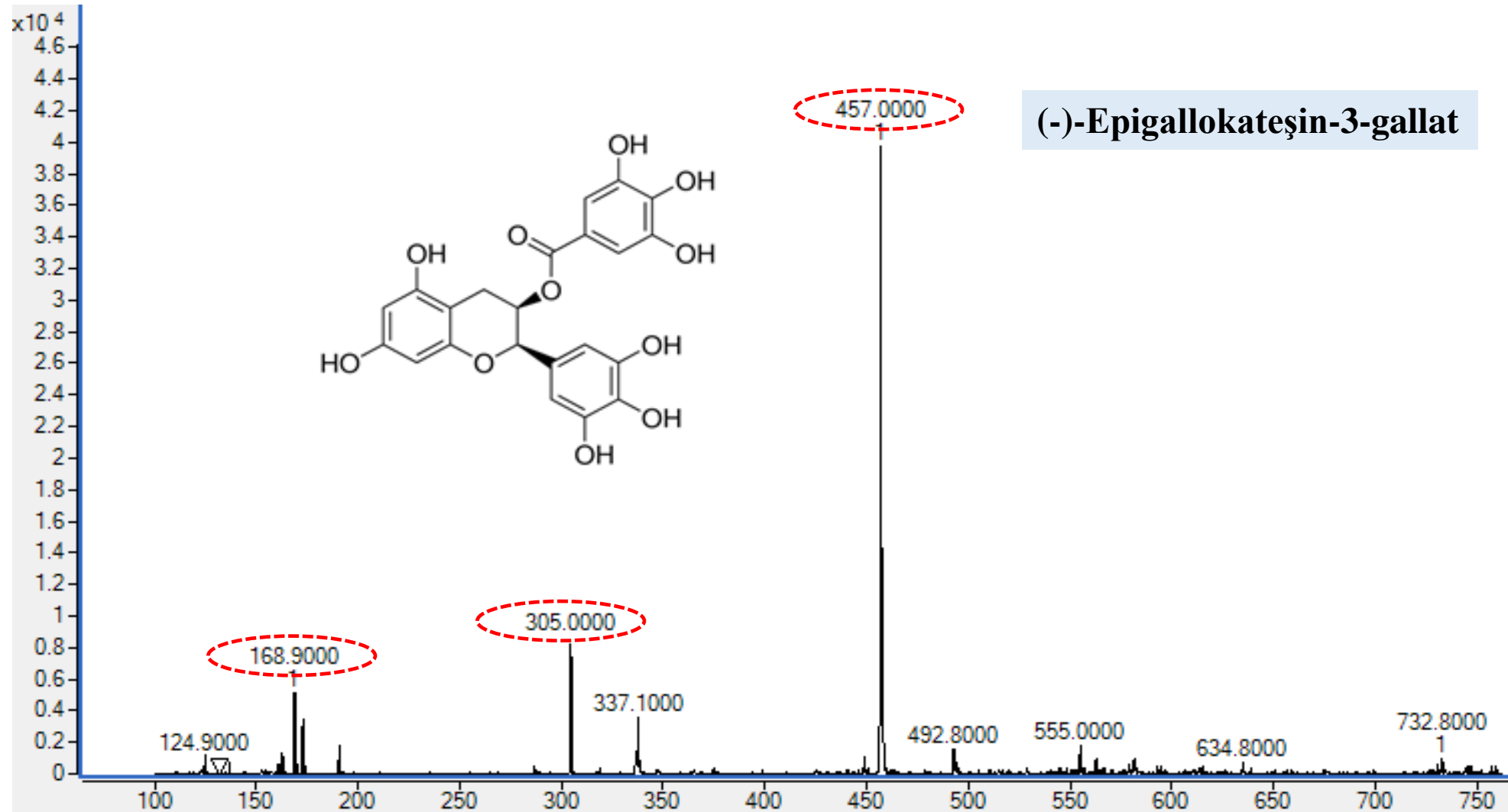




Chromatogram Results | Spectrum Identification Results

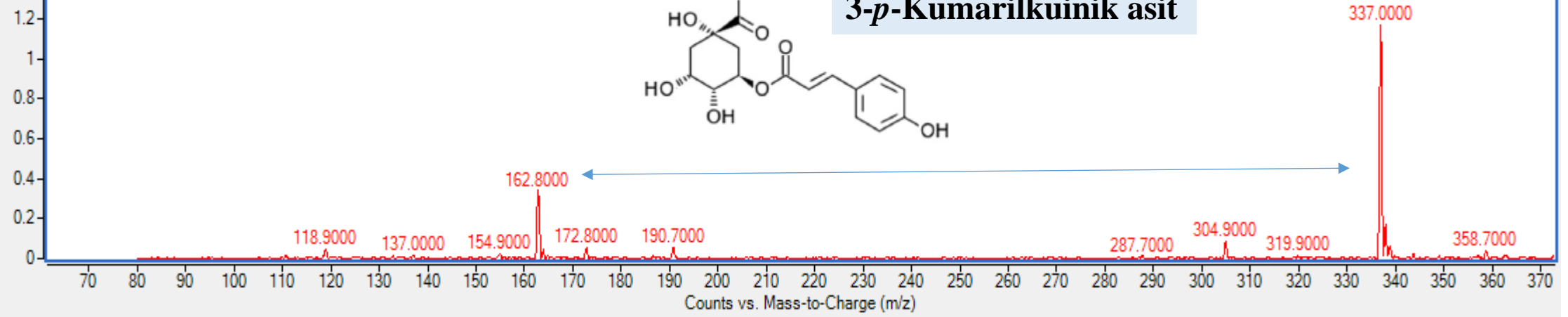
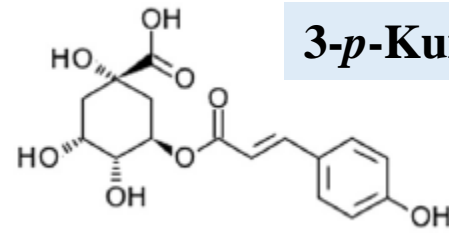
MS Spectrum Results





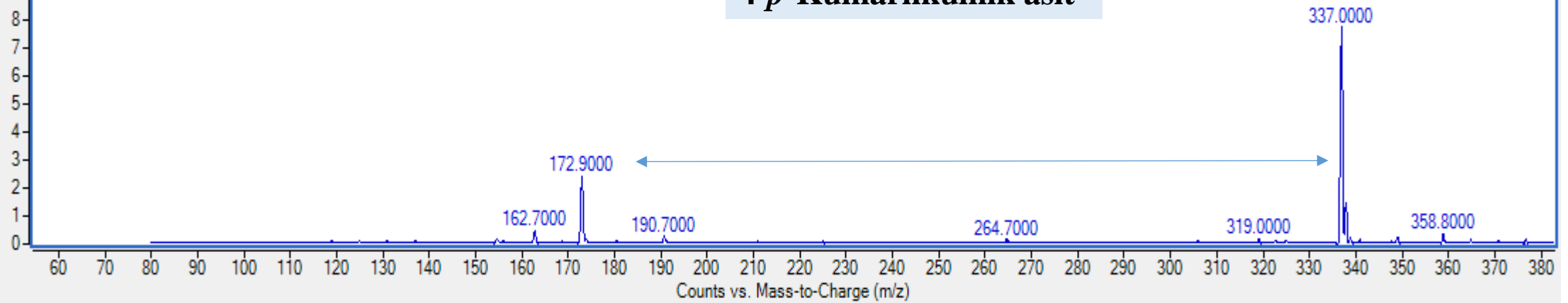
(-)-Epigallocatechin-3-gallat

x10⁴ -ESI Scan (28.980 min) Frag=125.0V CF=0.000 DF=0.000 yesil.d

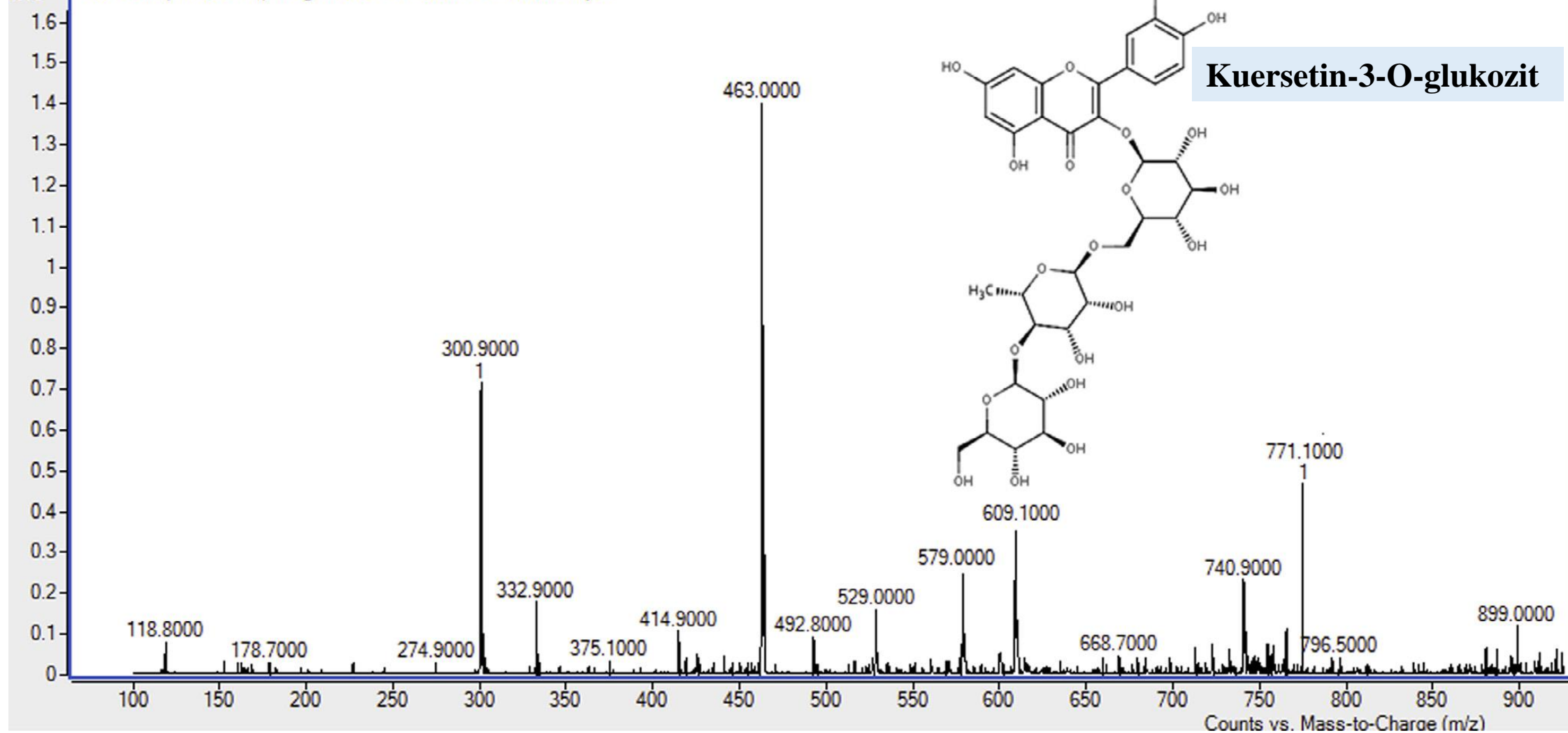


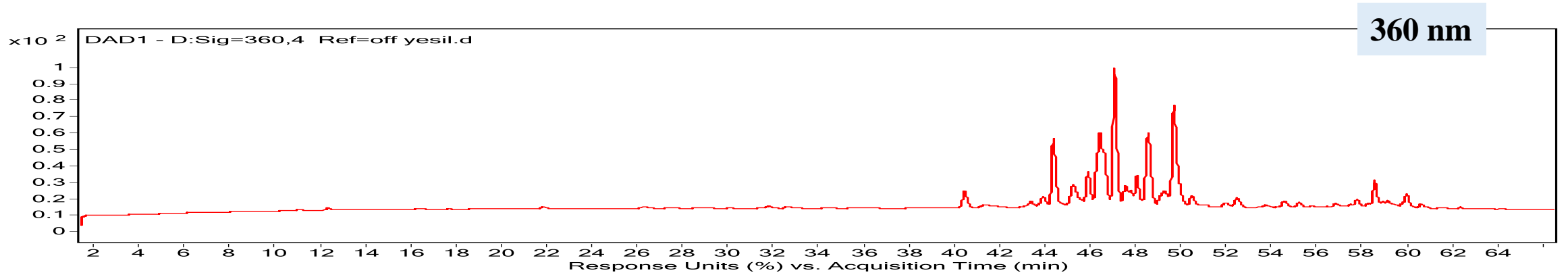
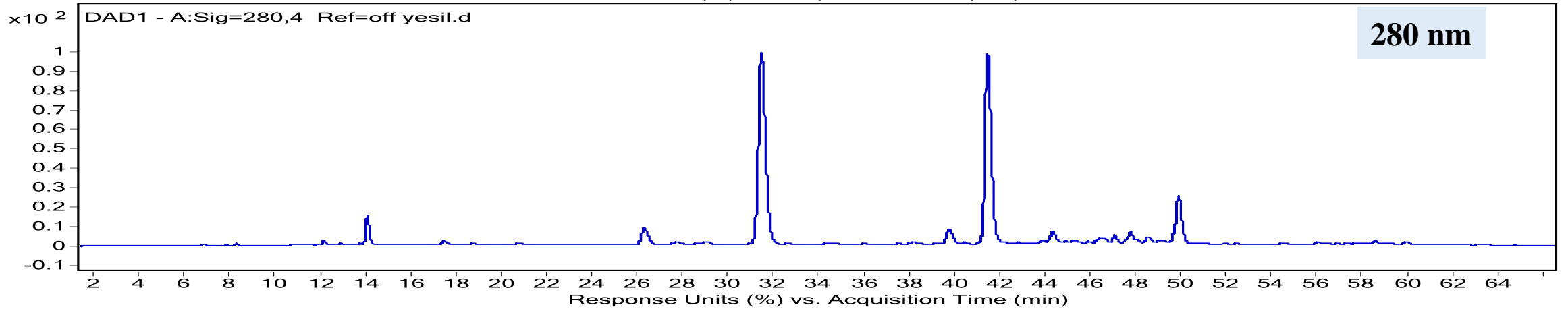
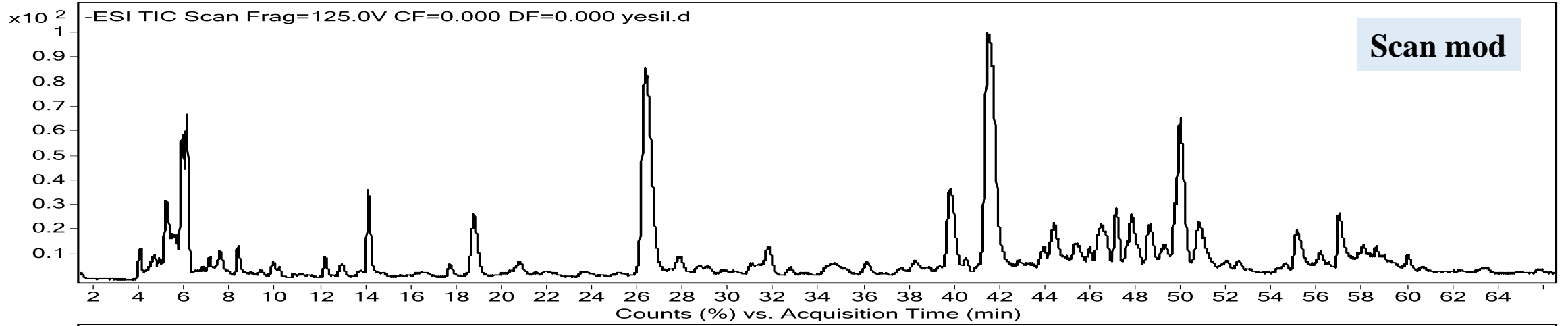
x10³ -ESI Scan (38.275 min) Frag=125.0V CF=0.000 DF=0.000 yesil.d

4-*p*-Kumarilkuinik asit



x10⁴ -ESI Scan (44.062 min) Frag=135.0V CF=0.000 DF=0.000 Cay.d

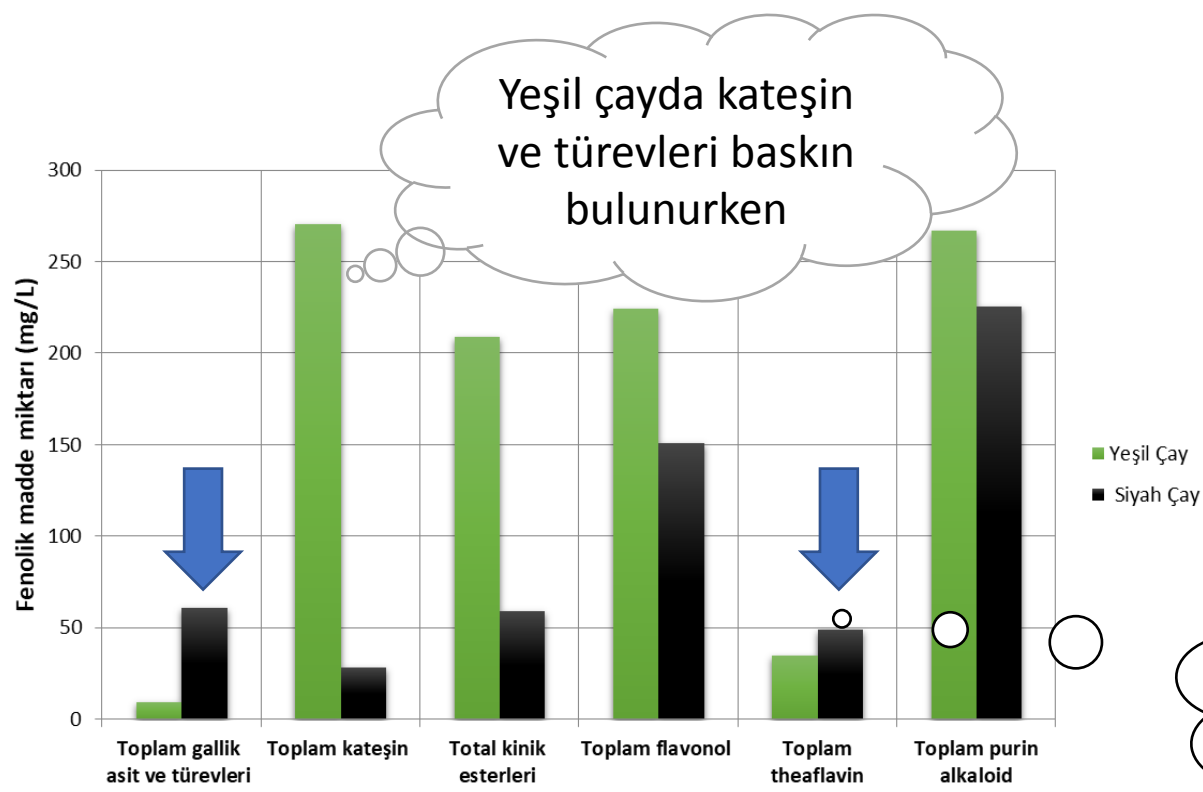




Pik	Bileşikler	Yeşil Çay	Siyah Çay
1	Gallik asit	8,30±1,24	59,35±3,41
2	5-Galloyl kuinik asit	0,87±0,14	1,20±0,08
	<i>Toplam gallik asit ve türevleri</i>	<i>9,17±1,37</i>	<i>60,56±3,36</i>
4	(-)-Gallokateşin	16,92±1,56	2,62±0,24
5	(-)-Epigallokateşin	82,92±7,63 ←-----→	6,91±0,64
8	(+)-Kateşin	35,07±7,43	0,88±0,19
10	(-)-Epikateşin	53,47±1,73	1,09±0,14
12	(-)-Epigallokateşin-3-gallat	68,47±3,03 ←-----→	7,47±1,50
20	(-)-Epikateşin-gallat	13,54±1,25	8,96±1,80
	<i>Toplam kateşin</i>	<i>270,38±21,28</i>	<i>27,92±4,51</i>
6	3- <i>p</i> -Kumaril kuinik asit	58,64±4,66	13,57±1,04
9	5-Kaffeil kuinik asit	6,93±0,86	1,66±0,19
11	4- <i>p</i> -Kumaril kuinik asit	143,17±4,57	43,75±1,90
	<i>Toplam kuinik esterleri</i>	<i>208,75±9,28</i>	<i>58,97±3,10</i>

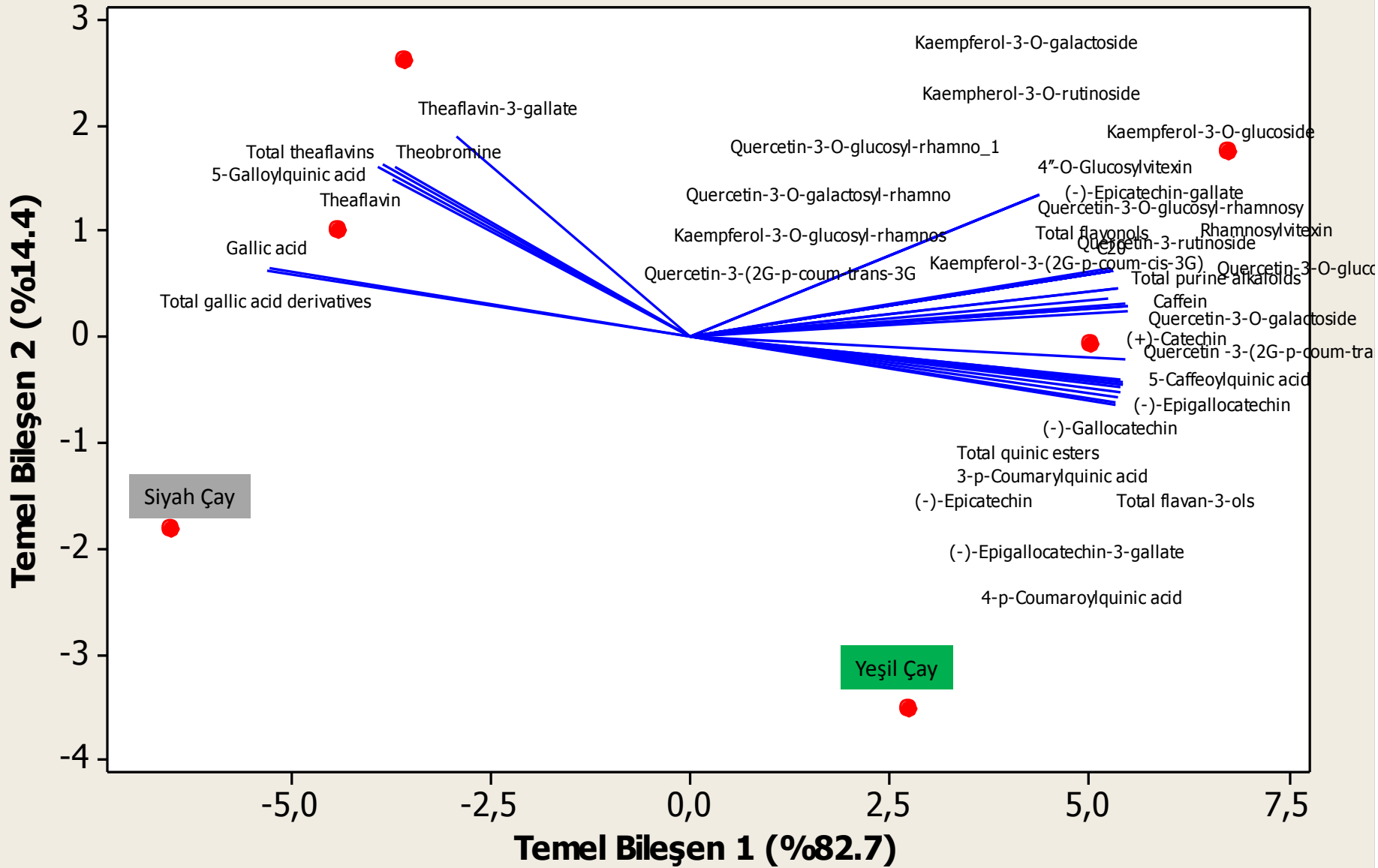
14	4''-O-Glukozilviteksin		8,15±1,00	5,55±1,06
15	Kuersetin-3-O-galaktozil-ramnozil-glukozit		29,69±3,63	20,21±3,84
16	Kuersetin-3-O-glukozil-ramnozil-glukozit		19,80±2,42	13,48±2,57
17	Ramnozilviteksin		13,36±1,64	9,09±1,73
18	2''-O- Ramnozilviteksin		17,81±2,18	12,13±2,31
19	Kuersetin-3-rutinoside		17,10±2,09	11,64±2,22
21	Kaempferol-3-O- glukozil-ramnozil-glukozit		41,56±5,08	28,29±5,39
22	Kuersetin-3-O-galaktozit		8,64±0,85	5,46±0,91
23	Kuersetin-3-O-glukozit		11,22±1,09	7,09±1,19
24	Kaempferol-3-O-galaktozit	16 adet	4,36±1,50	2,93±0,79
25	Kaempferol-3-O-rutinozit		7,30±2,52	4,90±1,33
26	Kaempferol-3-O-glukozit		5,84±2,02	3,92±1,06
27	Kuersetin-3-O-glucosyl-rhamnozil-(p-coumaroyl-hexosyl) heksosit		10,22±3,53	6,87±1,86
28	Kuersetin-3-(2G-p-coum-trans-3G)-2G-arabinosyl-3R-glukozilrutinozit		10,28±1,28	6,67±1,22
29	Kuersetin -3-(2G-p-coum-trans-3G)-2G-arabinosyl-3R-glukozilrutinozit		16,99±2,39	11,24±3,53
30	Kaempferol-3-(2G-p-coum-cis-3G)-2G-arabinosyl-3R-glukozilrutinozit		2,22±0,55	1,13±0,14
Toplam flavonol			224.54±29,37	150.59±30.63

Pik	Bileşikler	Yeşil Çay	Siyah Çay
13	Theaflavin	31,67±2,25	43,28±6,31
31	Theaflavin-3-gallat	3,26±1,50	5,41±0,73
	<i>Toplam theaflavin</i>	34,92±3,35	48,69±7,04
3	Theobromin	8,98±0,57	10,78±0,68
7	Kafein	257,81±12,09	214,84±10,08
	<i>Toplam purin alkaloid</i>	266,79±12,66	225,62±10,76



Siyah çayda teafllavinler yüksek miktarda bulunmuştur.


Siyah çayda, theaflavinler ve gallik asit türevleri hariç, diğer tüm fenolik grupları yeşil çaya göre düşük miktarda bulunmuştur.



Temel bileşen analizine göre temel bileşenler veri setindeki varyansın toplamda % 97.1'ini ve 1. temel bileşen toplam varyansın % 82.7'sini, 2. temel bileşen varyansın % 14.4'ünü açıklamaktadır.

4. Sonuçlar

Çalışmamızda;

- ✓ LC-DAD-ESI-MS/MS  yeşil ve siyah çayda **31** adet fenolik bileşik
- ✓ Yeşil aylardaki fenolik bileşen miktarlarınının, siyah çaya göre, daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Tespit edilen fenoliklerden yeşil çayda kateşinlerin, siyah çayda teaflavinlerin ve gallik asit türevlerinin baskın olduğu saptanmıştır.
- ✓ Ayrıca, ABTS ve DPPH antioksidan kapasite analiz sonuçlarına göre de yeşil çayın antioksidan etkinliğinin siyah aydan yüksek olduğu grlmştir.

- Bunun sebebinin, yeşil çayda, özellikle antioksidan potansiyelini doğrudan etkileyen, kateşin ve türevlerinin miktarının fazla olması ile ilgili olduğu düşünülmektedir.
- Siyah çayda görülen antioksidan potansiyelinde ve toplam fenolik bileşik miktarında görülen düşüklüğün yine üretim prosesinde bulunan fermentasyon (oksidasyon) aşamasında gerçekleştiği düşünülmektedir.



Dinlediğiniz
için teŖekkür ederim.

