



Araştırma Makalesi - Research Article

Çaydaki Kafein Miktarına Farklı Demleme ve Analiz Şartlarının Etkisi

Effect of Different Brewing and Analysis Conditions on Caffeine Content in Tea

Cemile Yerlikaya^{1*}

Geliş / Received: 05/01/2023

Revize / Revised: 03/04/2023

Kabul / Accepted: 13/04/2023

ÖZ

Kafein, önemli bir tarımsal ürün olan çayın en önemli bileşenidir. Kafein yaygın kullanımı nedeniyle büyük ticari değer taşımaktadır. Sinir sistemi üzerine uyarıcı etkiye sahip olan kafein, aşırı tüketildiğinde istenmeyen etkilerle neden olabilmektedir. Türkiye, Dünya çay üretiminde altıncı sıradadır fakat yıllık kişi başına çay tüketiminde birinci sırada yer almaktadır. Kafeinin ekonomik önemi ve ülkemizdeki çay tüketiminin fazla olması nedeniyle çayın kafein içeriğinin kesin olarak bilinmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada çayın kafein içeriği farklı demleme ve analiz şartları uygulanarak, UV-Vis spektrofotometre cihazı ile belirlenmiştir. Çay demleri hazırlanırken demlikte çay demleme yöntemi dikkate alınarak durgun şartlarda çalışılmış, üç farklı sıcaklıkta farklı demleme süresi, çay/su ve dem/kloroform oranı için yüzde kafein içerikleri bulunmuştur. Bu çalışmaya göre, çayda analiz edilen kafein değerleri demleme sıcaklığına çok bağlıdır. Düşük sıcaklıklarda kafeinin deme çekilmesi için uzun süre gerekmede, yüksek sıcaklıkta çay/su oranı artışı kafein değerini etkilemektedir. Kloroform üç farklı sıcaklık için yüksek hacimli demlerden bile kafeini ekstrakte edebilmektedir. Düşük LOD (0.338 mg/L) ve LOQ (1.025 mg/L) değerleri ile bu yöntem kafeinsiz kahve ya da çay ve bitki çayları için de uygundur.

Anahtar Kelimeler- *Camellia Sinensis, Çay Demi, Kafein, Kloroform*

ABSTRACT

Caffeine is the main component of tea that is important as an agricultural product. Caffeine has a great commercial value because of its different industrial applications. It has a stimulating effect on the nervous system and can cause undesirable effects when consumed excessively. Turkey is a significant producer of tea, ranking sixth in the world but has one of the world's highest per capita consumption levels. Due to the economic importance of caffeine and the health effects caused by high consumption level of tea, it is important to know the caffeine content of tea precisely. In this study, the caffeine content of the tea was determined by applying different brewing and analysis conditions with UV-Vis spectrophotometer. While preparing tea infusions, stagnant conditions were used by considering the brewing tea in the teapot and the percentage of caffeine contents were obtained by changing the brewing time, tea/water and infusion/chloroform ratio for three different temperatures. According to the results, the measured caffeine are highly dependent on brewing temperature. Brewing requires a long time at low temperatures and the increase in tea/water ratio at high temperature affects the caffeine percentage. Chloroform is capable of extracting the caffeine from tea infusions even at high volume of infusions and high temperature. Since

^{1*}Sorumlu yazar iletişimi: yerlikayace@itu.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0003-3023-7028>)

Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, İstanbul, Türkiye

it has low LOD (0.338 mg/L) and LOQ (1.025 mg/L) values, this method is also suitable for decaffeinated coffee or tea and herbal teas.

Keywords- *Camellia Sinensis, Tea Infusion, Caffeine, Chloroform*

I. GİRİŞ

Kafein 63 kadar bitkinin tohumu, meyvesi ve yapraklarında doğal olarak bulunan ksantin alkaloidlerindedir. Kafein özellikle kahve ve kakao çekirdeğinde, çay, mate (Paraguay çayı) yaprağında ve kola cevizinde bulunur [1,2]. Sinir, sindirim, kalp-damar, dolaşım ve solunum sistemi üzerine çok sayıda etkisi bulunmaktadır. Böbrek fonksiyonları ve kas-kemik sistemi de kafein tarafından etkilenmektedir [2,3]. Kafein merkezi sinir sistemi için güçlü bir uyarıcıdır ve yüksek miktarlarda alındığında sindirim sisteminde ciddi tahrişler ve istenmeyen etkiler meydana getirebilir. Kafein tıpta, dolaşım ve solunum sistemini uyarıcı olarak, diüretik etkisi nedeni ile ve beyin kan basıncı azalttığından baş ağrılarını geçirmek için kullanılmaktadır [2,4]. Günlük hayatımızda yiyecek, içecek ve ilaçlar yoluyla aldığımız kafeinin dozu, bu gıda ya da ilaçların tüketim miktarına ve içerdikleri kafein miktarına bağlı olarak değişmektedir. Kavrulmuş kahve çekirdeği %1.1-2.2, yeşil kahve çekirdeği %1.5, kakao çekirdeği %0.03-1.7, çay yaprağı %1.5-3.5, mate %0.9-2.2 kafein içermektedir [5,6]. Kafein, en çok içecekler yolu ile alınır ve çay, dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecek olduğundan, kafeinin büyük miktarı çay içimi ile vücuda alınır [3,7].

Çay, çaygiller (Theaceae) familyasından küçük bir ağaç olan *Camellia sinensis* bitkisinin yaprakları ve yaprak tomurcuklarıdır [8,9]. Anavatanı Çin olarak bilinen bu bitkinin kurutulmuş yapraklarının sıcak suda demlenmesi ile elde edilen içecek de “çay” olarak tanımlanır [10]. Başlangıçta ilaç olarak kullanılan çay, giderek yaygınlaşmış ve MS 6. Yüzyılda gündelik bir içecek haline gelmiştir. Tüketimi fazla olduğundan önemli bir zirai üründür. Dünya’da 45 tropik ve subtropik ülkede çay üretimi yapılmakta olup, 2018 Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization, FAO) verilerine göre kuru çay üretimi 5.9 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Dünya kuru çayının %36’sı Çin’de, %4’ü ise Türkiye’de üretilmektedir. Yurdumuzda çay yetiştirme denemeleri ilk defa 1888-1892 tarihleri arasında, Japonya’dan getirilen çay tohumları ile Bursa’da yapılmış, fakat gerekli ekolojik şartlar bulunmadığından bu denemelerden başarılı sonuç alınamamıştır. 1924 yılında Rize’de, Gürcistan’dan getirilen tohum ve fidanlarla ilk çay yetiştirme denemelerinden sonuç alınmış ve ilk çay fabrikası 1947 yılında Rize’de kurulmuştur. Günümüzde, Doğu Karadeniz Bölgesi’nin, Hopa’dan Ordu’ya kadar uzanan, 15-20 km genişliğinde uzun bir sahil şeridinde çay tarımı yapılmaktadır. Türkiye, dünyadaki en büyük çay üreticilerinden biridir ve aynı zamanda çay tüketiminin en fazla olduğu ülkedir. Türk insanı yılda kişi başına 2500 bardak çay tüketmekte bu da yaklaşık 3.5 kg dökme çaya karşılık gelmektedir [11,12].

Ülkemizde çay tüketimi ve kültürü uzun bir geçmişe sahip değildir, fakat çay, günümüzde oluşturduğu kültürü ile sosyal yaşamda yeri doldurulamayacak bir değer haline gelmiştir. Türkiye’de siyah dökme çay tercih edilir ve çaydanlık-demlik kullanılarak çay hazırlanır. Demlikte karıştırma yapılmaz ve yüzeydeki çayın dibe çökmesi sonrasında, demin oluştuğuna karar verilir. Alttaki çaydanlıkta su sürekli kaynatılır ve üste konulan demlikte tutulan demlenmiş çaydan istenilen miktar alınıp, kaynamış su ile seyreltilir. Bardakta yapılan bu seyreltme işleminde az dem kullanılmış ise “açık çay”, çok dem kullanılmış ise “koyu çay” tanımlamaları kullanılır [11]. Seyreltme işlemine göre vücuda alınan kafein miktarı da değişmektedir. Bu nedenle çaydaki kafeinin miktarının belirlenmesi, vücut üzerindeki etkileri düşünüldüğünde bir hayli önem kazanmaktadır.

Kafeinin ekonomik önemi ve ülkemizdeki çay tüketiminin fazla olması nedeniyle çayın kafein içeriğinin kesin olarak bilinmesi önem taşımaktadır. Bir bardak çaydaki kafein miktarı çay çeşidi, demleme süresi, demleme sırasında karıştırma yapılması, çay/su oranı ve sunum hacmi gibi çok farklı faktörlere bağlıdır [13]. Yüksek sıcaklık kafein çözünürlüğünü ve difüzyon hızını artırır ve demleme süresini kısaltır [14,15]. Demleme süresi ise demdeki kafein konsantrasyonundan çok etkilenir. Sıcak su çaya temas ettiğinde 0-15 dakikada demdeki kafein miktarı hızla artar, uzun demleme sürelerinde (15-60 dakika) az artış izlenir [15,16]. Biyo bileşenlerin bir çözücüde çözünmesi fiziksel bir olaydır. Çözücü miktarının artması bioaktif maddelerin çözücü ile temasını artırmakta bu nedenle ekstraksiyon hızı artmaktadır [17]. Çay/su oranı arttıkça çay deminde çözünen bileşen konsantrasyonu artmakta fakat ekstraksiyon etkinliği düşmektedir [18,19]. Demdeki kafeinin ekstraksiyonu için kullanılan çözücü miktarları çalışmalarda verilmektedir [20, 21]. Buna rağmen dem/çözücü oranının kafein analizine etkisine ait bir çalışma bulunmamaktadır.

Gıda ve içeceklerde kafeinin analizi için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) [1,3], Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectrometry, FTIR) [8,22], Yakın İnfrared Spektroskopisi (Near-Infrared Spectrometry, NIR) [6], Raman spektroskopisi [23] ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) [24] gibi cihazlar kullanılmaktadır. Sözü edilen yöntemler kesin sonuçlar vermekle birlikte; pahalı, zaman harcayan ve numune hazırlığı gerektiren yöntemlerdir. Diğer yöntemlere göre daha ekonomik olan UV-Vis

spektrofotometre ile az miktarda numune ve diğerlerine kıyasla basit işlemlerle kesin ve tekrar edilebilir sonuçlar elde edilebilir. UV-Vis spektrofotometre hemen hemen her araştırma merkezi ve kalite kontrol laboratuvarlarında bulunabilen, kullanımı kolay bir cihazdır [25]. Bu nedenle kafein analizinde UV-Vis spektrofotometre kullanılarak yapılan çalışmaların sayısı bir hayli fazladır [26, 27].

Hangi analiz yöntemi ya da cihaz kullanılmış olursa olsun, analize etki eden faktörlerin araştırıldığı çalışmalarda çok faktörlü ANOVA kullanılarak sonuçlar değerlendirilebilir. Örneğin; İki faktörlü ANOVA (SPSS *General Linear Model, Univariate (GLM Univariate)*) ile iki faktörün ayrı ayrı etkileri yanı sıra etkileşim etkileri de değerlendirilebilmektedir. SPSS GLM Univariate Post hoc testleri ve Tahmini Marjinal Ortalamalar (TMO) ile ikili ve/veya çoklu karşılaştırma yapılabilir. Alt grupların (*subsets*) sınıflandırılması Tukey HSD ya da Bonferroni Post Hoc testlerine ait çoklu karşılaştırma tabloları kullanılarak yapılabilmektedir. Sadece ana faktörleri inceleyen bu iki testten, Tukey HSD alt grup ayrımını kendisi yapar. Faktör etkileşimleri durumunda farklılıkların belirlenmesi için SPSS GLM Univariate uygulamasında ayarlanmış ortalamaları kullanan TMO (Örneğin: Bonferroni seçimli) analizini seçmek gerekmektedir. TMO Bonferroni ile alt grup ayrılması verilmemektedir fakat alt grup ayrılmaları, farklılıkların açıklandığı ikili karşılaştırma tablolarından faydalanılarak, el ile yapılabilir.

Gerçek etkiyi ortaya çıkarma yeteneği olarak ifade edilen istatistiksel gücü belirleyen üç ana parametre, anlamlılık seviyesi (α), örneklem hacmi (n) ve etki büyüklüğüdür (*Effect size*) [28]. Etki büyüklüğü son yıllarda istatistiksel güç ve meta analiz çalışmalarında kullanıldığı için önem verilen bir kavram olarak karşımıza çıkmaktadır [29]. ANOVA hesaplamalarını temel alan eta kare (η^2 , SS_{etki}/SS_{toplam}) ve kısmi eta kare (η_p^2 , $SS_{etki}/(SS_{etki}+SS_{hata})$) en sık kullanılan etki büyüklüklerindedir [30]. η_p^2 , SPSS ANOVA ile doğrudan, η^2 ise ANOVA tablosundan hesap ile elde edilebilirler. Tek faktörlü ANOVA için iki etki değeri birbirine eşittir fakat çok faktörlü ANOVA için farklıdır. Jacob Cohen (1988) tarafından verilen etki büyüklüğü eşik değerlerinin (η^2 : Küçük (0.01), Orta (0.06), 0.14 (Büyük)) kullanımında iki etki büyüklüğünün birbirinin yerine yanlış kullanımı söz konusu olmaktadır [31]. Cohell ve ark. (2020)'nin açıklamalarına göre bu eşik değerlerinin güç analizinde kullanılması sakıncalıdır [32]. Fitz ve ark. (2011)'na göre ise η^2 , aynı çalışma içindeki faktör etkilerini karşılaştırmak için kullanılabilir fakat tasarımı farklı çalışmaların karşılaştırılmasında ek ya da kontrol değişkenlerin etkisi nedeniyle uygun olmayabilir. Farklı tasarımların karşılaştırılması için η_p^2 etki değerinin kullanılması daha uygundur fakat SS_{hata} terimlerinin birbiri ile karşılaştırılabilir olması gerekmektedir [33].

Bu çalışmada demlikte demleme yöntemi göz önüne alınarak durgun şartlarda, değişen demleme süresi, çay/su ve dem/kloroform oranının çayda analiz edilen kafeinin miktarına etkisinin incelemek amaçlanmıştır. Ölçümlerin yorumları iki faktörlü ANOVA kullanılarak irdelenmiş, etki faktörleri ile beraber incelenerek karşılaştırmalar yapılmıştır.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

Çaydanlık-demlik sistemi durgun koşullarında deme geçen kafeinin analizi için üç farklı sıcaklıkta, farklı demleme ve analiz şartları için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çaydanlık-demlik sisteminde hiçbir zaman 30 ve 60 °C'de demleme yapılmaz fakat ısı kapatıldığında su ve demin sıcaklığı 60 °C ya da daha altına düşebilir. Bu çalışmada düşük sıcaklıkların kullanılmasının nedeni farklı sıcaklıklarda çay/su oranı, demleme süresi ve dem/çözücü faktörlerinin etkisini açıkça görebilmektir. Kaynama nedeniyle demleme ortamının hareketlenmesi ve demden suyun buharlaşmasının önüne geçilmesi için en yüksek sıcaklık olarak 90 °C seçilmiştir. Çalışmada, ülkemizde çok tüketilen bir dökme çay olan Çaykur Tiryaki kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda standart çözeltilerin hazırlanması için Fluka marka saf kafein, kafeinin demden çekilebilmesi için Merck marka saf kloroform kullanılmıştır. Saf kafein ile hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin absorpsanları UV-Vis spektrofotometre ile ölçülerek, kafein kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Demleme işlemi sırasında karıştırma uygulanmamış; işlem, etüvde balon jodelerde saf su kullanarak yapılmıştır. Demleme süresi sonunda çay taneleri süzülüş, elde edilen demlerdeki kafein, kloroform ile organik faza alınmış ve absorpsanları ölçülerek, %kafein değerleri elde edilmiştir. Tüm çalışmalarda, kafeinin su ortamına geçirilmesi "demleme", demdeki kafeinin kloroform ile alınması "ekstraksiyon" olarak adlandırılmıştır. Demleme işlemlerinde çay/su oranı (katı/sıvı) K/S, ekstraksiyon işlemindeki dem/kloroform oranı ise D/K olarak kısaltılmıştır.

A. Kalibrasyon Grafiğinin Oluşturulması

1mL'sinde 0.4 mg kafein içeren standart stok çözeltisinden 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, ve 0.45 mL hacim 10 mL'lik balon jodelere konulmuş; kloroform ile 10 mL'ye tamamlanarak kalibrasyon çözeltileri elde edilmiştir. UV-Vis spektrofotometre cihazında kör numune olarak saf kloroform kullanılmış, kalibrasyon çözeltilerinin absorpsansı 200-400 nm dalga boyu aralığında taranmış ve en yüksek absorpsan değeri (λ_{max}) için dalga boyu değeri (274 nm) belirlenmiştir. Çözelti konsantrasyonlarına karşılık, absorpsan değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Doğrusallık, Gözlemeleme Sınırı (LOD=3.3 σ /b) ve Ölçüm Alt Sınırı (LOQ=10 σ /b) hesaplamaları için uygulanan Lineer Regresyon analizi, SPSS (ver.23) programı kullanılarak yapılmıştır. LOD ve LOQ formüllerinde σ , kalibrasyon doğrusu analitik yanıtın standart sapması olup, y-artıklar

(y-residuals) ait standart sapma ($S_{y/x}$) ya da y-kesişimlere (y-intercepts) ait standart sapma (S_a) alınarak hesaplanabilir [34-36]. Formüllerde b ise kalibrasyon doğrusunun eğimidir.

B. K/S Oranının Etkisi

Farklı K/S oranlarının demlemeye etkisinin incelenmesi için 30, 60 ve 90 °C’lerde, 1/100, 2/100, 3/100, 4/100 K/S oranlarında (g/mL), 5 saat süre ile etüvde demleme işlemleri yapılmıştır. Demdeki kafeinin organik faza çekilmesi için 2 mL deme, 5 mL kloroform eklenerek, kapaklı cam tüpte 5 dakika süresince çalkalanmış ve üstte oluşan organik fazdan 1 mL alınarak balon jöjelere konulmuştur. Kloroform ile hacim 10 mL’ye tamamlanmış, absorbans ölçülerek % kafein değerleri hesaplanmıştır.

C. Demleme Süresinin Etkisi

1/100 K/S oranı için, 30, 60 ve 90 °C’lerde, 1, 2, 3, 4 ve 5 saat süre ile etüvde çalışılmıştır. Demdeki kafeinin ekstraksiyonu için 2 mL deme, 5 mL kloroform eklenerek, kapaklı cam tüpte 5 dakika süresince çalkalanmış ve üst kısımdaki organik fazdan 1 mL alınarak kloroform ile 10 mL’ye tamamlanmış, absorbans ölçülerek % kafein değerleri hesaplanmıştır.

D. D/K Oranının Etkisi

1/100 K/S oranı için, 30, 60 ve 90 °C’lerde, 5 saat demleme yapılmıştır. 1/5, 2/5, 3/5, 4/5, 5/5 D/K (mL/mL) oranları ile kafein ekstrakte edilmiş, organik fazdan 1 mL alınarak 10 mL’ye kloroform ile tamamlanmış, absorbans ölçümünden hareketle % kafein değerleri hesaplanmıştır.

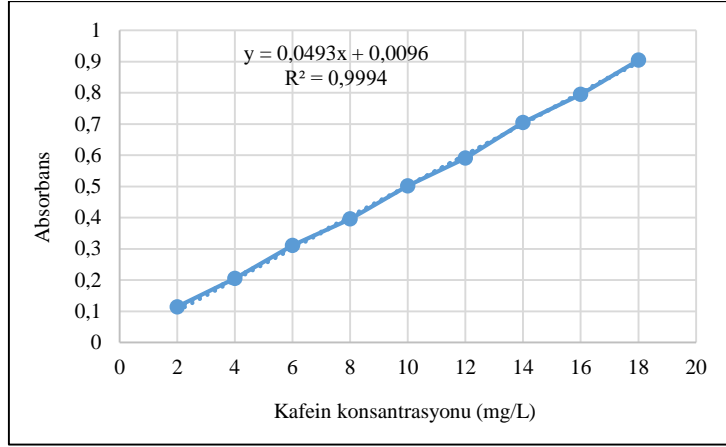
E. İstatistiksel Analizler

Analizler üç tekrarlı yapılmış ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. SPSS (ver.23) paket programında iki faktörlü ANOVA (*SPSS GLM Univariate*) kullanılarak, üç çalışma için (K/S, Süre ve D/K) istatistiksel incelemeler yapılmıştır. ANOVA analizleri öncesinde SPSS ile tüm veriler ve iki faktöre ait veriler için tanımlayıcı istatistikler hesaplanmış, dağılımların normalliği Shapiro-Wilk (W), varyansların homojenliği ise Levene’s (L) testi ile incelenmiştir ($p < 0.05$). İki faktörlü ANOVA ile anlamlılık değerleri ve etki büyüklükleri (η^2 ve η_p^2) kullanılarak faktörler ve etkileşimlerinin kafein yüzdesine etkisi yorumlanmıştır. Post hoc (Tukey HSD ve Bonferroni seçimli) ve TMO (Bonferroni seçimli) testleri ile ikili ve/veya çoklu karşılaştırmalar incelenmiş, alt grup (*subsets*) sınıflarına ait harflendirmeler yapılarak farklılıklar incelenmiştir.

III. BULGULAR VE TARTIŞMA

A. Kalibrasyon Grafiği, Ölçüm Aralığı, LOD ve LOQ

Kalibrasyon çözeltilerinin UV-Vis spektrofotometre cihazında okunan absorbansları ile elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 1’de sunulmuştur. Literatürde kafein için 273.5 nm [37], 270 nm [38] ve 260 nm [27] dalga boyu ölçümlerine rastlanmaktadır. Bu çalışmada kalibrasyon çözeltileri ve çay numuneleri ile yapılan ölçümlerde, pikin en yüksek değeri 276 nm dalga boyunda izlenmiş ve absorbans değerleri bu dalga boyunda alınmıştır. Kalibrasyon çözeltilerinin absorbans-konsantrasyon değerleri doğrusal bir bağlantı vermektedir ($r^2=0.9994$). Doğrusallık aralığı 2-18 mg/L’ dir. S_a ile hesaplanan LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.338 mg/L ve 1.025 mg/L’ dir. Dobrinas ve ark. (2013)’ nın çay demindeki kafeinin analizinde UV spektrofotometre için aynı yöntemle hesapladıkları LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.85 ve 1.52 mg/L’ dir [37]. Farklı cihazlar ve kalibrasyon çözücülerin kullanılması ya da LOD ve LOQ hesaplamalarında kullanılan yöntemlerin değişik olması değerlerde farklılıklar yaratabilir. Gaz kromatografisi ile oldukça düşük LOD (0.02 mg/L) ve LOQ (0.05 mg/L) değerleri elde edilebilir [39]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, UV spektrofotometre yanı sıra, HPLC ve FTIR gibi cihazlarda saptanan LOD ve LOQ değerleri ile yarışabilmektedir (LOD ve LOQ için sırasıyla; 0.12, 0.4 mg/L (HPLC) [40], 0.5, 2.1 mg/L (HPLC) [41], 1, 3.4 mg/L (FT IR) [42]). 0.338 mg/L LOD ve 1.025 mg/L LOQ değerleri, demleme ve kloroform ekstraksiyonu sonrasında cihazda ölçülen değer olarak alındığında katı çayda sırasıyla % 0.0845 ve % 0.25 kafein değerine karşı gelmektedir (K/S=1/100; D/K:2/5; Ölçülen miktar:1 mL). Yöntem, kafeini giderilmiş kahve, bitki çayları ve az miktarda kafein içeren gıda türlerinde kafein analizi için de uygundur.



Şekil 1. Kafein kalibrasyon grafiği

B. K/S Oranının Etkisi

K/S oranının etkisinin incelendiği bu deney grubunda (N=36) %kafein için en düşük değer %0.931, en yüksek değer %2.6, aralık 1.669, ortalama ise 1.589 ± 0.425 'dir. Shapiro-Wilk (W) testine göre dağılım normaldir ($W(36)=0.966$, $p=0.327$). K/S oranı (satırlar) ve sıcaklık (sütunlar) için Shapiro-Wilk testine göre %kafein değerlerinin dağılımı 1/100 oranı hariç normaldir. Bu oran için anlamlılık ($p=0.046$) 0.05'e çok yakın ve çarpıklık (Skewness) +1.5'ten küçük (0.857), basıklık (Kurtosis) ise -1.5'ten küçük (-1.087) olduğundan normal dağılım kabul edilmiştir. ANOVA testi normallik ve varyansların homojenliği bozulmalarına karşı dirençli bir testtir [43, 44]. Bu nedenle, yapılan kabul ANOVA uygulamasını etkilemeyecektir. K/S oranı 1/100, 2/100, 3/100, 4/100 ve 30, 60 ve 90 °C sıcaklıkları için, Shapiro-Wilk istatistik sonuçları sırasıyla, $W(9)_{1/100}=0.831$, $p=0.046$; $W(9)_{2/100}=0.884$, $p=0.173$; $W(9)_{3/100}=0.857$, $p=0.090$; $W(9)_{4/100}=0.869$, $p=0.120$; $W(12)_{30\text{ °C}}=0.921$, $p=0.292$; $W(12)_{60\text{ °C}}=0.888$, $p=0.110$; $W(12)_{90\text{ °C}}=0.878$, $p=0.083$ şeklindedir. K/S oranı ve sıcaklık için Levene's (L) testine göre (sırasıyla, $F(3,32)=0.515$, $p=0.675$; $F(2,33)=1.199$, $p=0.314$) varyansların homojenliği şartı sağlanmıştır.

SPSS ile İki faktörlü ANOVA analizinde K/S ve sıcaklık faktörlerinin ana etkileri ve etkileşimleri incelenmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen %kafein değerleri ve ANOVA sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur. İki faktörlü ANOVA uygulamasında yer alan Levene's testine göre de varyansların homojenliği sağlanmıştır ($p=0.052$). % kafein değerleri için sıcaklık, K/S ve etkileşimleri için anlamlı farklılıklar bulunmuştur ($p<0.001$). η^2 ve η_p^2 değerlerine göre sıcaklık etkisinin K/S etkisinden daha büyük olduğu izlenebilir. Etkileşim için ise faktörlere göre daha düşük etki değerleri elde edilmiştir. Tablo 1 incelendiğinde, tüm sıcaklıklar için K/S oranının artışı ile daha düşük %kafein değerleri ölçüldüğü görülebilir. Ayrıca her bir oran için, sıcaklık artışı ile daha yüksek % kafein değerleri elde edilmiştir.

Tablo 1. K/S oranının etkisi deneylerine ait şartlar ve iki faktörlü ANOVA sonuçları

K/S*	Sıcaklık (°C)				İki Faktörlü ANOVA
	30 ^a (%)	60 ^b (%)	90 ^c (%)		
1/100 ^a	1.432±0.058 ^{a,a}	1.628±0.020 ^{a,b}	2.421±0.185 ^{a,c}	L**	F(11,24)=2.194, p=0.052
2/100 ^b	1.175±0.027 ^{b,a}	1.610±0.023 ^{a,b}	2.035±0.059 ^{b,c}	A***, Sıcaklık	F(2,24)=545.80, p<0.001; $\eta^2=0.823$, $\eta_p^2=0.978$
3/100 ^c	1.071±0.076 ^{bc,a}	1.370±0.050 ^{b,b}	2.034±0.040 ^{b,c}	A, K/S	F(3,24)=57.71, p<0.001; $\eta^2=0.13$, $\eta_p^2=0.878$
4/100 ^c	0.972±0.039 ^{c,a}	1.464±0.048 ^{b,b}	1.853±0.021 ^{c,c}	A, Sıcaklık x K/S	F(6,24)=6.20, p<0.001; $\eta^2=0.028$, $\eta_p^2=0.608$
				A, Hata	$\eta^2=0.019$

*Demleme süresi: 5 saat; D/K:2/5; Ölçülen miktar:1 mL; **Levene's İstatistiği; ***ANOVA istatistiği; K/S için aynı sütunda birinci, sıcaklık için aynı satırda ikinci harflendirmede, farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (TMO Bonferroni, $p<0.05$).

Sıcaklık ve K/S oranlarında anlamlı fark yaratan değerlerin saptanması için yapılan SPSS GLM Univariate Post hoc (Tukey HSD ve Bonferroni seçimli) ve TMO (Bonferroni seçimli) ile yapılan test sonuçları aynı olup, farklı sıcaklıklarda elde edilen %kafein ortalamaları birbirinden farklıdır. Bu durumda alt grup (subsets) sınıflandırması ile 30 °C ortalaması (a), 60 °C (b) ve 90 °C (c) olarak harflendirilebilir. K/S için ise 3/100 ve 4/100 oranları aynı olup, 1/100, 2/100 oranlarından farklıdır ve alt grup sınıflandırılması 1/100 (a), 2/100 (b), 3/100 (c), 4/100 (c) olarak yapılabilir. Harfler, Tablo 1'de sıcaklık ve K/S başlıklarında sunulmuştur.

Etkileşim için TMO ikili karşılaştırmaları her bir satır ve sütun için yapılabilmektedir. Örneğin: 30 °C için tüm oranlardaki kafein yüzdeleri karşılaştırılabilir ya da 1/100 oranının üç sıcaklıktaki %kafein değeri

karşılaştırılabilir. Sıcaklık x K/S etkileşimi için TMO (Bonferroni seçimli) ikili karşılaştırmaları Tablo 1’de sunulmuştur. % kafein değerlerinden sonra eklenen birinci harf ya da harf grubu K/S (sütunlar) farklılıklarını, 2. harf ise sıcaklık (satırlar) farklılıklarını göstermektedir. K/S oranlarında 60 °C için sadece iki alt grup oluşmuştur fakat 30 ve 90 °C alt grup sayısı ikiden fazladır. Durgun şartlarda yapılan kafein analizinde uygulanan K/S oranı seçiminde sıcaklık göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, 30 °C’de yapılan çalışmada 4/100 oranı için oldukça düşük kafein yüzdesi elde edilmiştir (%0.972). Diğer şartların (süre, D/K, ölçülen miktar) aynı olduğu göz önüne alınarak, aynı sıcaklıklarda K/S oranı artsa bile eşit kafein yüzdesinin elde edilmesi gerektiği düşünülebilir fakat bu iyi bir analizci için bile oldukça zor bir işlemdir. Artan K/S oranları ile deme geçen kafein miktarı (mg kafein/100 mL dem) artmaktadır (1/100 K/S’den, 4/100 K/S oranına, 30, 60 ve 90 °C’ler için sırasıyla, 2.71, 3.60 ve 3.06 kat artış). Bu durum kloroform ile ekstraksiyon sırasında işlemi zorlaştıracak olan köpüklenme ve bulanıklığa neden olmakta, inorganik ve organik fazın ayrılması güçleşmektedir. Demdeki kafeinin artması aynı zamanda kalibrasyon doğrusunun dışına taşmaya ve hatalı absorbans değerlerinin okunmasına neden olmaktadır. 4/100 üstü K/S oranı ile çalışmak özellikle 90 °C için güvenilir sonuçlar vermeyecektir. Diğer taraftan, sabit miktar çözücü içinde kafein miktarı arttıkça konsantrasyon farkı düşecek ve kafein difüzyonu azalacaktır [37, 45]. Söz edilen açıklamalara göre, süre ve D/K oranı etkisi için K/S oranı 1/100 alınarak diğer çalışmalar yürütülmüştür.

C. Demleme Süresinin Etkisi

Demleme süresine ait çalışma kapsamında (N=45) kafein içeriği için en düşük değer %1.297, en yüksek değer %2.437, aralık 1.14, ortalama ise %1.835±0.38’dir. Shapiro-Wilk (W(45)=0.891, p<0.001) testine göre dağılım normal değildir fakat basıklık (-1.439) ve çarpıklık (0.188) değerleri (-1.5)-(+1.5) arasında olduğundan normal olarak kabul edilmiştir [43]. SPSS tanımsal istatistik analizinde, süre ve sıcaklık faktörleri için %kafein değerlerinin dağılımı Shapiro-Wilk (W) testinde 60 °C hariç normal bulunmuştur (p=0.035). Bu sıcaklığa ait basıklık ve çarpıklık değerleri sırasıyla, -0.497 ve -0.903 olup, (-1.5)-(+1.5) arasındadır ve normal dağılım kabul edilebilir [43, 44]. 1, 2, 3, 4, 5 saat ve 30, 60, 90 °C sıcaklıkları için, Shapiro-Wilk istatistik sonuçları sırasıyla, W(9)_{1 saat} =0.850, p=0.074; W(9)_{2 saat} =0.868, p=0.116; W(9)_{3 saat} =0.880, p=0.156; W(9)_{4 saat} =0.847, p=0.069; W(9)_{5 saat} =0.901, p=0.256; W(15)_{30 °C} =0.971, p=0.868; W(15)_{60 °C} =0.871, p=0.035; W(15)_{90 °C} =0.952, p=0.564 olarak bulunmuştur. Süre ve sıcaklık için, Levene’s (L) testine göre (sırasıyla, F(4,40) =0.203, p=0.935 ve F(2,42) =0.052, p=0.95) varyansların homojenliği şartı sağlanmıştır.

SPSS ile İki faktörlü ANOVA analizinde, sıcaklık ve süre faktörlerinin ana etkileri ve etkileşimleri incelenmiştir. Deneylerde elde edilen %kafein değerleri ve ANOVA sonuçları Tablo 2’ de görülmektedir. Levene’s test istatistiği anlamlılık değeri p=0.044’dır. Değer 0.05’e çok yakın ve ANOVA, varyansların homojenliği bozulmalarına karşı dirençli bir test olduğu için homojenlik varsayımı kabul edilmiştir [44]. ANOVA analizine göre sıcaklık ve süre faktörleri için % kafein miktarlarında anlamlı farklılıklar bulunmaktadır (p<0.001).

Tablo 2. Demleme süresinin etkisi deneylerine ait şartlar ve iki faktörlü ANOVA sonuçları

Süre* (saat)	Sıcaklık (°C)			İki Faktörlü ANOVA	
	30 ^a (%)	60 ^b (%)	90 ^c (%)		
1 ^a	1.307±0.014 ^{a,a}	1.672±0.027 ^{a,b}	2.301±0.086 ^{a,b,c}	L**	F(14,30)=2.094, p=0.044
2 ^b	1.382±0.013 ^{ab,a}	1.835±0.013 ^{b,b}	2.301±0.058 ^{ab,c}	A***, Sıcaklık	F(2,30)=1494.74, p<0.001; η ² =0.968, η _p ² =0.99
3 ^b	1.452±0.047 ^{b,a}	1.838±0.026 ^{b,b}	2.375±0.054 ^{b,c}	A, Süre	F(4,30)=9.415, p<0.001; η ² =0.012, η _p ² =0.557
4 ^b	1.413±0.011 ^{ab,a}	1.802±0.023 ^{b,b}	2.326±0.029 ^{ab,c}	A, Sıcaklık x Süre	F(8,30)=3.76, p=0.004; η ² =0.0097, η _p ² =0.501
5 ^b	1.487±0.059 ^{b,a}	1.781±0.071 ^{ab,b}	2.244±0.055 ^{a,c}	A, Hata	η ² =0.0104

*K/S: 1/100; D/K:2/5; Ölçülen miktar:1 mL; **Levene’s İstatistiği; ***ANOVA istatistiği; Süre için aynı sütunda birinci, sıcaklık için aynı satırda ikinci harflendirilmedi, farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (TMO Bonferroni, p<0.05)

Sıcaklık x süre etkileşimi için de anlamlı fark elde edilmiştir (p=0.004). η² ve η_p² etki büyüklüğü değerleri incelenirse, sıcaklık için daha büyük, süre ve etkileşim için ise daha düşük değerler elde edildiği görülebilir. Tablo 2 incelendiğinde, tüm demleme süreleri için sıcaklık arttıkça % kafein değerlerinin arttığı açıkça görülebilir. Ayrıca her sıcaklık için demleme süresinin artması ile hesaplanan % kafein değerleri artış eğilimi göstermektedir. Sıcaklık ve süre ana etkileri için farklılığa yol açan değerlerin saptanmasında uygulanan SPSS GLM Univariate Post hoc testleri (Tukey HSD ve Bonferroni seçimli) ve TMO (Bonferroni seçimli) ile yapılan analiz sonuçları aynı olup, farklı sıcaklıklarda elde edilen % kafein değerleri birbirinden farklıdır. Alt grupların (subsets) sınıflandırması için, 30 °C ortalaması (a), 60 °C (b) ve 90 °C (c) harflendirilmesi kullanılabilir. Aynı şekilde süre için yapılan çoklu karşılaştırma testlerinde 1 saat süresine ait % kafein değeri diğerlerinden farklı olup, alt grup sınıflandırılması 1 saat (a), 2, 3, 4 ve 5 saat (b) olarak harflendirilebilir. Harfler, sıcaklık ve süre faktörleri için Tablo 2 başlıklarında verilmiştir. Sıcaklık x süre etkileşimi için uygulanan TMO (Bonferroni seçimli) ikili karşılaştırma sonuçlarına göre, Tablo 2’deki % kafein değerlerinden sonra eklenen birinci harf ya da harf grubu süre (sütunlar) farklılıklarını, ikinci harf ise sıcaklık (satırlar) farklılıklarını göstermektedir. Bu sonuçlara göre, durgun şartlarda

yapılan kafein analizinde uygulanacak sürenin sıcaklık şartına bağlı olarak belirlenmesi gerekmektedir. Düşük sıcaklıklarda çalışılacak ise demleme süreleri uzun olmalı, yüksek sıcaklık için ise 1 saat yeterli olabilmektedir. Örneğin, 30 °C'de yapılan çalışmada 4 saatlik süre sonunda bile diğer sıcaklıkların 1 saatlik % kafein değerlerine ulaşamamıştır. Benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir. Najafi ve ark. (2003) 2/150 katı/sıvı oranında 90 °C'de etüvde demleme ve 120 °C'de kaynatma işlemleri ile 20 dak. sonunda tüm kafeinin dem içine alınabileceğini açıklamış, kaynatma işleminin kafeinin deme geçişinin hızlandırdığını açıklamıştır [8]. Bir diğer çalışmada, Ramalho vd. (2013) 2/200 katı/sıvı oranı ve 100 °C demleme sıcaklığı için en yüksek kafein değerini Brezilya çayı (%5.3 kafein içerikli) için 20 dak., İngiliz çayı (%4.5 kafein içerikli) için 10 dak. demleme sürelerinde tespit etmiştir [46]. Kaynama sıcaklığının uygulanması, demleme süresini dakika birimine düşürebilir [15]. Kafeinin çaydan deme geçen oranı 5 dak. demleme ile % 90' ın üstüne çıkar [18]. Türk çayı ile kaynama sıcaklığında (K/S=1/300) çaydanlık ve demlik kullanılarak geleneksel demleme yöntemi ile yapılan bir çalışmada %kafein değeri 5 dak. demleme ile %2.39 olup, süre arttıkça kafein miktarı düşmüş ve 60 dak. sonunda %2.19 olarak bulunmuştur [47]. Türk çayı için bu çalışmada 90 °C de durgun şartlarda uzun demleme sürelerinde (1-5 saat) sözü edilen kafein değerlerine yakın değerler elde edilmiştir (Tablo 2). Kaynama aynı zamanda demlik içinde çay tanelerinin hareketine de sebep olup kafeinin suya geçişini hızlandırabilir. Bu çalışmada belirlenen diğer faktörler (K/S, D/K) yine belirlenen üç farklı sıcaklık için çalışılacağından demleme süresi 5 saat seçilip deneyler gerçekleştirilmiştir.

D. D/K Oranının Etkisi

D/K oranının %kafein değerine etkisinin incelenmesi için, sabit demleme süresinde (5 saat), K/S oranı 1/100 için 1/5, 2/5, 3/5, 4/5 ve 5/5 D/K oranlarında çalışmalar yapılmıştır. Bu deney grubunda (N=45) %kafein için en düşük değer %1.333, en yüksek değer %2.02, aralık 0.687, ortalama ise %1.654±0.199'dur. Shapiro-Wilk (W) testine göre dağılım normaldir (W(45)=0.95, p=0.051). D/K oranı ve sıcaklık için ise %kafein dağılımı 4/5 oranı hariç normaldir. Bu oran için basıklık -1.5' tan biraz büyük (-1.590) olmasına rağmen, anlamlılık 0.05'e yakın (p=0.042) ve ANOVA analizinin normallik bozulmalarına karşı güçlü bir test olması nedeniyle normallik varsayımı kabul edilmiştir. D/K oranı 1/5, 2/5, 3/5, 4/5, 5/5 ve 30, 60, 90 °C sıcaklıkları için, Shapiro-Wilk istatistik sonuçları sırasıyla, W(9)_{1/5}=0.877, p=0.147; W(9)_{2/5}=0.891, p=0.203; W(9)_{3/5}=0.840, p=0.057; W(9)_{4/5}=0.828, p=0.042; W(9)_{5/5}=0.911, p=0.324, W(15)_{30 °C}=0.963, p=0.740; W(15)_{60 °C}=0.930, p=0.275; W(15)_{90 °C}=0.935, p=0.327, şeklindedir. D/K oranı ve sıcaklık için Levene's (L) testine göre (sırasıyla, F(4,40)=2.525, p=0.056; F(2,42)=0.652, p=0.526) varyansların homojenliği şartı sağlanmıştır.

Sıcaklık ve D/K faktörlerinin ana etkileri ve etkileşimlerini incelemek için yapılan İki faktörlü ANOVA analiz sonuçları ve deneylerde elde edilen % kafein değerleri Tablo 3'te sunulmaktadır. İki faktörlü ANOVA Levene's testine göre de varyansların homojenliği sağlanmıştır (p=0.287). Tablo 3 incelendiğinde sıcaklık arttıkça % kafein miktarının arttığı izlenebilir. D/K oranının artması ile % kafein değerlerinin değişimine ait yorum yapmak zordur fakat 90 °C için 5/5 oranında diğer oranlara göre düşük % kafein değeri dikkat çekmektedir. İki faktörlü ANOVA analizine göre sıcaklık için fark anlamlıdır (p<0.001) fakat D/K oranı için anlamlı fark bulunmamaktadır (p=0.052). Sıcaklık x D/K etkileşimi için ise anlamlı fark elde edilmiştir (p<0.001). η^2 ve η_p^2 etki büyüklükleri incelenirse, sıcaklık için daha büyük, D/K ve etkileşim için ise daha düşük değerler elde edildiği görülebilir. Sıcaklık ve D/K ana faktörleri için uygulanan Post hoc testleri (Tukey HSD ve Bonferroni seçimli) ve TMO (Bonferroni seçimli) sonuçları aynı olup, farklı sıcaklıklarda elde edilen kafein değerleri birbirinden farklıdır.

Tablo 3. D/K oranının etkisi deneylerine ait şartlar ve iki faktörlü ANOVA sonuçları

D/K ^e	Sıcaklık (°C)			İki Faktörlü ANOVA
	30 ^a (%)	60 ^b (%)	90 ^c (%)	
1/5 ^a	1.349±0.015 ^{a,a}	1.698±0.009 ^{b,b}	1.956±0.052 ^{bc,c}	L** F(14,30)=1.261, p=0.287
2/5 ^a	1.402±0.042 ^{ab,a}	1.582±0.052 ^{a,b}	1.895±0.032 ^{bc}	A***, Sıcaklık F(2,30)=695.29, p<0.001; $\eta^2=0.868, \eta_p^2=0.979$
3/5 ^a	1.481±0.029 ^{b,a}	1.580±0.027 ^{a,b}	1.880±0.026 ^{bc}	A, D/K F(4,30)=2.66, p=0.052; $\eta^2=0.0068, \eta_p^2=0.262$
4/5 ^a	1.450±0.019 ^{bc,a}	1.587±0.021 ^{a,b}	1.977±0.040 ^{c,c}	A, Sıcaklık x D/K F(8,30)=21.32, p<0.001; $\eta^2=0.1066, \eta_p^2=0.850$
5/5 ^a	1.536±0.045 ^{c,a}	1.680±0.029 ^{b,b}	1.749±0.014 ^{a,c}	A, Hata $\eta^2=0.0189$

*Süre: 5 saat; K/S: 1/100; Ölçülen miktar:1 mL; **Levene's İstatistiği; ***ANOVA istatistiği; D/K için aynı sütunda birinci, sıcaklık için aynı satırda ikinci harflendirilmede, farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (TMO Bonferroni, p<0.05).

Alt gruplar (subsets) için, 30 °C ortalaması (a), 60 °C (b) ve 90 °C (c) harflendirilmesi kullanılabilir. D/K oranı için ise anlamlı fark olmadığından Post hoc testlerini uygulamaya gerek yoktur ve tüm D/K değerleri aynı alt grupta bulunacaktır (a). Harfler, sıcaklık ve D/K faktörleri için Tablo 3 başlıklarında verilmiştir. Sıcaklık x D/K etkileşimi için TMO Bonferroni ikili karşılaştırmalarında % kafein değerlerinden sonraki 1. harf (ya da harf grubu) D/K (sütun) farklılıklarını, 2. harf ise sıcaklık (satır) farklılıklarını göstermektedir. Bu analize göre 60 °C de diğer sıcaklıklara göre daha az sayıda alt grup oluşmuştur. %kafein değerleri 30 °C için artan D/K oranı ile artma, 90

°C'de ise azalma eğilimi göstermektedir. Artan dem hacmi aynı miktar kloroform ile ekstrakte edildiği için, 1/5 oranından 5/5 oranına çıktığında, ölçülen miktardaki (1mL) kafein, ekstraksiyon başarısına bağlı olarak yaklaşık 5 kat artacaktır. 90 °C için 5/5 oranındaki düşük % kafein değeri hem kloroform miktarının kafeini ekstrakte etme yetersizliği hem de kafein ve deme geçen diğer bileşiklerin yüksek miktarlarından kaynaklanan köpüklenme sebebiyle olabilir. Bu nedenle sıcaklık arttıkça 5/5 D/K oranının kullanılması hatalı sonuçlara yol açabilir. Ayrıca, Seylan çayı gibi yüksek kafein içerikli bir çay için, 5/5 oranı ile yüksek sıcaklıkta çalışmak kalibrasyon doğrusu dışına taşmaya da neden olabilir. 30 °C çalışmasında analizi engelleyecek bir köpüklenme izlenmemiş, kalibrasyon konsantrasyonları dışına taşma olmamıştır, dolayısıyla bu sıcaklık için sözü edilen nedenler %kafein artışını açıklamak için kullanılamaz. Yüksek D/K oranlarında sözü edilen problemler 2/5 ve 3/5 oranlarında TMO Bonferroni Post Hoc testlerine göre farklılık izlenmediğinden 2/5 oranı alınarak çalışmalar yürütülmüştür.

Cohen eşik değerleri kullanılsa bile, η^2 , ANOVA hesaplamalarında etkilerin toplam değişkenlikteki yüzdesi olarak tanımlandığından (SS_{etki}/SS_{toplam}), çalışma içi ve çalışmalar arası karşılaştırmalar yapılabilir. Her grup çalışma için K/S, süre ve D/K etkisi sıcaklığın etkisinden düşüktür. Gruplar birbiri ile karşılaştırılırsa sıcaklığa göre diğer faktörlerin etki değeri sıralamasının K/S>süre>D/K olduğu açıkça görülebilir. D/K faktörü istatistiksel olarak farklı olmadığından η^2 ve η_p^2 etki değerlerinin düşük olması normaldir. D/K oranının incelendiği çalışmada D/K faktörü, hata ve toplam kareler toplamı değerleri diğer çalışmalara göre çok düşüktür (sırasıyla, 0.012, 0.033, 1.754). Sıcaklık faktörü toplam kareler toplamının büyük bir kısmını oluşturmaktadır fakat diğer gruplardaki çalışmalara göre (K/S ve süre) etkileşimin etki değerlerini artıran ana unsur etkileşime ait kareler toplamının yüksek olmasıdır (K/S, süre ve D/K için sırasıyla; 0.177, 0.062, 0.187). η^2 , K/S ve süre için yaklaşık on kat, K/S ve D/K için yirmi kat, süre ve D/K için ise iki kat farklıdır. K/S ve süre etkisinin incelendiği çalışmalarda toplam kareler toplamı (SS_{toplam}) hemen hemen eşit bulunmuştur (K/S: 6.322; süre: 6.353). Bu iki çalışmada hatalar için η^2 değerlerinde yaklaşık 2 kat farklılık vardır (sırasıyla, 0.019, 0.0104). K/S ve süre faktörlerinin farklılığı yanı sıra ve hata terimlerinin kareler toplamı farklılığı nedeniyle η^2 değerleri farklı bulunmuştur. Fritz' in önerilerine göre üç çalışmaya ait η_p^2 karşılaştırması yapılmak istenirse, sıralama yine değişmeyecektir fakat SS_{hata} değerlerinin karşılaştırılabilir olduğu düşünülmektedir (sırasıyla, 0.114, 0.062, 0.033).

Türk çayı için genellikle kaynama sıcaklığı ve kısa demleme sürelerinin uygulandığı diğer çalışmalarda elde edilen kafein miktarları bu çalışma değerleri ile karşılaştırılacak olursa, 90 °C hariç diğer sıcaklıklarda elde edilen değerlerin düşük bulunduğu izlenebilir. Özdemir ve ark. (2018) Türk çayında kafein miktarlarını HPLC ile % 1.81–2.17 değerleri arasında bulmuştur [48]. Bir başka çalışmada ise demden (K/S: 2/100, 5 dak.) kloroform ekstraksiyonu uygulayarak UV spektrofotometre cihazı ile % 1.43-2.28 arasında bulmuşlardır [49]. Attila ve ark (2022) tarafından yapılan çalışmada %2.58 kafein değeri bildirilmiştir [47]. Erol ve ark. (2010) ise % 2.3-2.6 değerleri arasında daha yüksek kafein miktarları bildirmişlerdir [50]. Kaynama sıcaklığı ve karıştırma uygulanarak %kafein değerlerinin incelenmesi faydalı olacaktır.

IV. SONUÇLAR

Durgun koşullarda deme geçen kafeinin analizi, farklı demleme ve analiz koşulları için üç farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. K/S, süre ve D/K faktörlerinin incelendiği üç grup için, sıcaklık ana etkisi istatistiksel olarak farklıdır. Sıcaklık artışı ile % kafein değerleri artmaktadır. ANOVA analizlerinde üç gruptaki çalışma için de sıcaklık ana etkisi yüksektir fakat en büyük etki demleme süresinin çalışıldığı grupta izlenmiştir ($\eta^2=0.968$, $\eta_p^2=0.99$). K/S ve süre ana etkileri için farklılık ($p<0.001$) vardır fakat D/K oranı için farklılık izlenmemiştir ($p=0.052$). Üç faktör için en yüksek etki değeri K/S oranı için bulunmuştur ($\eta^2=0.13$, $\eta_p^2=0.878$). En düşük ana etki değerleri doğal olarak D/K oranı çalışması için bulunmuştur ($\eta^2=0.0068$, $\eta_p^2=0.262$) çünkü anlamlı farklılık yoktur. Her sıcaklık için K/S oranı arttıkça %kafein azalma eğilimindedir. Demleme süresi sıcaklığa çok bağlı olup, düşük sıcaklıklar uzun süre gerektirmektedir. 90 °C'de ise tüm sürelerdeki kafein miktarı istatistiksel olarak farklı değildir. Üç faktörün tüm sıcaklıktaki etkileri izlenmek istendiğinden 5 saat süre ile çalışılmıştır fakat 90 °C ve üstü sıcaklıklarda çalışılacak ise durgun şartlarda 1 saat demleme süresi yeterli olabilir. D/K oranı ana etkisi için anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen etkileşimde en yüksek etki büyüklüğü sıcaklık x D/K için bulunmuştur ($\eta^2=0.1066$, $\eta_p^2=0.850$). Düşük sıcaklıkta D/K oranı arttıkça %kafein değeri artmaktadır fakat yüksek sıcaklıklarda sonuçlar benzerdir. 90 °C'de ani düşme gösteren %kafein miktarı ve köpüklenme gibi deneysel gözlemler de göz önünde bulundurularak yüksek sıcaklıklar için 5/5 oranının kullanılmasının yanlış ölçümlere sebep olacağı bilinmelidir. Elde edilen düşük LOD ve LOQ değerlerine göre bu yöntem kafeini giderilmiş çay ve kahve, bitki çayları ve gıda ürünleri için de uygulanabilir. Kaynama sıcaklığı ve karıştırma gibi kafein difüzyonunu artıran şartların uygulanması ile daha yüksek kafein değerleri elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Komes, D., Horžić D., Belščak A., Ganič K. K. & Baljak, A. (2009). Determination of caffeine content in tea and maté tea by using different methods, *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 213-216.
- [2] Gerald, I., Arthur, D. E., & Adedayo, A. (2014). Determination of caffeine in beverages: A review. *American Journal of Engineering Research (AJER)*, 3(8), 124-137
- [3] Hancı, M., Bakırcı, S., Bayram S., Karahan S., & Kaya, E. (2013). Türk kahvesi ve Türkiye’de satılan bazı içeceklerdeki kafein miktarları. *Düzce Tıp Dergisi*, 15(3), 34-38.
- [4] dePaula J., & Farah A. (2019). Caffeine consumption through coffee: Content in the beverage, metabolism, health benefits and risks. *Beverages*, 5(37), 1-50.
- [5] Lundsberg, L.S. (1998). *Caffeine consumption*, In: Spiller, G.A. (Ed). *Caffeine. 1st ed.*, Boca Raton, FL: CRC Press; 199–224.
- [6] Weldegebreal, B., Redi-Abshiro, M. & Chandravanshi, B. S. (2017), Development of new analytical methods for the determination of caffeine content in aqueous solution of green coffee beans. *Chemistry Central Journal*, 11,126.
- [7] Tfouni, S. A. V., Camara, M. M., Kamikata, K., Gomes, F. M. L. & Furlani, R. P. Z. (2018). Caffeine in teas: levels, transference to infusion and estimated intake. *Food Science and Technology*, 38(4), 661-666.
- [8] Najafi, N. M., Hamid, A. S. & Afshin, R. K. (2003). Determination of caffeine in black tea leaves by Fourier transform infrared spectrometry using multiple linear regression. *Microchemical Journal*, 75(3), 151–158.
- [9] Atalay, D., & Erge, H. S. (2017). Determination of some physical and chemical properties of white, green and black teas (*Camellia Sinensis*). *Gıda/the Journal of Food*, 42(5), 494-504.
- [10] Wong, C. C., Cheng, K. W., Chao, J., Peng, X., Zheng, Z., Wu, J., Chen, F. & Wang, F. (2009). *Analytical methods for bioactive compounds in teas*. In: Ho, C.T., Lin, J.K., Shahidi, F. (Eds). *Tea and Tea Products: Chemistry and Health–Promoting Properties*. Boca Raton, FL: CRC Press, 77–110.
- [11] Güneş, S. (2012). Türk çay kültürü ve ürünleri. *Milli Folklor*, 24(93), 234-251.
- [12] Üstün, Ç., & Demirci, N. (2013). Çay bitkisinin (*Camellia Sinensis L.*) tarihsel gelişimi ve tıbbi açıdan değerlendirilmesi. *Lokman Hekim Journal*, 3(3), 5–12.
- [13] Maughan, R.J, & Griffin, J. (2003). Caffeine ingestion and fluid balance: a review. *J Hum Nutr Diet*, 16(6), 411–20.
- [14] Sharif, R., Ahmad, S.W., Ramzan, N. & Malik, S.R. (2013). Effect of infusion time and temperature on decaffeination of tea using liquid–liquid extraction technique. *J Food Process Eng*, 37(1), 46-52
- [15] Musilová, A. & Kubíčková, A. (2018). Effect of brewing conditions on caffeine content in tea infusions simulating home-made cup of tea. *Monash Chem*, 149, 1561–1566.
- [16] Suteerapataranon, S., Butsoongnern, J., Punturat, P., Jorpalit, W. & Thanomsilp, C. (2009). Caffeine in Chiang Rai tea infusions: Effects of tea variety, type, leaf form, and infusion conditions. *Food Chemistry*, 114, 1335–1338.
- [17] Jun, X. (2009). Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. *Journal of Food Engineering*, 94(1), 105-109.
- [18] Astill, C., Birch, M.R, Dacombe, C., Humphrey, P.G. & Martin, P.T. (2001), Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5340–5347.
- [19] Perva-Uzunalic’, A., Škerget, M., Knez, Z., Weinreich, B., Otto, F. & Grüner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, 96(4), 597–605
- [20] Rehman, R. & Ashraf, S. (2017). Analysis of caffeine contents in commercial beverages and tea samples of Pakistan using UV/Visible spectrometry. *Bulgarian Chemical Communications*, 49(4), 823 – 828.
- [21] Belay, A., Ture, K., Redi, M. & Asfaw, A. (2008). Measurement of caffeine in coffee beans with UV/VIS spectrometer, *Food Chemistry*, 108, 310–315.
- [22] Paradkar, M. M. & Irudayaraj, J. (2002). Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR–ATR spectroscopy. *Food Chemistry*, 78, 261–266.
- [23] Edwards, H. G. M., Farwell, D. W., de Oliveira, L. F. C., Alia, J-M., Hyaric, M. L., & de Ameida, M. V. (2005). FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. *Analytica Chimica Acta*, 532(2), 177-186.
- [24] Amini, T. & Hashemi P. (2018). Preconcentration and GC–MS determination of caffeine in tea and coffee using homogeneous liquid–liquid microextraction based on solvents volume ratio alteration, *Journal of Chromatography B*, 1092, 252-257.
- [25] Bhawani, S. A., Fong, S. S., & Ibrahim, M. N. M. (2015). Spectrophotometric analysis of caffeine. *International Journal of Analytical Chemistry*, 1-7.
- [26] Atomssa, T. & Gholap, A.V. (2011). Characterization of caffeine and determination of caffeine in tea leaves using uv-visible spectrometer. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 5(1), 1-8.

- [27] Wondimkun, Z. T., Jebessa, A. G., Molloro, L. H. & Haile, T. (2016). The determination of caffeine level of Wolaïta zone, Ethiopia coffee using UV-visible spectrophotometer. *American Journal of Applied Chemistry*, 4(2), 59–63.
- [28] Özçomak, M.S. & Çebi, K. (2017). İstatiksel güç analizi: Atatürk üniversitesi iktisadi ve idari bilimler dergisi üzerine bir uygulama. *Atatürk Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Dergisi*, 31(2), 413-431.
- [29] Özsoy, S. & Özsoy G. (2013). Eğitim Araştırmalarında Etki Büyüklüğü Raporlanması. *Elementary Education Online*, 12(2), 334-346.
- [30] Norouzian, R. & Plonsky, L. (2018). Eta-and partial eta-squared in L2 research: A cautionary review and guide to more appropriate usage. *Second Language Research*, 34(2), 257–271.
- [31] Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, 567.
- [32] Correll, J., Mellinger, C., McClelland, G. H. & Judd, C. M. (2020). Avoid Cohen's “small,” “medium,” and “large” for power analysis. *Trends in Cognitive Science*, 24(3), 200–207.
- [33] Fritz, C.O., Morris, P.E. & Richler, J.J. (2012). Effect size estimates: Current use, calculations and interpretation. *Journal of Experimental Psychology: General*, 141, 2-18.
- [34] Shrivastava A & Gupta V.B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. (2011). *Chronicles of Young Scientists*, 2 (1), 21-25.
- [35] Miller, J. C. & Miller, J. N. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*.(6th ed.), New York: Pearson Education Limited.
- [36] ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. European Medicine Agency, <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>. 2023.
- [37] Dobrin, S., Soceanu, A., Popescu, V., Stanciu, G. & Smalberger, S. (2013). Optimization of a UV-VIS spectrometric method for caffeine analysis in tea, coffee and other beverages. *Scientific Study and Research. Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 14(2), 71-78.
- [38] Khalid, A., Ahmad, S., Raza, H., Batool, M., Lodhi, R. K., Ain, Q. T. & Naseer F. (2016). Determination of caffeine in soft and energy drinks available in market by using UV/Visible spectrophotometer. *Family Medicine and Medical Science Research*, 5(4), 1-5.
- [39] Sereshti, H. & Samadi, S. Rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages. (2014). *Food Chemistry*, 158, 8–13.
- [40] Sivrikaya, S., A deep eutectic solvent based liquid phase microextraction for the determination of caffeine in Turkish coffee samples by HPLC-UV. (2020). *Food additives & Contaminants: Part A*, 37(3), 488–495.
- [41] Viencz, T., Acre, L. B., Rocha, R. B., Alves, E.A., Ramalho, A. R. & Benassi M.T. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids, melanoidins, and diterpenes contents of *Coffea canephora* coffees produced in the Amazon. (2023). *Journal of Food Composition and Analysis* (17), 105140.
- [42] Ohnsmann, J., Quintás, G., Garrigues, S & Guardia, M. Determination of caffeine in tea samples by Fourier transform infrared spectrometry (2002). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, 561–565.
- [43] Tabachnick, B. G., & Fidell, L. S. (2013). *Using multivariate statistics* (6th ed.). New Jersey, Pearson Education, 1072.
- [44] Leech, N.L., Barrett, K.C. & Morgan, G.A. (2005) *SPSS for Intermediate Statistics: Use and Interpretation*. 2nd Edition, Mahwah, Lawrence Erlbaum Associates, 240.
- [45] Nyamiyen, Y., Adjé, F., & Niaké, F., Koffi, E., Chatigre, O., Adima, A. & Biego, H.G. (2015). Effect of Solvents and Solid- Liquid Ratio on Caffeine Extraction from Côte d’Ivoire Kola Nuts. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 4(1), 218–222.
- [46] Ramalho, S. A., Nigam, N., Oliveira, G. B., de Oliveira, P. A., Silva, T. O. M., dos Santos, A. G. P. & Narain, N. (2013). Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea. *Food Research International*, 51, 155-161.
- [47] Polat, A., Kalcioğlu, Z. & Muezziñoğlu, N. (2022). Effect of infusion time on black tea quality, mineral content and sensory properties prepared using traditional Turkish infusion method. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 29, 100559
- [48] Özdemir, F., Nadeem, H. Ş., Akdoğan, A., Dinçer, C. & Topuz, A. (2018). Effect of altitude, shooting period, and tea grade on the catechins, caffeine, theaflavin, and thearubigin of Turkish black tea. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42(5), 334-340.
- [49] Özdemir F, Gökalp H.Y. & Nas, S. (1993). Effects of shooting period, times within shooting periods and processing systems on the extract, caffeine and crude fiber contents of black tea. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und- Forschung*, 197, 358-362
- [50] Erol, N.T., Sari, F., & Velioglu, Y.S. (2009). Polyphenols, alkaloids and antioxidant activity of different grades Turkish black tea. *Gıda*, 35, 161–168.