

**KAHVELERDEKİ KAFEİN MİKTARININ HAZIRLAMA YÖNTEMİNE GÖRE
DEĞİŞİMİNİN KROMATOĞRAFİK OLARAK İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

İpek Çiler ÇAY

Eskişehir 2019

**KAHVELERDEKİ KAFEİN MİKTARININ HAZIRLAMA YÖNTEMİNE GÖRE
DEĞİŞİMİNİN KROMATOĞRAFİK OLARAK İNCELENMESİ**

İpek Çiler ÇAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI**

**Eskişehir
Eskişehir Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Aralık 2019**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İpek Çiler ÇAY' ın "Kahvelerdeki Kafein Miktarının Hazırlama Yöntemine Göre Değişiminin Kromatografik Olarak İncelenmesi" başlıklı tezi, 25/12/2019 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Ünvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı)	:	Prof. Dr. Göksel ARLI
Üye	:	Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN
Üye	:	Prof. Dr. Sermet KABASAKAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Müdür

ÖZET

KAHVELERDEKİ KAFEİN MİKTARININ HAZIRLAMA YÖNTEMİNE GÖRE DEĞİŞİMİNİN KROMATOĞRAFİK OLARAK İNCELENMESİ

İpek Çiler ÇAY

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aralık 2019

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

Günümüzde kahve, antioksidan ve faydalı biyolojik özellikleri içermesi nedeniyle fonksiyonel bir gıda maddesidir. Kafein, Dünyanın başlıca kaynaklarından olan kahve çekirdekleri (*Coffea arabica* ve *Coffea robusta*) ve çay yaprakları (*Camellia siniensis*) ve aynı zamanda kola fıstığı (*Cola acuminata*), koka fasulyesi (*Theobroma cacao*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*) ve guarana meyvelerinin (*Paullinia cupana*) de bulunmasıyla birlikte metilksantin ailesinin bir pürin alkaloididir. Ayrıca dünya çapında 63 bitki türünün yaprakları, tohumları veya meyvelerinde doğal olarak bulunan bir maddedir. Yetişkinler için kafein dozunun <400 mg/gün olması gerekir. Fazla miktarda alındığında sinirlilik, uykusuzluk, titreme ve bilinç kaybı gibi yoksunluk belirtileri gözlenmektedir. Kafein alımının pozitif tarafı ise, tip 2 diyabet hastalığını, Parkinson ve Alzheimer gibi çeşitli hastalıkları önlemeye yardımcı olmasıdır. Ayrıca antioksidan ve anti-kanser aktivitelerine sahiptir.

Bu tez kapsamında, demleme yöntemlerine göre kahvelerdeki kafein miktarının değişimi YPSK-DAD yöntemi ile tayin edilmiştir. Kafein analizi, 274nm dalga boyu, 0,7 mL/dk akış hızı, %45 (h/h) Metanol: Su mobil fazı, PFPP (Pentaflorophenil propil) (200mm x 4.6mm x 5µm) kolonu ile 10µL enjeksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı oda şartlarında tutulmuştur. DAD dedektör ile yapılan deney basit ve hızlı işlem basamaklarına sahip olduğu için geliştirilen yöntem ile 10-50 ppm derişim aralığında kalibrasyon grafiğinden korelasyon katsayısı (r^2) 0,9998, saptama sınırı 0,088 ppm ve tayin alt sınırı 0,029 ppm olarak hesaplanarak geri kazanım çalışmasından %96,81- 101,03±2,13 sonuçları elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Kafein, PFPP Kolonu, YPSK, Mobil Faz

ABSTRACT

DETERMINATION OF CHROMATOGRAPHIC THE AMOUNT OF THE CAFFEINE IN COFFEE ACCORDING TO THE PREPARATION METHOD

Ipek Ciler CAY

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, December 2019

Supervisor: Prof. Dr. Göksel ARLI

Today, coffee is a functional foodstuff because of its antioxidant and beneficial biological properties. Caffeine, coffee beans (*Coffea arabica* and *Coffea robusta*) and tea leaves (*Camellia siniensis*), which are among the world's main sources, as well as cola nuts (*Cola acuminata*), coca beans (*Theobroma cacao*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and guarana berries (*Palexin cupana*) is a purine alkaloids of the methylxanthine family. It is a substance found naturally in the leaves, seeds or fruits of 63 plant species worldwide. For adults, the caffeine dose should be <400 mg/day. When taken in large amounts, withdrawal symptoms such as irritability, insomnia, tremor and anxiety are observed. The positive side of caffeine intake is that it helps prevent various diseases such as type 2 diabetes, Parkinson's and Alzheimer. It also has antioxidant and anti-cancer activities.

Within the scope of this thesis, the change of caffeine amount in coffee according to brewing methods was determined by HPLC-DAD method. Caffeine analysis was performed with 10 µL injection volume, 274 nm wavelength, flow rate of 0,7 mL/min, 45% (v/v) Methanol: water mobile phase, PFPP (Pentafluorophenyl propyl) (200mm x 4.6mm x 5µm) column. The column temperature was maintained at room conditions. Since the experiment with DAD detector has simple and fast process steps, the correlation coefficient (r^2) is calculated as 0.9998, the detection limit is 0.088 ppm and the determination limit is 0.029 ppm from the calibration graph in the concentration range of 10-50 ppm. %96.81- 101.03 results were obtained in recovery studies.

Keywords: Caffeine, PFPPColumn, HPLC, Mobile Phase

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında sonsuz sabrı ve anlayışını esirgemeyen, her türlü yardımda bulunan ve emeğini her zaman üzerimde hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Göksel ARLI' ya,

Tez çalışmam sırasında zamanını ve emeğini benden esirgemeyen hocam Sayın Arş. Gör. Dr. Murat SOYSEVEN,

Yüksek lisans çalışmalarım süresince Anadolu Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Kimya Bölümü ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü olanaklarından yararlanmamı sağlayan Bölüm Başkanlığı ve Dekanlığına,

Tez süreci boyunca yanımda olan, dertlerimi dinleyen, yardımlarını destekleyen Nalan Yılmaz, Selen Duygu ÇEÇEN; üniversite hayatım boyunca her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Selin KARADAĞ' a,

Sevgisini, ilgisini ve desteğini benden esirgemeyen, iyi ki tanıyışım dediğim sevgili Andre Dante Alves Pinto MACHADO,

En önemlisi maddi ve manevi destekleriyle her anımda yanımda olan aileme, sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İpek Çiler ÇAY

Aralık 2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İpek Cile GAY

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stage of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kahvenin Tarihçesi	4
2.2. Kahve ve Türk Kahvesinin Özellikleri	5
2.3. Dünyada ve Türkiye’de Kahve Üretimi ve Tüketimi	7
3. KAFEİN	8
3.1. Kafeinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	11
3.2. Kafeinin Sağlığa Etkisi	12
3.2.1. Kafeinin bilişsel etkileri	12
3.2.2. Kafeinin fizyolojik etkileri	13
3.2.3. Kafeinin sosyal, duygusal ve davranışsal etkileri... ..	13
3.3. Kafeinin YPSK ile Yapılan Çalışmaları	15
4. KROMATOĞRAFİ	21
4.1. Kromatografinin Mekanizma Yönünden Sınıflandırılması.....	21
4.1.1. Dağılma kromatografisi.....	21
4.1.2. Adsorpsiyon kromatografisi.....	22
4.1.3. İyon değiştirme kromatografisi	22
4.1.4. Molekül seçme kromatografisi.....	22
4.1.5. Affinite kromatografisi	23

	<u>Sayfa</u>
4.1.6. Kiral kromatografisi	23
4.2. İki Fazın Polarlık Durumuna Göre Sınıflandırma... ..	23
4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	24
4.3.1. Çözücü seçimi	24
4.3.2. YPSK sisteminde kullanılan pompalar	24
4.3.3. YPSK sisteminde kullanılan kolonlar	25
4.3.4. YPSK sisteminde kullanılan dedektörler	25
4.3.5. Ultraviyole/ görünür ve foto diyot dizisi dedektörü (DAD)	26
5. GEREÇLER.....	27
6. YÖNTEMLER	28
6.1. Hareketli Fazın Hazırlanışı	28
6.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı	28
6.3. Kahve Örneklerinin Hazırlanışı	28
6.4. Analiz Parametreleri.....	28
6.5. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	29
7. BULGULAR VE TARTIŞMA	30
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKÇA	45
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1	Farklı ölkelerde Türk kahvesi	4
Tablo 2.2	Kahve türleri ve üretildikleri ölkeler	6
Tablo 3.1	Kahve çeşidine göre kafein miktarı	9
Tablo 4.1	Kafeinin fiziksel ve kimyasal özellikleri	12
Tablo 5.1	Sıvı kromatografisi kullanılarak yapılan çalışmalar	19
Tablo 6.1	Kimyasal maddeler	27
Tablo 6.2	Cihaz ve aletler	27
Tablo 7.1	Kafeinin fiziksel ve kimyasal özellikleri	31
Tablo 7.2	Sistem uygunluk testleri	33
Tablo 7.3	Yöntemin doğruluğuna ilişkin yapılan çalışmaların sonuçları	34
Tablo 7.4	Kesinlik çalışmalarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	34
Tablo 7.5	Gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin değerlendirilmesi	35
Tablo 7.6	Sapma sınırı ve tayin alt sınırı değerleri	35
Tablo 7.7	Sıcaklık farklarına göre kafein miktarları	39
Tablo 7.8	Neskafe örneklerindeki kafein miktarları	39
Tablo 7.9	Türk Kahve örneklerindeki kafein miktarları	39
Tablo 7.10	Soğuk kahve örneklerindeki kafein miktarları	40
Tablo 7.11	Aromalı kahve örneklerindeki kafein miktarları	40
Tablo 7.12	Filtre kahve örneklerindeki kafein miktarları	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1	Kahvenin üretim aşaması	3
Şekil 3.1	Kahvenin bozunma mekanizması	10
Şekil 3.2	Kafein ve adenozin molekül yapılarının benzerliği ve aynı reseptöre bağlanması	11
Şekil 4.1	Kafein molekülü	11
Şekil 5.1	25 ppm derişiminin farklı dalga boylarındaki maksimumu	30
Şekil 5.2	Standartların tek bir kromatogramda gösterimi	33
Şekil 5.3	3 ü 1 arada kahve örneğinden elde edilen kromatogram	36
Şekil 5.4	K. Türk kahvesi örneğinden elde edilen kromatogram	37
Şekil 5.5	Filtre kahve örneğinden elde edilen kromatogram	37
Şekil 5.6	Sultan kahvesi örneğinden elde edilen kromatogram	38
Şekil 5.7	Melengiç kahvesi örneğinden elde edilen kromatogram	38
Şekil 5.8	Neskafe örneğinin sıcaklıkla değışimi	42
Şekil 5.9	Filtre kahve örneğinin sıcaklıkla değışimi	42
Şekil 5.10	Türk kahvesi örneğinin sıcaklıkla değışimi	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN		Asetonitril
As	:	Asimetri faktörü
BSS	:	Bağıl standart sapma
C	:	Derişim
DAD	:	Diyot dizisi dedektörü
FDA	:	Birleşik Devletler Gıda İlaç Dairesi
$GA_{\alpha=0,005}$	:	Güven aralığı (0,005 anlamlılık düzeyi)
GRAS	:	Genel olarak güvenilir kabul edilen
ICH	:	Uluslar arası Harmonizasyon Konferansı
k	:	Kapasite faktörü
LC	:	Sıvı kromatografisi
LLOQ	:	En küçük tayin litimi
LOD	:	Saptama tayini
LOQ	:	Tayin alt sınırı
MDL	:	En küçük ölçüm sınırı
MeOH	:	Metanol
MSS	:	Merkezi Sinir Sistemi
n	:	Veri sayısı
PFPP	:	Pentaflorofenil propil
r^2	:	Korelasyon katsayısı
SS	:	Standart sapma
SUT	:	Sistem uygunluk testi
T	:	Sıcaklık
TGK	:	Türk Gıda Kodeksi
UV	:	Mor ötesi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kahve çekirdeklerinin kavrulması ve demlenmesiyle elde edilen kahve dünyada en çok tüketilen bir içecektir ve kahvelerde bulunan kafein aktif bir farmakolojik madde olmasıyla birlikte metilksantin grubunun (1,3,7-trimetilksantin) bir kimyasal bileşiğidir. Kafein; kahve fasulyesi, çay yaprağı, kola meyvesi ve kakao tohumlarında bulunur [1, 2].

Amerikan Gıda İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) raporuna göre 22 yaş ve üzeri Amerikan halkının %97'sinden fazlasının kafein maddesini içeren ürünleri 300 mg civarında tükettiği açıklanmıştır [3]. Bir fincan kahvede bulunan kafein miktarı (150 mL) 60 ile 120 mg aralığındadır [4].

Kafeinin fizyolojik etkileri arasında metabolizma, solunum hızında, diürez ve kan basıncında artma görülmektedir [4, 5]. Kafeinin yarı ömrü 4-6 saattir [6]. Kafein mide ve ince bağırsakta hızlıca emilerek beyin dâhil tüm dokulara hızlı bir şekilde yayılır [5] ve ilk karaciğerde metabolize olmaktadır [7].

Sinirlilik, uykusuzluk, baş ağrısı, taşikardi ve sindirim sorunları kafeinin yan etkileridir. Bu yan etkiler çocuklarda aşırı kusma, merkezi sinir sistemi ajitasyonu ve diürez şeklinde görülür. Kafeinin günlük kullanımı 4-7 kupa (500-600 mg) üzeri sağlıkta önemli sorunlara neden olur [4, 8].

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) birçok alanda olduğu gibi gıdaların analizinde de sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu çalışmada, farklı sıcaklıklarda hazırlanan çeşitli kahve örneklerindeki kafein miktarları YPSK-DAD dedektörü ile analiz edildi. Sonuçların kesin, doğru ve hızlı bir şekilde YPSK yöntemi ile geliştirilmesi ve yöntemin tam olarak valide edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kahve kafein, diterpen alkoller (serum kolesterolü uyarıcısı) ve klorojenik asit gibi bir çok biyolojik aktif bileşiği barındıran kompleks bir içecektir [9]. Diterpen bileşikler; kafestol ve kahveol yağda çözünen bileşenleri olup bunlar kahve çekirdeğinden çıkarılan yağda bulunur. Bu bileşiklerin konsantrasyonu kahvenin hazırlama yöntemine göre değişmektedir. Kafein, filtre edilmiş kahvede 0,1 mg/100 mL' den az, filtresiz kahve de ise 0,2 ve 18 mg/ 100 mL arasında bulunur. İskandinav, Fransız pres ve Türk kahvesinde yüksek miktarlarda bulunmaktadır [10]. Kahvede bulunan kafestol ve kahveol yağları, yüksek ısıda ve uzun süre pişirildiği zaman daha yüksek derişimlerde bulunur [5].

Kahvenin üretimi için gerekli olan ekolojik koşullar vardır. Bu koşullar şu şekilde özetlenir:

- ✓ *Sıcaklık:* Kahve üretiminde sıcaklık önemlidir. Bir kahve 14 ila 26 °C aralığında iyi büyümektedir. Arabica kahvesi, 30° C sıcaklıklara tolerans gösterir. Aşırı sıcaklık değişiklikleri ekinleri ve kahve çekirdeklerini etkiler. Yüksek sıcaklıklar, kahvenin büyümesi ve olgunlaşması için gereklidir çünkü düşük sıcaklıklar büyümeyi geciktirmektedir.
- ✓ *Yağış:* Yağış kahve bitkisinin çiçeğini etkilediği için yağış alan tarlalarda ekim yapılmalıdır.
- ✓ *Topraklar:* Kahve, dünyanın birçok yerinde ve farklı topraklarda yetişse de en uygun toprak tipi volkanik topraklardır. Kahve bitkisi nötr zeminde yetişmesine rağmen optimum pH 5,3 ila 6,0 aralığındadır.
- ✓ *Yükseklik:* Kahve bitkileri, 610 m ile 1.830 m yüksekliği arasında yetiştirilmektedir. Rakımın düşük olduğu bölgelerde yetişen kahve bitkileri de vardı [11].

Ticari kahvede bulunan kafein ve polifenol bileşikleri, sadece kahve çekirdeği türleri, çeşitliliği ve coğrafi kökenlerinden değil, ayrıca kavurma koşullarından da oldukça etkilenebilmektedirler [12, 13, 14]. Kavurma işlemi, kahve çekirdeklerinde uçucu ve uçucu olmayan bileşikleri oluşturur. Kavrulmuş bir kahvedeki uçucu bileşikler, kahvenin karakterini ve kalitesini belirlemede önemli bir rol oynar [15]. Kahve tanelerinin kavrulması esnasında 4 önemli reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyonlar;

- 1- Maillard reaksiyonu (esmerleşme): nitrojen içeren maddelerle (aminoasit, proteinler, trigonellin ve serotonin) karbonhidratlar (şekerler) arasındaki reaksiyondur.
- 2- Bazı amino asitlerin bozunması; özellikle sülfür aa' ler, hidroksi aa ve prolin.
- 3- Şekerin bozunması sonucu karamel benzeri ürünlerin oluşması
- 4- Fenolik asitlerin bozunması [15].

Güney Afrika Cumhuriyeti Tarım, Orman ve Balıkçılık Dairesi tarafından hazırlanmış rehberde göre kahvenin üretim aşaması şekil 2.1.'de gösterilmiştir [11].



Şekil 2.1. Kahvenin üretim aşaması

2.1 Kahvenin Tarihçesi

Kahve, günlük hayatımızın bir parçası olarak sosyal hayatımızı canlı tutan bir sosyalleşme aracıdır. Kahve bitkisi, kendine has kokusu ve tadına sahip oluşuyla özel anların vazgeçilmezidir [16]. Tarih boyunca kahveye yönelik yasaklamalara ve inançlara rağmen kahve ritüelleri hala yaygındır. Kahve farklı kültürlerde ve farklı şekillerde hazırlanmasına rağmen insanlar arasındaki bağı ve dostluğu güçlendirir [17].

Kahvenin kökeni tam olarak bilinmese de bununla ilgili çeşitli belgeler vardır. Sir James Murray göre, “kahve” bir Afrika sözcüğü olduğunu ve Afrika dilinden geldiğini iddia eder [18]. “Kaffa” olarak adlandırılan kahve, Etipyo Bölgesi’nin Soha şehrinde Afrika yaylasında birincil üretim merkezi ve anavatanı olarak kabul edilir [19]. Başka bir belge de ise, kahve kelimesinin Arapça’dan geldiği söz edilir. Kahve meyvesine Arapça’da “kahva” denilir [17, 20]. Arapça “Kahva”, “Kaffa” kelimesinin değiştirilmiş halidir. Kahve kelimesi Türkçe’de, bu bitkinin fasulyeleri kaynatılıp demlenerek bir içecek olarak kullanılmasıdır [19, 21]. Türk kahvesi her ülkelerde farklı isimlendirilir. Farklı ülkelerdeki Türk kahvesinin karşılığı Tablo 2.1.’de yer almaktadır [22].

Tablo 2.1.. Farklı ülkelerde Türk kahvesi

Ülkeler	Yerel terimler	Türkçe eşdeğeri
Arnavutluk	afe türk	Türk kahvesi
Arap dünyası	qahoua 'arabiyah	Arapça kahve
Ermenistan	surç	Kahve
Bosna Hersek	Bosanska Kahva	Boşnak kahvesi
Bulgaristan	Турско Кафе	Türk kahvesi
Hırvatistan	Turska Kava	Türk kahvesi
Kıbrıs	kypriakós kafés κυπριακός καφές	Kıbrıs kahvesi
Yunanistan	ελληνικός καφές	Yunan kahvesi
Macaristan	török kávé	Türk kahvesi

Eski kaynaklar, kahve kökeni hakkındaki belgelerin birbirine yakın olduğunu gösterir [17]. İlk kahveyi içen kişinin kim olduğu ile ilgili yazılı bir kanıt olmamasına rağmen; en yaygın tartışma, Yemen’de yaşayan Khaldi adındaki çobana aittir. Khaldi, keçilerinin parlak ve koyu yapraklı bir ağaçta bulunan kırmızı renkli meyveleri yediğini

ve sonra da onların dans ettiklerini görür. Daha sonra kendisi de yer ve uyarıcı etkisini üzerinde gözlemledikten sonra bu bitkinin bazı yapraklarını toplar ve bir içecek yaparak bölgedeki tüccarların dikkatini çeker ve bu şekilde yayılmaya başlar [23]. Kâtip Çelebi'ye göre Şeyh Şazeli, öğrencisi Şeyh Ahmet ile 1258'de hacca giderken kendisine verilen kahve tohumlarını kaynatıp içer. Bu şekilde yayılmasıyla, kendisine kahve satıcıları tarafından “pir” (baba, usta) denilmiştir [24].

Edinilen kanıtlara göre kahve aslında Afrika'dan gelir ve Etiyopya'dan gelen kahve tohumlarının Yemen'e ve sonrada Orta Çağ'ın sonuna doğru Mekke ve Medine'ye yayıldığı bilinmektedir. Kahve, Müslümanların hac ziyaretinde ve ülkelerine geri dönerken kahveyi götürmeleriyle yayılmaya başlar. Kahvenin, 14. Yüzyılda Yemen'de başlayan hikâyesi, 15. Yüzyılda Mekke ve Medine'ye ulaşır ve daha sonra da Kahire, Şam, Halep ve İstanbul'a ulaşır [25].

Kahvenin Osmanlı kültürüne girişi ile ilgili çeşitli bilgiler vardır. Bu konuyla ilgili farklı tarihlerde farklı bilim adamları değişik görüşler ileri sürmüşlerdir. Fernard Braudel, 1511 yılında kahvelerin ilk kez Osmanlılar tarafından kullanıldığını söylerken, Ulla Haise ise, ilk kahve kullanımının Yavuz Sultan Selim'in Mısır'ı fethettiği yıla (1516) denk geldiğini söylemektedir [26]. Burak Evren ise 1519 yılında Yemen'den Mısır'a ulaşan kahvenin daha sonra İstanbul'a getirildiğini öne sürmektedir [27]. Kanuni Sultan Süleyman döneminde (1529-1566) kahve kullanımı yaygınlaşarak İstanbul, kahve kültürünün önemli merkezlerinden biri olmuştur.

Osmanlı Devleti, 16. Yüzyılda Batı ülkelerine kahveyi getirmiş ve kahvenin giriş kapısı İtalya'dır [16]. 17. Yüzyılın sonlarında Avrupa'nın çoğunda biliniyordu ve 19. Yüzyılın ortalarında ise ticari açıdan çok önemli bir ürün haline geldi [28].

2.2. Kahve ve Türk Kahvesinin Özellikleri

Rubiaceae familyasına ait olan kahve, coffea ağacının genel adı olmasıyla birlikte bu ağacın meyvelerinden elde edilmektedir [29]. Bu ağacın kökeni Arap Yarımadası'na kadar uzanır ve ayrıca tropik bölgelerde yetişir. Coffea ağacının meyveleri vişne, yaprakları da yasemininkine benzemektedir. Aynı alanda yetişen ürünler bile tat, koku ve yağ asidi oranı bakımından farklılık gösterebilmektedir [16], [17]. Bir kahve ağacı 8-10 m kadar büyüyebilir; fakat üretimi için 2-3 m kadarına izin verilir. Ayrıca bir kahve ağacının ortalama yaşam süresi 30 ila 40 yıl arasındadır [30].

Kahve çeşitleri gün geçtikçe artış göstermektedir. Önde gelen kahve türleri ve üretildikleri ülkeler Tablo 2.2.'de gösterilmiştir. [31].

Tablo 2.2. Kahve türleri ve üretildikleri ülkeler

Kahve türleri	Ülkeler
Arabica	Kolombiya, Brezilya, Kamerun, Kosta Rika, Ekvator, Etiyopya, El Salvador, Kenya, Meksika, Tanzanya, Guatemala ve Havai.
Mavi dağ	Jamaika
Bourbon Santos	Brezilya
Mocha	Yemen
Robusta	Kamerun, Cava, Güneydoğu Asya, Hindistan ve Doğu Afrika sahil şeridi
Maracaibo	Venezuela

Yeşil kahve çekirdeklerinin çoğu iki türden üretilir: Arabica (*Coffea arabica*) ve Robusta (*C. canephora*). Bu iki kahve çekirdeği arasındaki farklar ise,

- Arabica, ilk keşfedilen ve büyümesi zor olan bir kahve çekirdeğidir. Bir kilogram kavrulmuş kahve için yaklaşık olarak 8 bin fasulyeye ihtiyaç duyulur. Arabica dünyanın kahve üretiminin %75'ini oluştururken Arabica kahvenin üreticilerinden olan Brezilya ve Kolombiya yoğun tat ve aromayı sunar [30, 31]. Arabica fasulyeleri Robusta fasulyelerinden çok daha lezzetlidir [32]. Ham Arabica kahvesinin kafein içeriği % 0.9-1.4 aralığındadır [33].
- Robusta ise, standart kalitede kahvenin üretilmesinde kullanılan bir kahve çekirdeğidir. Çeşitli yükseklik ve iklime karşı Arabica kahvesine göre daha dirençli, ucuz ve yüksek verimli oluşuyla hazır kahveler de daha çok tercih edilir. Robusta kahvesinde kafein miktarı %1,5 ila %2,6 arasında değişir [33]. Arabica kahvesine göre yeni bir tür olmasıyla birlikte yaklaşık olarak iki kat daha fazla kafein içermektedir [30, 31]. Robusta fasülyeleri, acı bir demleme üretimine, küflü bir tada ve daha güçlü bir gövdeye sahip oluşuyla diğerlerinden ayrılır [32].

2.3. Dünyada ve Türkiye’de Kahve Üretimi ve Tüketimi

Kahve, petrolden sonra dünyadaki en önemli ve en büyük ikinci ticaret alanına sahiptir. 70 civarında çeşitli kahve olduğu bilinmektedir. Ticari anlamda kullanılan kahve türleri *coffea arabica* ve *coffea robusta*dır [34].

Kahve 60 dan fazla ülkede üretilmektedir. Fakat en çok kahve üretilen ülkeler ise Brezilya (5.210 milyon/torba), Vietnam (2.860 milyon/torba) ve Kolombiya (1.460 milyon/torba) dır. Uluslararası Kahve Organizasyonun verilerine bakıldığında ihracat eden ülkelerin toplam kahve üretimi ise 1060 kg/ torbadır. Ve ayrıca Arabica kahvesinin üretimi Robusta kahvesinden yüksektir [35].

Kişi başına yılda tüketilen kahve miktarının 0,1 kg olduğu görülmektedir [36]. Avrupa’da kişi başına yıllık kahve tüketimi 5-6 kg, İskandinav ülkelerinde ise 11-12 kg olduğu belirtilmiştir. Türkiye’de yıllık hazır kahve tüketimi 10-12 fincan/kişi, Avrupa’da ise 175-200 fincan/kişi olurken filtre kahve tüketimi Türkiye’ de yıllık 1 fincan/kişi, Avrupa’da ise 560-600 fincan/kişi olduğu belirtilmiştir [37]. Dünyada kişi başına yıllık kahve tüketiminin en yüksek olduğu ülkeler; Finlandiya 11,7 kg, Norveç 9,4 kg, Danimarka 8,9 kg, İsveç 8,1 kg, İsviçre 7,4 kg, Almanya 6,8 kg, Avusturya 6,8 kg, Belçika 6,4 kg ve Hollanda ise 6,3 kg’ dır [38].

3. KAFEİN

Kahve gün içerisinde en fazla içilen ve hoş tadı, aroması, uyarıcı etkisi ve sağlık üzerindeki bilinen etkileriyle dünyanın en çok tüketilen içeceğidir. 80 den fazla kahve türleri vardır. Bunlardan *Coffea arabica* ve *Coffea robusta* kahve pazarındaki payı en yüksek olanlarıdır [39]. Kahvenin içerisinde bulunan bileşiklerden biri ve metilksantin ailesinin bir pürin alkaloidi olan kafeindir. Dünya çapında 63 bitki türünün yaprakları, tohumları veya meyvelerinde doğal olarak bulunan bir maddedir. Kafeinin, dünyanın başlıca kaynakları kahve çekirdekleri *Coffea arabica* (%70) ve *Coffea robusta* (%30; asidik ve sindirimi zor) ve çay yaprakları (*camellia sinensis*) dir. Aynı zamanda kola fıstığı (*cola acuminata*), koka fasulyesi (*theobroma cacao*), yerba mate (*ilex paraguariensis*) ve guarana meyvelerinde (*paullinia cupana*) bulunur. Çoğu kafein, kahve, çay ve meşrubat ("enerji içecekleri" dâhil) gibi içeceklerle tüketilirken, kakao veya çikolata içeren ürünler ve bazı analjezik formülasyonlar ve diyet takviyeleri gibi ilaçlarda da bulunurlar [40]. FDA tarafından kafeinin bir katkı maddesi olarak kullanımı uygun görülmesiyle birlikte aroma maddesi olarak alkolsüz içeceklere eklenmektedir [41].

Kahvenin kalitesi kafeinin içeriğine bağlıdır. Gıda ürünlerindeki kafein miktarı porsiyona, cinsine ve hazırlama yöntemine göre farklılık gösterir. Kahve çekirdeklerinin cinsi, nerede yetiştiği, hangi yollarla üretildiği, hasat edildiği ve demlendiği önemlidir [40]. Genellikle çok kavrulmuş kahve, az kavrulmuşu göre daha az kafeine içeriğine sahiptir. Çünkü kavurma işlemi çekirdeğin kafein içeriğini azaltır. Demleme gücü, yetiştirme koşulları, işleme teknikleri ve diğer değişkenler kafein içeriğini etkiler. Çay yaprakları kahve çekirdeklerinden daha fazla kafein içerir. Fakat demlenmiş bir bardak çay içerisindeki kafein miktarı, bir bardak kahve içerisindekinden daha azdır [42].

Kafein, 200 ppm seviyesine kadar genel olarak güvenli kabul edilir (GRAS). Kahvenin kafein içeriği, 1967 Gıda Yasasında belirtilen zorunlu standartlara göre %2 den ve kuru bazda %1 den az olmamalıdır [43]. Ayrıca, Piyasada tüketilen kahvenin güvenliğini sağlamak için ulusal standardizasyon ajansı kahvede kafein seviyelerinde 150 mg/gün ve 50 mg/servis arasında değişen standartlar belirlemişlerdir. FDA, yetişkin için kafein dozunun < 400 mg/gün olmasına izin verilir [44]. Bir fincan yaklaşık 80-120 mg kafein içerir ve normal kafein tüketiminin sağlığı tehdit edecek bir riske yol açmadığı belirtilmektedir [45]. Ek olarak, hem Amerikan Tıp Derneği hem de Amerikan Kanseri Derneği belirlenen düzeyde kafein tüketiminin güvenli olduğunu belirtmiştir.

Aşırı kafein kullanımı (>250 mg/gün) kafeinizm olarak adlandırılır ve birçok rahatsızlıklara neden olur. Kafein bağımlısı kişilerde sinirlilik, huzursuzluk, uykusuzluk, baş ağrısı, kalp çarpıntısı gibi belirtiler görülmektedir [46].

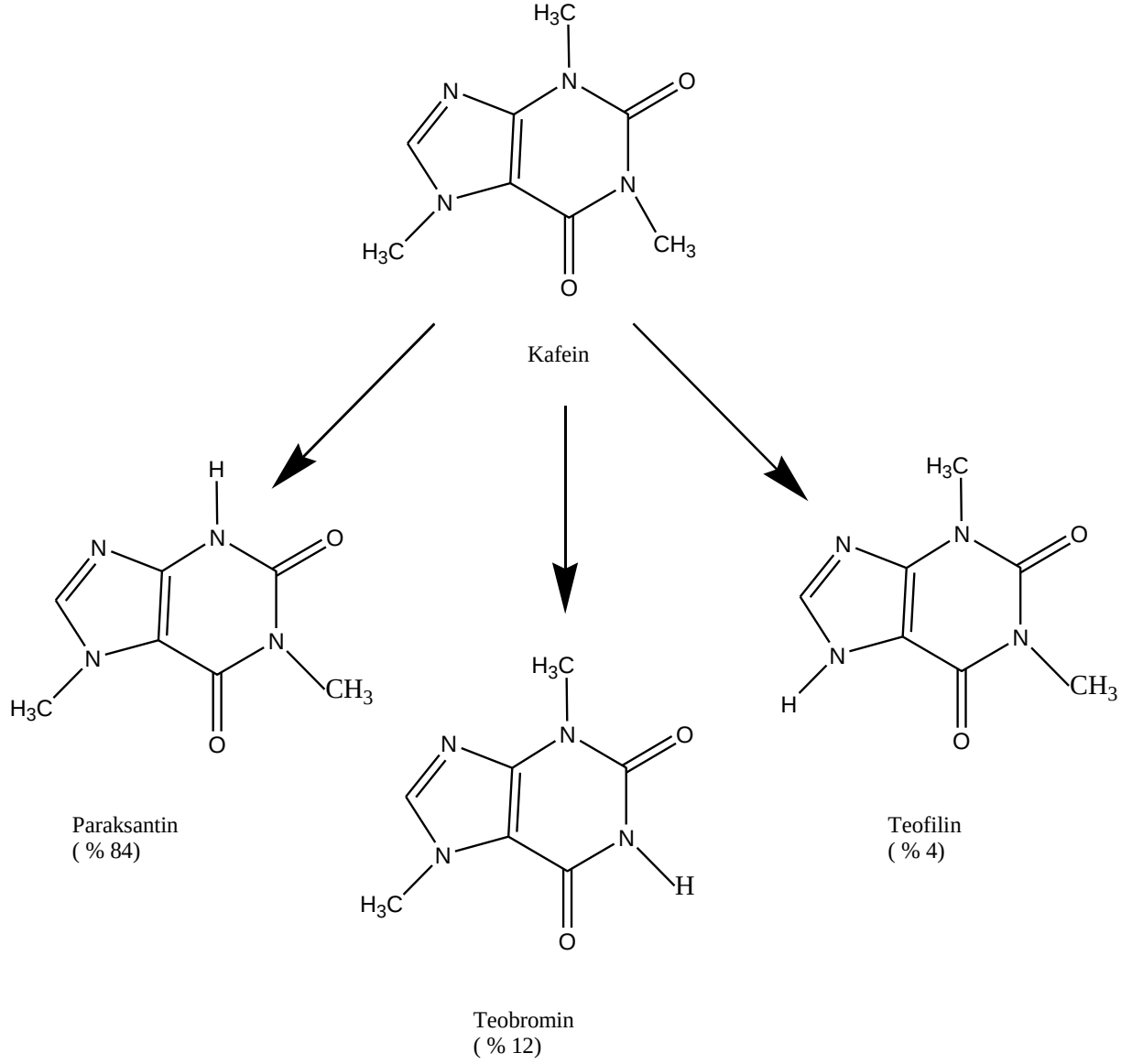
Amerika’da kahve satılan yerlerden alınan 240 mL demlenmiş 14 farklı özellikteki kahvelerdeki kafein miktarları 72-130 mg aralığında bulunmuştur [47]. Aynı dükkândan 6 farklı günde alınan aynı tip 240 mL kahvedeki kafein içeriğinin ise 130 ila 282 mg arasında değiştiği gözlemlenmiştir [28]. Belli standartlardaki kahvelerin kafein içeriği farklı olduğundan kimse bir fincan kahvedeki ortalama kafein miktarını kesin olarak belirleyemez [6]. Kahve çeşidine göre kafein miktarı tablo 3.1.’de verilmiştir [48].

Tablo 3.1. Kahve çeşidine göre kafein miktarı

Filtre kahve (240 mL)	95-330 mg
Kafeinsiz filtre kahve (240 mL)	3-12 mg
Espresso (30 mL)	50-150 mg
İstant kahve (240 mL)	30-70 mg

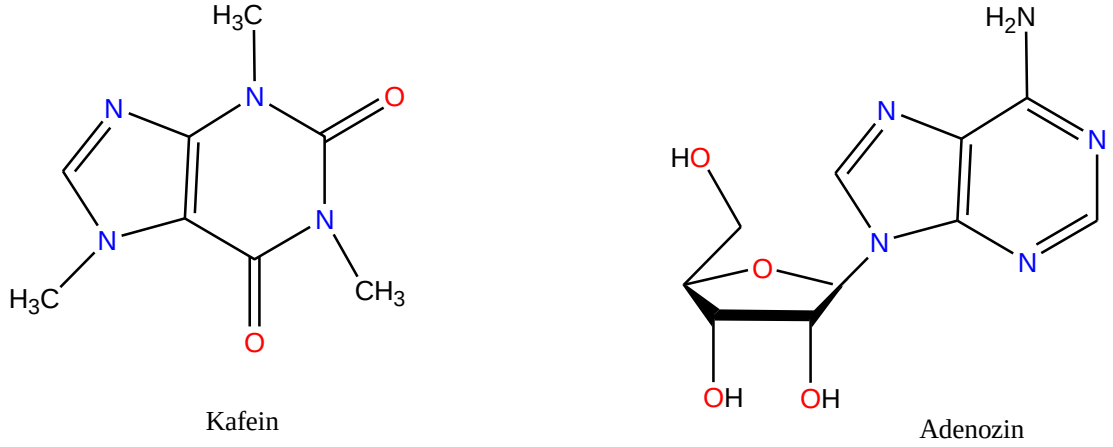
Kafein vücuda alındıktan sonra hızlıca gastrointestinal kanaldan kan dolaşımına geçer ve 1-1,5 saat sonra en üst seviyeye ulaşır. Hızlıca tüm vücuda yayılan kafein kan beyin bariyerini geçer. Kafeinin anne sütünden fetüse, plasenta yoluyla da amniyotik sıvıya geçişi olmaktadır. Kafeinin ilk metabolize olduğu yer karaciğerdir [8],[49]. Kafeinin yarılanma ömrü 3 ile 7 saat arasında değişmekle birlikte cinsiyet, yaş, gebelik ve sigara kullanımı gibi faktörlerden etkilenir. Kafeinin yarılanma ömrü erkeklerde kadınlara göre %20-30 oranında daha yüksektir [8].

Kafein, karaciğerde çeşitli enzimler vasıtasıyla paraksantin (% 84), teobromin (% 12) ve teofilin (% 4) metabolitlerine bozunur. Kafeinin bozunma mekanizması Şekil 3.1.’de verilmiştir. Paraksantin metaboliti (1,7-dimetilksantin); merkezi sinir sistemini (MSS) uyarır [50]. Kan damarlarını genişleten ve idrar miktarını arttıran metabolit ise teobromin (3,7-dimetil-1H-pürin-2,6-dion) dir. Damarları genişlettiği için yüksek tansiyon tedavisinde kullanılır [51]. Teofilin (1,3-dimetil-7H-pürin-2, 6-dion) ise düz kasları ve bronşları rahatlatıcı etkisi vardır. Bu sebeple astım tedavinde bu metabolitten yararlanılmaktadır. Teofilin ayrıca kalp hızının, kan basıncının ve böbrek kan akımının arttırmasının yanında MSS üzerinde de uyarıcı etkisi vardır [52].



Şekil 3.1. Kafeinin bozunma mekanizması

Kafein santral sinir sisteminde uyarıcı etki gösterdiğinden dolayı kahve sadece uyanık kalmak ve yorgunluğu önlemek amacıyla da içilmektedir. Kafeinin uyanık tutma mekanizması Şekil 3.2.'de verilmiştir.

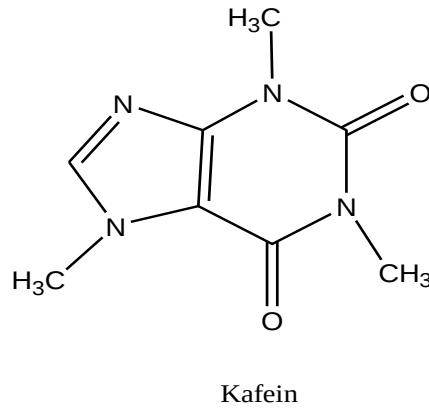


Şekil 3.2. Kafein ve adenozin molekül yapılarının benzerliği ve aynı reseptöre bağlanması

İki üç fincan kahve içildikten sonra plazmadaki kafein düzeyi 20-40 $\mu\text{mol/L}$ ' ye ulaşır. Daha sonra kafein santral ve periferik sinir sistemindeki adenozin reseptörlerine antagonist bağlanarak tersi bir etki göstermiş olur. Böylece vücuda kafein alındığı zaman kişinin uyanık kalmasına ve yorgunluğunun azalmasına neden olur [4, 5, 6].

3.1. Kafeinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kafeinin kimyasal şekli aşağıdaki Şekil 4.1.'de, fiziksel ve kimyasal özellikleri de tablo 4.1.'de verilmiştir [40]:



Şekil 4.1. Kafein molekülü

Tablo 4.1. *Kafeinin fiziksel ve kimyasal özellikleri*

Moleküler Formül	$C_8H_{10}N_4O_2$	pH	pH = 6.9 (1% çözelti)
Sistemik Adı	1,3,7-trimetilksantin	Kaynama Noktası	352 ° F, 178° C
IUPAC Adı	1,3,7-trimethylpurin-2,6-dion	Erime Noktası	460 ° F, 238 °C
Molekül Ağırlığı	194.194 g / mol	Yarılma Ömrü	5-6 saat
Yoğunluğu	1.23 g/cm ³	Suda Çözünürlüğü	% 2.17
Rengi/ Formu	Beyaz, prizmatik kristal	Çözünürlükleri	1 g 46 mL suda, 1.5 mL kaynar suda, 66 mL alkolde, 50 mL asetonda, 5.5 mL kloroform, 530 mL eter, 100 mL benzen,
Koku	Kokusuz	Tat	Acı tat

3.2. Kafeinin Sağlığa Etkisi

Kafein, en yaygın kullanılan uyarıcı bir bileşiktir [53]. Kafein çocuklardan yetişkinlere kadar herkesin tükettiği bir madde olup soda, çay ve enerji gibi içeceklerin içinde bulunur [54, 55]. Genç ve ergenlerde fazla miktarda kafein tüketimi, risk alma eğilimi, alkol tüketimi, sigara içimi ve ölüm artışı ile bağlantı kurulmuştur [56, 57]. Amerikan Pediatri Akademisine göre, çocuklar için kafein tüketiminin sınırlandırılması ve enerji içeceklerinin tüketilmemesi önerilmiştir [58]. Alınan kafeinin çocuklar üzerindeki fizyoloji, ruh hali ve davranışlarına etkisi araştırılmıştır. Yüksek dozlarda kafein tüketimi (> 400 mg), özellikle de çocuklarda fizyolojik, psikolojik ve davranışsal zararlara neden olabilmektedir [59].

3.2.1. Kafeinin bilişsel etkileri

Kafein, hayvanlarda ve insanlarda merkezi ve çevresel sinir sistemi uyarıcısıdır. Çocuk ve gençlerde kafein tüketiminin akut etkileri, uyarılma, dikkat dağılımı ve hareketliliğin artmasıdır [60, 61, 62]. Orta seviyede kafein alımı (200-300 mg) ise iyilik hissi verirken, konsantrasyonu artırarak uyarılma ve enerji artışına neden olur. Yetişkinlerde, yüksek dozlarda kafein miktarı (>400 mg) ise, anksiyete, bulantı, titreme ve gerginliğe sebep olmaktadır [63, 64]. Çocuklarda aynı etkiler düşük miktarlarında (100-400 mg) gözlenmektedir [65].

Kafeinin bilişsel performansı arttıran birincil mekanizması, kafeinin geri çekilmesiyle oluşan zararlı etkilerini tersine çevirmesidir [66]. Çocuklar ve ergenler kafeini günlük dozun altında kullanırlar ve yetişkinlere göre daha az yoksunluk

belirtileri gösterirler. Bu sebepten dolayı kafeinin etki mekanizması da gençlerde farklılık gösterebilir [67, 68].

3.2.2. Kafeinin fizyolojik etkileri

Kafeinin en yaygın bilinen etkilerinden birisi yorgunluk ve uykunun azalmasıdır [69]. Geç saatlere doğru alınan kafein uykusuzluk, uyku kalitesinde düşüş ve uyku süresinde azalmaya sebep olur [70]. Ayrıca, uyandığında yorgunluk hissine neden olup uyanık kalmak için kafein alımına teşvik eder [71]. Çocuk ve ergenlerde uyku bozukluğu yüksektir ve kafeinin de uyku düzensizliğini arttırdığı bilinmektedir. Büyüme çağındaki çocuk ve gençlerin uyku bozukluklarına neden olarak gelişimlerini ve sağlıklarını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu sebepten ötürü, çocuk doktorları genç ve çocuklar için kafein içeren gıdaların uyumadan önce alınmamasını ve gün içinde de kafein alımının sınırlı olması gerektiğini söylemektedirler. Yüksek miktarda (>400 mg) kafein intoksikasyona neden olup taşikardi, yüksek kan basıncı ve kalp ritminin artması ile sonuçlanır [72, 73, 74].

3.2.3. Kafeinin sosyal, duygusal ve davranışsal etkileri

Kafein tüketimi ile sosyal, duygusal ve davranışsal sağlık sonuçları arasında negatif bir ilişki vardır. Kafein tüketimi her ne kadar dikkati arttırsa da, alışkanlıkla tüketilen kafein, çocuklarda bırakıldıktan sonra dikkat azalmasına neden olur. Bazı araştırmalar, gençlikte kafein tüketimi öfke, uyuşturucu, alkol alımı gibi uzun süreli davranış sorunlarını ortaya koymaktadır [69].

Kafein duyarlılığı birçok faktöre bağlıdır. Bunlar; günlük kafein alım sıklığı ve miktarı, vücut ağırlığı, fiziksel durum ve sinirlilik düzeyidir [75]. Yüksek miktarda (yani, birkaç gram) kafein alımı zehirlenme ve daha sonra da ölüme sebep olduğu bilinmektedir. Aşırı kafein alımı kişiden kişiye farklılık göstermesiyle birlikte kafein toleransı uzun zamanda gelişir. Düzenli kahve içen kişilerde, çok az içenlere göre etkileri daha az görülmektedir [76].

Yaklaşık 200 mg kafein, farmakolojik olarak aktif bir maddedir ve doza bağlı olarak hafif bir MSS uyarıcısı olabilir. Kafein zaman içerisinde vücutta birikmez ve normalde birkaç saat içinde atılır. Bu seviyede, merkezi sinir sistemini uyarır, yorgunluğu azaltır, böbrek üzerinde diüretik etkisi vardır. Bu nedenle vücutta sıvı dengesini etkiler [77]. Kafein alımı tip 2 diyabet hastalığı, Parkinson hastalığı ve

karaciğer hastalığı gibi çeşitli hastalıkları önler. Ayrıca anti kanser ve antioksidan aktivitelerine de sahiptir [78].

Aynı zamanda kan basıncını artırarak kalp atım hızını artırır, kan damarlarını genişletir ve plazmadaki serbest yağ asitleri ve glukoz düzeylerini yükseltir. Kafein solunum, kardiyovasküler ve MSS üzerindeki etkisine dayanarak bir ilaç olarak da kullanılır. Serebral göz kan akışını azalttığı için baş ağrılarının tedavisi için bazı preparatlarda aspirin ile birlikte bulunur. Kafeinli kahveyi fazla tüketenlerde, göz tansiyonu (göz merceğini tutan bağların zayıflaması ve kopması) riski içmeyenlere göre daha fazladır. Bazı anti-migren preparatlarında ergotamin ile birlikte bulunur[77]. Hafif solunum depresyonunun tedavisinde de kafein kullanılır [79]. Merkezi sinir sistemi tersine etkilendiğinden alışılmış bir sabah dozunun ihmal edilmesi genellikle sinirlilik, uyuşukluk, kötü iş performansı ve baş ağrısına neden olmaktadır. Bu durum sadece daha fazla kafein alarak (tedavi edilerek) giderilebilir. Kafein ayrıca akut dolaşım yetmezliğinin tedavisinde de kullanılır [80].

Kafeinin kullanılmaması gereken durumları şöyle sıralayabiliriz;

- Hasta idrar sökücü veya ağrı kesici kullandığı durumda ve hatta böbrek taşı varsa sıvı dengesini düzgün sağlamazsa tüketmemelidir.
- Hemodiyaliz hastalarında osteoporozu arttırdığından bu kişiler tarafından kullanılmamalıdır.
- >400 mg kafein alımı idrar yapma ihtiyacını arttırdığından yaşlılarda idrar kaçırma sorunlarına neden olmaktadır.
- Solunum problemi olan kişiler, solunum fonksiyon testinden 4 saat önce kahve tüketmemelidir.
- Kahve yapısında bulunan klorojenik asit nedeniyle kahveyi asidik yapmakta ve aşırı tüketildiğinde reflüye neden olmaktadır. Reflü hastalığı çekenler kahveyi çok az tüketmelidirler.
- Hamilelik ve emzirme döneminde anneler kafein içeren yiyecek ve içecekleri fazla tüketmekten sakınmalıdır. Çünkü bu dönemde kafein plasenta ve anne sütü yoluyla bebeğe geçerek ona zarar verebilir [81].

3.3. Kafeinin YPSK İle Yapılan Çalışmalar

Sara X. Candeias vd, Portekiz'deki perakende market kahvelerinde kafein miktarını tayin etmişler. Bunun için 17 farklı marka kafeinli kahve ve 6 kafeinsiz kahve ile 8 kafeinli ve 2 kafeinsiz kapsüllü kahve karışımları analiz edilmiştir. 9,3 g öğütülmüş kahve 25 mL saf su ile tamamlanmıştır. 5,3 g ve 5,2 g kafeinsiz kapsüllü kahve tartılmıştır. Örnekler selüloz asetat şırıngadan filtre edilmiş ve 25 µL süzöntü 1 mL bidistile suyla seyreltilerek iç standart (benzoik asit) ilave edilmiştir. Kafein 1 mg/mL stok çözeltisi ve 10 mg/mL iç standart bidistile su ve metanol ile hazırlanmıştır. Numuneler ile 0,5 µg /mL den 200 µg/mL ye 10 kalibrasyon 0,50 ile 25,0 ve 25,0 ile 200,0 µg/mL aralığında 2 farklı konsantrasyonlarda analiz yapılmıştır. Mobil faz Su: Metanol (35: 65, *h/h* ve %5 orto fosforik asit ile asitlendirilmiş, pH 2,8.), akış hızı 1 mL/dk, RP-18 kolonu ve 273 nm dalga boyunda analiz gerçekleştirilmiş. Kafein için alıkonma zamanı (*R_t*) 2,7 dk, *R*² 0,99, LLOQ 0,5 µg/mL ve LOD 20 ng/mL olarak hesaplanmış. 100 g ground kahvede; 1,05 g kafeinli kahve, 0,94 g kapsüllü kahve ve 100 g. ground kahvede; 0,03 g. kafeinsiz kahve, 0,02 g kafeinsiz kapsüllü kahve kafein miktarı bulunmuştur.

H.N. Wanyika vd, Kenya marketlerde bulunan hazır kahve ve çay markalarındaki kafein miktarını YPSK sistemi ve UV-Görünür bölge spektrofotometri ile analiz etmişlerdir. Bu çalışmada 3 marka hazır kahve örnekleri olan hazır kahve, saf hazır kahve ve espressoyu incelemişlerdir. İlk önce YPSK analizi yapılmış. 1000 ppm kafein stok çözeltisinden 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, ve 80 ppm lik mobil fazda standart çözeltileri hazırlanmıştır. Örneğin hazırlanması da, 2 g kahve örneği 100 mL kaynamış saf suda karıştırılır. Soğuduktan sonra süzülerek 5 mL süzöntü 50 mL balon jojoye mobil fazla tamamlanmıştır. Ters faz kullanılarak akış hızı 1 mL/dk, foto diyot dedektörü ile 278 nm dalga boyunda 10 µL örnek hacminde ve Su: Asetik asit: Metanol: (79,9: 0,1: 20, *h/h*) mobil fazında analiz gerçekleştirilmiştir. *R*² 0,99 olarak bulunmuştur. UV spektrofotometri ile yapılan analiz de ise; 1000 ppm kafein stok çözeltisi 100 mg saf kafein 100 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır. Kafein standartları, stok çözeltiden 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm ve 80 ppm olarak hazırlandı. 25 mL balon jojoye stok çözeltiden alınarak 1 mL HCl eklenmiş ve hacim saf suyla tamamlanmıştır. Örnek hazırlanışı ise, 0,25 g örnek 20 mL suda çözülür. Bu örnek çözeltisi 25 mL şişeye dökülerek üzerine 10 mL 0,01 M HCl, 2 mL temel kurşun asetat çözeltisi eklenir. Saf suyla tamamlandıktan sonra çalkalanır ve süzülür. 50 mL

süzülmüş çözelti 100 mL şişeye eklenerek üzerine 0,2 mL 4,5 M H₂SO₄ eklenir ve suyla hacim tamamlanır. Süzüntü 274 nm dalga boyunda UV-Görünür bölgede bakılır. R² 0,99 olarak hesaplanır. UV- Görünür bölgede elde edilen kafein seviyesi YPSK da elde edilen kafein seviyesinden daha yüksek çıkmıştır. Kahve örneklerindeki kafein konsantrasyonları sırası ile saf hazır kahve > hazır kahve > espresso kahve (DAD' a göre 3.42± 0.12; 3.12± 0.01; 1,64± 0.01ve UV' ye göre 12.23± 0.04; 12.57± 0.02; 5.74± 0.02) şeklindedir.

Nevena Grujić- Letić vd, farklı matrikslerdeki kafein miktarını tayin etmişlerdir. Çalışmalarının amacı; YPSK' yi takip eden katı faz ekstraksiyon kullanılarak yiyecek, içecekler, analjezikler ve yüzey suyunda kafein miktarı analiz edilmiştir Stok çözeltisi, pH 8 de 10 mL suyun 10 mg standart maddenin çözülmesiyle kafein stok çözeltisi hazırlanmıştır. 0,1 mg/mL konsantrasyon elde etmek için 100 µL stok çözelti pH 8 de 1 mL ye seyreltilerek elde edilmiştir. 0,2 ila 10 µL standart çözeltiler YPSK sistemine enjekte edilerek elde edilen sonuçlarla kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Örneğin hazırlanışı, 5 g kahve örnekleri 200 mL kaynamış suda ekstre edilir ve sonra süzülür. Elde edilen süzüntü sisteme verilir. Analiz koşulları; mobil faz Su: Asetonitril: THF (90: 10: Suda %0,1 THF, h/h, pH 8 0,1 M NaOH'a ayarlanır) akış hızı 0,8 mL/dk, çalışma zamanı 10 dk. kolon sıcaklığı 25°C, kolon the Zorbax Eclipse XDB – C8 kullanılarak ve DAD dedektöründe 273 nm dalga boyunca analiz gerçekleştirilmiştir. Kahve örneklerindeki kafein miktarları 1328-3594 mg/ 100 g. olarak bulunmuştur.

Suraj Shrestha vd, basit YPSK yöntemi ile kahve ve çay örneklerindeki kafein miktarı tayin edilmiştir. 7 yeşil çay ve 8 orta boy kavrulmuş kahve çekirdekleri ve 3 kavrulmuş kahve çekirdekleri tozu ile analiz gerçekleştirilmiştir. 0,3 g kahve örnekleri 200 mL distile suyla hazırlanarak 100 °C ye kadar kaynatılır. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra süzülür. 100 ppm kafein stok çözeltisinden 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm ve 10 ppm standart çözeltileri hazırlanır. C18 kolonuyla, mobil faz Su: Metanol (60: 40, h/h), akış hızı 1 mL/dk, kolon sıcaklığı 40 °C UV dedektör ile 275 nm dalga boyunda 10 µL enjeksiyonu ile analiz gerçekleştirilmiş. r² 0,9928, geri kazanım %97, doğrusallık 2-10 µg/mL, LOD 0,2 ppm ve LOQ 0,7 ppm olarak hesaplanılmıştır. Ortalama kahvedeki kafein miktarı kuru bazda 1,17-1,34% olarak bulunmuştur.

B E P Fajara ve H Susanti, YPSK ile kahve içeceğinde kafein tayin etmişler. 3 çeşit kahve örnekleri (X,Y,Z) Parry metodu, Dragendorff reaktifi ile nitel analiz ve nicel analiz yöntemlerini kullanarak kafein analizi gerçekleştirilmiştir. Dragendorff testi için

1 mL örnek 10 mL kloroform ve 4 damla NH_4OH da çözülür ve sonra süzülür. Kloroform ekstratı 6 mL H_2SO_4 (2M) ile çalkalanır. Asidik tabaka başka tüpe ayrıldıktan sonra 1 damlasına Dragendorff reaktifi eklenir ve turuncu- kırmızı tortuya neden olur. Bu da kafein varlığını gösterir. Parry metodu alkolde çözünen maddelerin sayısı vasıtasıyla gerçekleşir. Bu reaktif ve seyreltilmiş amonyak çözeltisi örnek üzerine eklenir. Koyu mavi- yeşil çözelti kafein bulunduğunu gösterir (parry reaktifi, cobalt nitratın metanol ile reaksiyonu ile oluşur.). Sistem uygunluk testi, 6 kez 60 μg / mL kafein standart çözeltisinin enjeksiyonu ile gerçekleşir. RSD değeri, tR, AUC ve kuyruklanma faktörüne özgüdür. Doğrusallık testi, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm, 140 ppm, 160 ppm, 180 ppm, ve 200 ppm konsantrasyonlarıyla kafein standartının etanolde çözünmesiyle YPSK sistemine enjeksiyonu ile gerçekleşir. Kahve içeceklerinde kafein içeriğinin tayini, 5 mL kahve örneği her birine 25 mL kloroform eklenerek 4 kez ekstre edilir. Ekstrat (kloroform tabakası) su banyosunda buharlaştırıldıktan sonra çözücüsüz kafein ekstratı 5 mL ye kadar etanolde çözülür. Standart çözelti ve örnek YPSK sistemine enjekte edilir. Ters faz C18 kolonu, akış hızı 1 mL/dk, 20 μL örnek hacminde 278 nm dalga boyunda ve Metanol: Su (95:5, h/h) mobil fazında analiz gerçekleşir. Elde edilen sonuçlar; r^2 0,992, ortalama kafeinin alıkonma zamanı 2,518 dk, kuyruklanma faktörü 0,67 bulunarak kafein miktarları sırasıyla X,Y ve Z için 132,048 mg/şişe, 109,699 mg/şişe, 147,669 mg/şişe olarak hesaplanmıştır.

Kebena Gebeyehu Motora ve Tamene Tadesse Beyene, Ilu Abba Bora bölgesindeki çiğ ve kurutulmuş kahve çekirdeklerinde bulunan kafeinin analizini gerçekleştirmişlerdir. Mettu Rural, Chora ve Yayo Woreda tarım ve kırsal gelişim ofislerinden toplanan kahve çekirdekleriyle analiz yapılmıştır. 2 g kahve örneği 250 mL saf suda çözülür. Çözelti süzildükten sonra 10 mL alınıp üzerine 10 mL 1 N NaOH eklenerek 30 mL kloroformun her bir 5 miktarı ekstre edilmiştir. Her bir ekstrat su ile yıkanarak elde edilen kalıntı 2g tartılarak 100 mL kaynar suda çözülmüştür. Çözelti soğutulduktan sonra süzülerek kahve örneği hazırlanmıştır. 100 ppm kafein stok çözeltisinden 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm ve 80 ppm standart çözeltiler hazırlanarak. mobil faz olarak Su: Metanol (65:35, h/h), akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 10 μL , kolon sıcaklığı 25°C, C18 kolonunda ve 272nm dalga boyu aralığında analiz yapılmıştır. r^2 0,999, MDL 0,023 ppm, geri kazanım %105 bulunmuştur. Kahve örneklerinde kafein miktarları sırasıyla; Yayo çiğ kahvede 57,23 mg/L, Yayo

kurutulmuş kahvede 62,63 mg/L, Chora çiğ kahvede 59,33 mg/L, Chora kurutulmuş kahvede 70,93 mg/L, Mettu çiğ kahvede 64,61 mg/L ve Mettu kurutulmuş kahvede ise 78,68 mg/L olarak bulunmuştur.

Mesfine Shiferaw vd, YPSK analizi kullanarak Bale bölgesinde bulunan kahvelerdeki kafein analizini gerçekleştirmişlerdir. Deneylerinde Golalcha, Berbere, Mena ve Harena Buluk kahve çekirdeği örneklerini analiz etmişlerdir. İlk olarak 0,5 g öğütülmüş ve elenmiş kahve örneği 100 mL distile su ile kaynatılmış. Soğutulduktan sonra süzülerek her bir süzüntüye 3g Na₂CO₃ eklenmiştir. 100 mL diklorometan ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstrasyondan elde edilen organik faz susuz Na₂SO₄ üzerinde kurutularak, böylece ham kafein ekstratı elde edilmiştir. YPSK analizi için saklanmış. 1000 ppm kafein stok çözeltisinden 0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, ve 25 ppm standart çözeltiler hazırlanmıştır. Mobil faz olarak Su: Metanol (75:25, *h/h*), akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 20 µL, kolon sıcaklığı 25 °C, C18 kolonuyla, DAD dedektörü ile 272 nm dalga boyunda analiz gerçekleştirilmiş. r^2 1, LOD 0,0018 mg/L, LOQ 0,0055 mg/L, geri kazanım %101,45 bulunmuştur. Kahve örneklerinde kafein seviyeleri sırasıyla; Golalcha kahvesi %1,31 ±0,14, Harena Buluk orman kahvesi %1,32±0,03, Mena orman kahvesi %1,33± 0,08, Berbere kahvesi %1,34±0,21, Harena Buluk tarım kahvesi %1,36±0,02, Mena tarım kahvesi %1,36 ± 0,16olarak bulunmuştur.

Sıvı Kromatografisi ile yapılan çalışmaların teknik özellikleri Tablo 5.1.'de yer verilmiştir.

Tablo 5.1. *Sıvı kromatografisi kullanılarak yapılan çalışmaların teknik özellikleri*

Kafein Analizinde Kullanılan Örnekler	Kolon	Akış Hızı (mL/dk) ve Mobil Faz	Korelasyon Katsayısı (R^2)	Dedeksiyon (nm)	Geri Kazanım, LOD ve LOQ	Kafein Miktarı
17 farklı kafeini kahve ve 6 kafeinsiz kahve ile 8 kafeinli ve 2 kafeinsiz kapsüllü kahve	RP-18	1mL/ dk, Su: MeOH (35:65ve orto fosforik asit, <i>h/h</i>) pH 2.8	$R^2= 0,99$	273 nm dalga boyu	20 ng/mL ve LLOQ= 0,5 µg/mL	100 g kahvede 1,05 g kafeinli kahve, 0,94 g kapsüllü kahve ve 0,03 g kafeinsiz kahve ile 0,02 g kafeinsiz kapsüllü kahve
Saf hazır kahve, hazır kahve ve espresso kahveleri	Ters farz	1mL/ dk, Su: Hac: MeOH (79,9: %0,1: 20, <i>h/h</i>)	YPSK ile $R^2= 0,99$ UV spec. ile $R^2= 0,99$	YPSK DAD ile 278 nm dalga boyu UV spec. UV görünür bölgede 274 nm dalga boyu	-	YPSK da elde edilen miktarlar; 12.23±0,04 12,57± 0,02 5.74±0,02 UV den elde edilen miktarlar ise; 3,42±0,12 3,12± 0,01 1,64± 0,01 Saf hazır> hazır> espresso
Yiyecek, içecek, analjezikler ve yüzey sularında	XDB- C8	0,8 mL/dk, Su: ACN: THF (90:10:%0,1, <i>h/h</i>)	-	DAD dedektörü ile 273 nm dalga boyu	-	1328-3594 mg /100 g.
7 yeşil çay, 8 orta boy kavrulmuş kahve çekirdekleri ve 3 kavrulmuş kahve çekirdekleri	C18	1 mL/dk, Su: MeOH (60:40, <i>h/h</i>)	$R^2= 0,9928$	UV dedektör ile 275 nm dalga boyu	%97 geri kazanım 0,2 ppm ve 0,7 ppm	Ortalama kahvedeki kafein miktarı kuru baz da %1.17-1.34

Tablo 5.1. (Devam). *Sıvı kromatografisi kullanılarak yapılan çalışmaların teknik özellikleri*

X,Y,Z	C18	1 ml/dk, Su: MeOH (5:95, h/h)	R ² = 0,992	278 nm dalga boyu	-	132,048 mg/şişe, 109,699 mg/şişe, 147,699 mg/şişe
Yayo çiğ kahve, yayo kurutulmuş kahve, chora çiğ kahve, chora kurutulmuş kahve, mettu çiğ kahve ve mettu kurutulmuş kahve	C18	1ml /dk, Su: MeOH (65:35, h/h)	R ² = 0,999	272 nm dalga boyu	%105 geri kazanım MDL= 0,023 ppm	57,23 mg/ L, 62,63 mg/ L, 59,33 mg/ L, 70,93 mg/ L 64,61 mg/ L, 78,68 mg/ L,
Golalcha kahvesi, harena buluk orman kahvesi, mena orman kahvesi, berbere kahvesi, harena buluk tarım kahvesi ve mena tarım kahvesi	C18	1 ml/dk , Su: MeOH (75:25, h/h)	R ² = 1	DAD dedektörü ile 272 nm dalga boyu	%101 geri kazanım 0,0018 mg/ L ve 0,0055 mg/ L	%1,31± 14, %1,32± 0,03, %1,33± 0,08, %1,34± 0,21, %1,36± 0,16, %1,36± 0,21

4. KROMATOGRAFI

Kromatografi, bir numunedeki bileşenlerin dağılma ve adsorpsiyon gibi mekanizmalar yoluyla farklı zamanlarda birbirinden ayrılması işlemidir. YPSK, pek çok alanda yaygın kullanılan elüsyon kromatografisidir. Maddelerin sabit ve hareketli fazda birbirleriyle karışmayan iki farklı fazda ayrılması ve saflaştırılmasını gerçekleştirir. Sıvı veya gaz halindeki mobil faz ile karışımdaki bileşenler sabit faz üzerinden bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak ayrılması işlemidir. Bu yöntemle çeşitli organik, anorganik ve biyolojik numunelerdeki türleri ayırmak ve tayin etmek için kullanılır. Kromatografik analiz yöntemi ise, karışımda bulunan türlerin ayrı ayrı belirlenmesi (nitel analiz) ve karışımı oluşturan türlerin miktar tayini (nicel analiz) işlemlerinde kullanılan aletli analiz yöntemidir [82, 83].

4.1. Kromatografinin Mekanizma Yönünden Sınıflandırılması

Mekanizma yönünden sınıflandırılması ayırma ortamındaki maddelerin ayırımını yapan mekanizmayı temel alır. Bilinen mekanizmalar göz önüne alındığında kromatografi 6 gruba ayrılmaktadır. Bunlar:

1. Dağılma (partisyon) kromatografisi
2. Adsorbsiyon kromatografisi
3. İyon değiştirme kromatografisi
4. Molekül seçme kromatografisi
5. Afinite kromatografisi
6. Kiral kromatografisi

Mol kütlesi 10000 den büyük ve apolar maddelerin analizinde jel geçirgenlik yöntemi; jel süzme yöntemi ise polar veya iyonik maddeler için kullanılır. Mol kütlesi daha küçük iyonik türlerde ise iyon değiştirici kromatografisi tercih edilir. İyonik olmayan küçük polar türler dağılma yöntemiyle analiz edilir [82, 83, 85].

4.1.1. Dağılma kromatografisi

Örnek içerisinde bulunan her madde hareketli ve sabit faz arasında dağılır. Dağılma katsayısı (hareketli faz/sabit faz, K_D) büyük olan madde ortamdan önce çıkar. Sıvı- sıvı dağılma ve sıvı bağlı faz kromatografisi diye 2 alt gruba ayrılır. Bu fark, katı taneciklerin yüzeyine durgun fazın tutturulmasındaki yöntem farkıdır. Sıvı- sıvı teknikte fiziksel adsorpsiyonla, bağlı faz teknikte ise kovalent bağlarla tutturulur. Bağlı faz dağılma kromatografisi daha kararlı olduğu için tercih edilir [82, 83, 85].

4.1.2. Adsorbsiyon kromatografisi

Sabit faz katı olduğunda katı yüzeyinde maddenin alıkonulması fiziksel kuvvetlerin etkisi sonucunda yani adsorbsiyon ile sağlanır. Analit, polar bir dolgu maddesinin (silis yada alümina) yüzeyine adsorblanır. Silis, analiti adsorblama kapasitesinin yüksek oluşu ve daha kullanışlı bir formda olduğu için alüminaya göre daha çok tercih edilmektedir. Analit, sabit fazda hareketli faz ile adsorpsiyon yarışına girer. Alıkonma süresi, analitin durgun fazdaki adsorpsiyon kuvvetine bağlıdır. Adsorbsiyon kromatografide, analitin dağılma katsayısını etkileyen değişken hareketli fazın bileşimidir. Burada molekül kütlesi 5000 den daha az apolar ve suda çözünmeyen organik maddeler ve izomerik karışımlar da ayrılabilir [82, 83, 85].

4.1.3. İyon değiştirme kromatografisi

Sabit fazda anyon ve katyonları değiştirebilen fonksiyonel gruplar bulunmaktadır. İyonik maddeleri içeren örnek karışım ayrılacağı zaman bu iyonlar sabit fazdaki anyon ve katyonlarla yer değiştirerek tutunma gerçekleşir. Hareketli faz, iyonun sabit ve hareketli fazda oluşturduğu dengeye göre iyonik maddeyi sürükler. Denge sabitinin büyüklüğü hangi iyonun daha uzun süre sabit fazda alıkonulacağını, hangisinin ise ortamı önce terk edeceğini belirler. İletkenlik dedektörü, iyon kromatografisi için uygun bir dedektördür [82, 83, 85].

4.1.4. Molekül seçme kromatografisi

Yüksek mol kütleli türlere uygulanır. Dolgular küçük boyutlu silis ya da polimer tanecikleridir. Gözenek boyutundan büyük moleküller dolgu maddesi tarafından tutulamazlar ve hareketli faz ile kolonu erken terk ederler. Analit ve sabit faz arasındaki fiziksel ve kimyasal etkileşimler söz konusu olmadığı için diğer tekniklerden ayrılır.

Çok sayıda dolgu maddesi bulunur. Bazıları hidrofiliktir ve polar çözücülerle kullanılırken bazıları ise hidrofobiktir ve apolar organik çözücülerle kullanılırlar. Jel süzme tekniği; polar türlerin ayrılmasında, dolgu maddelerinin hidrofilik olduğu bir çeşit boyut ayırıcı kromatografisidir. Jel geçirgenlik tekniği; apolar türlerin ayrılmasında, dolgu maddelerinin hidrofobik olduğu bir çeşit boyut ayırıcısıdır [82, 83, 85].

4.1.5. Affinite kromatografisi

Affinite ligandı adı verilen reaktif katı bir destek üzerine kovalent olarak bağlanır. Protein – ligand etkileşimine dayalı, biyolojik moleküllerin ayırımında kullanılan bir yöntemdir. Numune kolondan geçerken sadece affinite liganda bağlanan moleküller alıkonulur. İstenmeyen moleküller uzaklaştırıldıktan sonra alıkonmuş analitler hareketli fazın bileşimi değiştirilerek elüe edilir. Antijen – antikor, enzim – substrat, reseptör ilaç, gibi oldukça spesifik etkileşimlere dayanmaktadır [82, 83, 85]

4.1.6. Kiral kromatografi

Bu ayırmalarda ya hareketli faza kiral bir madde katılır, ya da sabit faz olarak kiral bir katı seçilerek gerçekleştirilir. Ayırıcı madde kiraldır; çünkü ayrılacak izomerlerin kiral özellikleri arasında ayırım bu şekilde gerçekleşir. Durgun faz, katı bir destek yüzeyine kiral bir madde tutturularak hazırlanır. Kiral madde ile çözünmüş izomerler arasındaki etkileşim, ayırıcı kiral madde ile ayrılan izomerler π - bağları, H-bağları veya dipoller aracılığı ile birbirlerini çekerler. Bir diğer etkileşim ise, ayrılacak izomerlerden birinin durgun fazdaki kiral boşluklara yerleşip içerim kompleksleri oluştururlar [82, 83, 85].

4.2. Polarlık Durumuna Göre Sınıflandırması

- a) Normal faz kromatografisi: Sabit faz polar, hareketli faz apolar
- b) Ters faz kromatografisi: Sabit faz apolar, hareketli faz polar

şeklinde iki gruba ayrılır [82, 83, 85].

4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Gelişen teknoloji ile küçük yarıçaplı tanecikleri içeren kolonlar kullanılmış ve tabaka sayıları iyileştirilerek kolona yüksek basınç uygulanmasıyla da akış hızı arttırılmıştır. Bu arttırılmış performansından dolayı yüksek performanslı sıvı kromatografisi denilmiştir. YPSK, sağladığı yüksek doğruluk, kesinlik, hassaslık ve uçucu olmayan türler içinde kullanılabilmesinden dolayı en çok tercih edilen bir kromatografi cihazıdır. Çözücü maliyeti, ultra saflıktaki çözücü kullanımı ve uzun analiz süresi gibi parametreler YPSK' nın dezavantajı gibi görülse de sonuçların birbiriyle uyumu ve kesinliği bu durumu önemsiz kılmıştır. Ayrıca çok düşük derişimlerde bile çalışılması bir avantaj olarak değerlendirilir. YPSK, yapıları benzer

kimyasal türlerin ayrılması ve saflaştırılması işlemlerinde, kalitatif ve kantitatif analizlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Az sayıda ve bilinen türleri içeren karışımlardaki bileşenlerin varlığını tanımak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılır [84].

4.3.1.Çözücü seçimi

Bir analizin başarılı sonuçlanması için ilk önce doğru çözücü seçimi yapılmalıdır. Elüent olarak genellikle en az iki çözücünden oluşan karışım kullanılır. Bu karışımlarda belli oranlarda zayıf çözücü olarak su ve kuvvetli çözücü olarak da tetrahidrofuran, metanol ve asetonitril gibi organik çözücüler kullanılır. Seçicilik parametresi çözücü oranları ya da bileşimi değiştirilerek iyileştirilir. Çözücülerin kaynama noktaları yüksek olmamalı, viskozitesi ve toksisitesi düşük olmalıdır. Kullanılan dedektör ile de uyumlu olmalıdır. [84].

4.3.2. YPSK sisteminde kullanılan pompalar

YPSK’ da pistonlu yüksek basınç pompaları kullanılır. Silindir yollu (pistonlu) pompalar, şırınga benzeri pompalar ve pnömatik pompalar olmak üzere 3 çeşittir. Bu pompalar. 600 bar basınca kadar çıkar ve 0,2-10 mL/dk akış hızlarında çalışabilir. Pistonlu pompalarda pistonun ileri geri hareketiyle doldurulur ve boşaltılır. Pulsu akış düzeltilerek sürekli akışa dönüştürülebilir. Gradient elüsyon tekniği kolay uygulanabilir. Kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden çok fazla etkilenmez. Şırınga benzeri pompaların akış hızları kontrol edilebilmektedir Fakat kapasiteleri sınırlıdır. Ayrıca farklı çözücü karışımların kullanımına uygun değildir. Pnömatik pompalar, basit, ucuzdur. Kapasiteleri ve kolon basınçları sınırlı olur ve çözücü viskozitesine göre akış hızı değişmektedir. Bu yüzden gradient elüsyona uygun değildir [84].

4.3.3. YPSK sisteminde kullanılan kolonlar

YPSK’ da kolonlar çeşitli ebatlarda, cam veya paslanmaz çelikten yapılmış ve içinde uygun bir sabit faz bulunan malzemeler kullanılır. 3 tip kolon vardır. Bunlar; mikro analitik, standart analitik ve preparatiftir. Dolgu malzemelerinin yarıçapları 3-20 µm arasında ve 30-300 mm uzunluğunda kolonlar kullanılır. Taneciklerin yarıçapları ne kadar küçükse teorik tabaka yüksekliği o kadar az ve kolon verimliliği de o kadar fazladır. Ve böylece kolonda geri basınç artar. Bu şekilde kolon geçirgenliği artırılır ve daha düşük basınçlarda çalışılır.

YPSK cihazlarında ön kolonlar vardır. Ön kolondaki dolgu maddesi ile analitik kolondaki dolgu maddesi aynıdır, fakat tanecik boyutları daha büyüktür. Bu şekilde ön kolonda meydana gelen basınç düşmesi azaltılır. Ön kolon kullanmanın amacı, çözeltideki safsızlıkların analitik kolona geçmesini engellemektir.

YPSK kolonlarında kullanılan dolgu maddesi ince silika jeldir. Alümina ve celite de kullanılanlar arasındadır [84].

4.3.4. YPSK sisteminde kullanılan dedektörler

Dedektörler, kolondan elüe olan örnek bileşenlerin sinyallerini kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesidir. İdeal bir dedektör, geniş konsantrasyon aralığında, yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, seçiciliğe ve kolon akıntısındaki bileşiklere duyarlı olmalıdır. Ayrıca sıcaklık ve basınçtaki değişimlere duyarsız olmalıdır. Kullanılacak olan dedektör, analizi yapılacak örneğin cinsine uygun olmalıdır. Cevap süresi kısa olmalı ve bant genişlemesine sebep olmamalıdır. Sıvı kromatografisinde en çok UV-Vis dedektörleri kullanılır.

YPSK kullanılan Dedektör tipleri;

Analite duyarlı dedektörler: UV, DAD, floresans ve amperometrik dedektörlerdir.

Mobil faza duyarlı dedektörler: İletkenlik dedektörü ve kırma indisi dedektörlerdir [83, 85].

4.3.5. Ultraviöle / görünür (UV/VIS) ve foto diyot dizisi dedektörü (DAD)

YPSK sistemlerinde en yaygın kullanılan dedektör çeşididir. Bu dedektörler Lambert Beer Law yasasına uyar. A, absorbans, ϵ molar absorpsiyon katsayısı, b, hücre uzunluğu (cm), c örnek konstantrasyonu iken eşitlik şu şekildedir;

$$\epsilon bc = A \quad (4.1)$$

UV dedektörler, 200-400 nm aralığında kullanılabilir, çok düşük derişimdeki bileşikler belirlenebilir, seçicilikleri oldukça yüksek ve gradient elüsyon için elverişlidir. En ucuzu tek bir dalga boyunda çalışan filtreli UV dedektörüdür. Monokromatörlü UV dedektörleri ise aynı anda 4-5 dalga boyunu tararlar. En pahalı olanı foto diyot dizisi, aynı anda istenildiği kadar dalga boyunu tarayan DAD dedektörleridir. Bu tip dedektör ile pik saflığı ve 3 boyutlu spektrumlar elde edilir [82, 83].

5. GEREÇLER

YPSK-DAD dedektörü aracılığı ile farklı sıcaklıklarda demlenmiş olan kahve örnekleri içerisindeki kafenin miktarının tayini için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 6.1.'da, cihazlar ve gereçler ise Tablo 6.2.'de yer almaktadır.

Tablo 6.1. Analizde kullanılan kimyasal malzeme listesi

Kullanılan Kimyasallar	Marka	Safılık derecesi
Kafein	Sigma-Aldrich (Sigma, Almanya)	$\geq \% 99,9$
Metanol	Sigma – Aldrich (Almanya) ve Carlo Erba (Fransa)	YPSK Safılık, $\geq \% 99,9$
Su CHROMASOLV®	Sigma – Aldrich (Almanya)	YPSK Safılık, $\geq \% 99,9$
Asetonitril	Sigma – Aldrich (Almanya) ve Carlo Erba (Fransa)	YPSK Safılık, $\geq \% 99,9$
Propan diol	Carlo Erba (Fransa)	YPSK Safılık, $\geq \% 99,0$

Tablo 6.2. Analizde kullanılan cihazların marka ve modelleri

Cihaz Adı	Marka/ Model
Yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı	Marka: Shimadzu (Japonya) Model: Nexera – i (LC – 2040C 3D) (Japonya) Liquid Chromatograph
Foto Diyot Dizisi Detektörü	Marka: Shimadzu (Japonya) Model: Nexera – i (LC – 2040C 3D) (Japonya)
Hassas terazi	Model: Ohaus PA214C
Su banyosu	Model: Lab companion BW – 20 H
Vortex cihazı	Model: HEIDOLPH Marka: BFC
Mobil faz süzme düzeneği	Model: BF – S2500 vakum cihazına ile bütünleşik mobil faz süzme düzenek sistemi
Şırınga ve uçları	Part No: SN02522 – P

6. YÖNTEMLER

6.1. Hareketli Fazın Hazırlanışı

Mobil faz olarak MeOH ve ultra YPSK saflıktaki su kullanılmıştır. MeOH: Su (45:55, *h/h*) bileşimindeki hareketli faz çözeltisi 1000 mL'lik A kalite cam şişede hazırlanmıştır. Belirtilen hacimlerde karıştırılan mobil faz öncelikle olası kirliliklerden arındırmak amacıyla mobil faz süzme düzeneği ile 0.22 µm gözenek çaplı steril selüloz filtreden geçirilerek 10 dk boyunca ultrasonik banyoda bekletildi. Tüm analizlerde mobil faz günlük olarak hazırlanmıştır. Analiz süresince izokratik elüsyon sisteme dayalı bir hareketli faz akışı kullanılmıştır.

6.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

Kafein standart stok çözeltisi, saf kafeinden hassas bir şekilde 0,020 g madde tartılarak 10 mL bidistile suda çözülerek (2000 ppm) hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden ilgili seyreltmeler yapılarak sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 ppm derişimlerine sahip standart çözeltiler elde edilmiştir.

6.3. Kahve Örneklerinin Hazırlanışı

Analizi yapılacak kahve örneklerinden 1000 mg tartım alınarak ışıktan etkilenmemesi amacıyla siyah 100 mL'lik cam şişelere bidistile su ile tamamlanarak 10 dk boyunca ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Bu karışım daha sonra vorteks ile de 5 dk çalkalanmıştır. Hazırlanan kahve örnekleri farklı sıcaklık değerlerinde (25°C, 50°C, 75°C ve 95°C) ısıtılarak, her örnekten 1 ml'e alınıp 0.22 mm'lik şırınga filtreden süzöldükten sonra YPSK viallarına aktarılmıştır. İlk örnek analize verildiğinde elde edilen pik şiddetli gelince örneklerin derişimleri 1:10 oranında seyreltilmesi yöntemine gidilmiştir.

6.4. Analiz Parametreleri

DAD dedektörü ile yapılan ölçümlerde maddenin maksimum absorbans verdiği değeri bulmak için 194 ile 800 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılmıştır.

YPSK analizleri için MeOH: Su (45:55, *h/h*) bileşimindeki mobil faz, seçilen PFPP kolonundan 0,7 mL/dk akış hızında gönderilmiştir. Enjeksiyon hacmi 10 µL,

kolon sıcaklığı 25 °C olarak ayarlanmıştır. Analitler, 274 nm dalga boyuna ayarlı foto diyot dizi dedektörü ile ölçülmüş olup bilgisayara kaydedilmiştir.

Analize başlanmadan önce %10 izopropilalkol-su ve %30 MeOH-Su çözeltileri sistemden geçirilerek analize hazır hale getirilmiştir. Daha sonra hazırlanan mobil faz ile kolon 10 dk süresince şartlandırılmıştır. Bu işlemler sonrasında standartlar ve numuneler analiz edilmeye başlanmıştır.

Analizlerde kafein pikleri $7,7 \pm 0,009$ dk' da gözlenmiş olup toplam analiz süresi 12 dk' da tamamlanmıştır. Analiz sonrasında kolondan MeOH: Su (75:25, *h/h*) çözeltisi 5 dk geçirilerek bir sonraki analiz için hazır hale getirilmiştir.

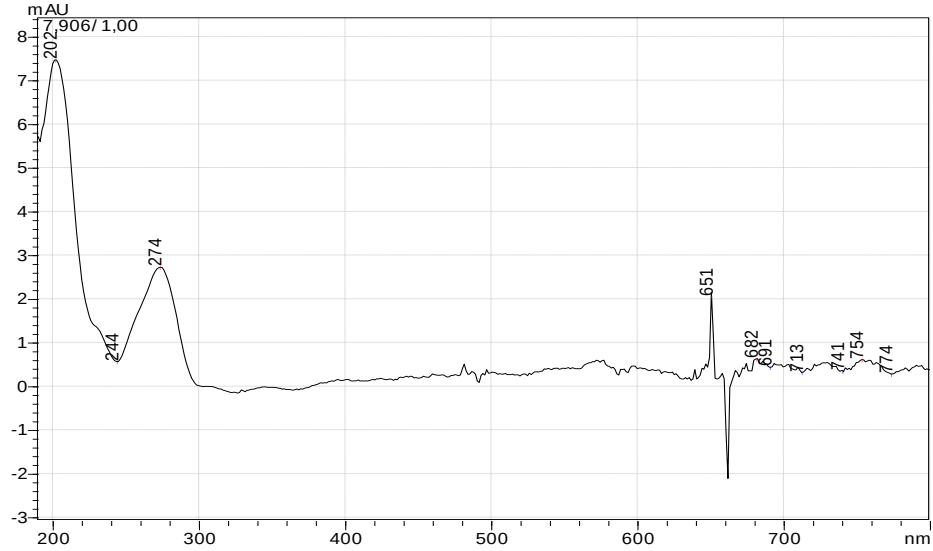
6.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Uluslararası Harmonizasyon Konferansına (International Harmonization Conference, ICH) uygun olarak yapılan validasyon parametreleri ve sistem uygunluk testleri (SUT) sonucunda geliştirilen yöntemin yeterli ve istatistiksel açıdan uygun olduğu saptanmıştır. Üç kez tekrarlanan analizler sonucunda elde edilen pik değerleri kullanılmıştır ve kahvelerdeki kafein miktarları hesaplanmıştır.

7. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada, YPSK yönteminde DAD dedektörü kullanılarak kahvelerdeki kafein miktarının belirlenmesindeki ilk aşama yöntem geliştirme ile olmuştur. Analiz yönteminin geliştirilmesi için önce sabit ve hareketli faz seçimi, uygun analiz koşullarının belirlenmesi yöntem geçerlilik basamaklarından sonra belirlenen metodun numunelere uygulama aşaması yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda özgün değere sahip ve uygulanması kolay bir analiz gerçekleştirilmiştir.

Ülkemizdeki kahve örneklerine uygulanan YPSK tekniği ve DAD dedektörü ile elde edilen kafein miktarının analizi gerçekleştirilmiştir. Kafeinin suda çözünürlüğünün %2,13 olması ve gıdalarda su kullanılması gerekli olduğundan çözücü olarak su kullanılıp 2000 ppm derişiminde kafein stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden bir seri seyreltmeler yapılarak geniş tarama aralığı sunan DAD dedektörü ile 80 ppm standart çözeltinin analizinde en yüksek dalga boyu aralığı 274 nm olduğu bulunarak şekil 5.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. 80 ppm derişime sahip kafein ile elde edilen DAD spektrumu

Tablo 7.1. 40 ppm kafein *standart* çözeltisinin analiz parametreleri

Parametre	Değer
Başlangıç dalga boyu	190 nm
Bitiş dalga boyu	800 nm
Spektrum kararlılığı	512
Lamba	D2+
LC ve End stop	12 min
Derişim	40 ppm
Kolon sıcaklığı	25°C
Dalga boyu	274 nm
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Akış hızı	0,7 mL/dk
Alıkonma zamanı	7,7 dk
Pik taban genişliği	0,563
Pik alanı	1402716
Mobil faz %	%45 MeOH-Su
Mod	düşük basınçlı gradient
Max. Basınç	450
Kolon tipi	Ultra PFPP

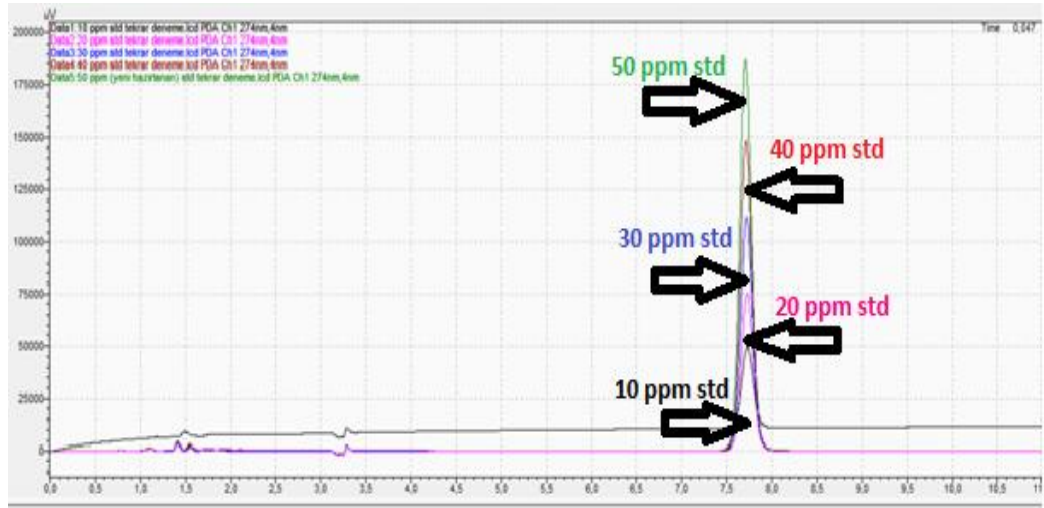
YPSK analizi için yöntem geliştirme metodunda kafeinin kolonda yeterli sürede alıkonması için uygun kolon (sabit faz) ve hareketli faz seçimi ile başlanılmıştır. Kolonların iç yüzey alanları, boyut, silika yapısı gibi parametreleri göz önüne alınca maddeyi tutabilecek güçte ve yüksek verimliliğe sahip bir kolon araştırılmıştır. RaptorTM C18 (150 mm x 4,6 mm x 2,7µm), Ultra AQ C18 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm), Ultra AQ C18 (200 mm x 4,6 mm x 5 µm) ve Ultra PFPP (200 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolonlarında analiz gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz seçimi içinde ucuz YPSK çözücülerinden olan asetonitril (ACN), metanol (MeOH) ve su bileşimli çözücülerle denemeler yapılmıştır. Kafein maddesi polar yapıda olmasından dolayı hareketli faz seçiminde de apolarlığı düşük tutulmaya çalışılmıştır. Akış hızının kafein maddesinin kolonda tutulmasını ve sinyal büyüklüklerine yaptığı etkiyi incelemek amacıyla değişik

akış hızlarında analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analiz kolon sıcaklığı sabit tutularak yani standart oda sıcaklığı olan 25°C de gerçekleştirilmiştir. Çünkü artan sıcaklık çözücü viskozitesini azaltarak basınçta da azalmaya neden olur. Moleküllerin kinetik enerjilerini arttırarak maddenin geliş zamanını kısaltır. Pik morfolojisini iyileştirmesi ve kolon basıncını düşürmesi gibi avantajının yanında yüksek sıcaklıklarda maddeler ve kolon kimyası üzerinde bozucu etkisi gibi dezavantajı da vardır. Bu yüzden oda sıcaklığında çalışılması uygun görülmüştür.

İlk analiz, RaptorTM C18 (150 mm x 4,6 mm x 2,7µm) kolonunda mobil fazı %15 ACN-Su sabit tuttuğumuzda akış hızları 0,5 ml/dk ile 0,7 ml/dk' yı incelediğimizde alıkonma zamanları 4,86 dk ve 3,49 dk olarak bulunmuştur. Aynı kolon için akış hızlarını sabit tuttuğumuzda yani 0,5 ml/dk akış hızında analiz yapıldığında mobil faz yüzdesini %10 ve %15 ACN-Su ya ayarlandığında ise piklerin alıkonma zamanları sırayla 9,25 dk ve 4,86 dk olduğu bulunmaktadır. Organik faz yüzdesi arttırılınca piklerin alıkonma zamanında azalış yani maddenin kolonu erken terk ettiği gözlenmiş oldu. Ultra AQ C18 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) kolonunu kullanılarak pikler incelendi. %15 ACN -Su mobil fazı sabit tutularak akış hızları 1,4 ml/dk ve 0,9 ml/dk ya ayarlandığında maddenin kolonu terk etmeleri sırasıyla 6,680 dk ve 11,746 dk olarak bulunmuştur. Akış hızını arttırdığımız zaman basınçta yükselme görülmektedir. Bu yüzden yüksek basınçlarda çalışılması tercih edilmemektedir. Ayrıca pik morfolojilerindeki bozulma sebebinden bu kolon ve mobil faz kullanımı iptal edilmiştir. Ultra AQ C18 (200 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolonu %30 MeOH-Su mobil fazında ve 0,7 ml/dk ile 1,4 ml/dk akış hızında gerçekleştirilen analiz sonucunda ise sırasıyla maddenin kolondan ayrılması 16,56 dk ve 9,31 dk olarak bulunmuştur. 16,56 dk alıkonulan madde için sarfiyat çok olduğundan ve 9,31 dk gelen maddede kolonda yüksek basınca neden olduğu için iptal edilmiştir. %40 MeOH-Su mobil fazında 3 µm ve 2,7 µm kolon ebatlarında 1,3 ml/dk ve 0,5 mL/dk akış hızlarında yapılan analiz sonucuna göre de maddenin alıkonma zamanları sırasıyla 3,959 dk ve 3,875 dk olarak bulunmuştur. Aralarında büyük bir fark olmamasıyla birlikte kolonu beklenen zamandan daha erken terk etmesi istenilen bir durum olmaması nedeniyle bu kolon ve mobil faz yüzdeleri de iptal edilmiştir. Son olarak Ultra PFPP (200 mm x 4,6 mm x 5 µm) ebadındaki kolon ile %45 MeOH-Su mobil fazında 0,7 mL/dk akış hızında analiz gerçekleştirilmiştir. Maddenin alıkonma zamanı 7,368 dk olarak bulunmuştur. Pikin morfolojisinde herhangi bir bozukluk ve fazla sarfiyata neden olmaması açısından bu

kolon kullanımı tercih edilmiştir. Düşük akış hızı maddenin kolondan çıkış süresini, pik alanlarının büyüklüğünü, pik morfolojisinin simetrisini olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca yüksek akış hızı kolon basıncını arttırarak pik morfolojisinin bozulmasına neden olduğu için ortalama bir değer olarak 0,7 ml/ dk akış hızı seçilmiştir.

Ön çalışmalar doğrultusunda yapılan analizlerde, kafein içeren standart çözeltilerin analizi 12 dakikada tamamlanmıştır. Kafeinin geliş zamanı $7,7 \pm 0,02$ dk dedekte edilmiştir. Standart maddelere ait kromatogram Şekil 5.2’ de yer almaktadır.



Şekil 5.2. 10-50 ppm derişimlerinden elde edilen kafein standartların kromatogramı

YPSK-DAD dedektörü ile geliştirilen yöntemden elde edilen verilerin kabul edilebilir değerlere uygun olup olmadığını tespit etmek için sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Bu testlerde; teorik tabaka sayısı, kuyruklanma, asimetri ve kapasite faktörleri, pik alanlarının ve geliş zamanlarının bağıl standart sapması (%BBS) hesaplanarak sonuçlar Tablo 7.2.’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçların istenilen aralıklarda olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 7.2. Sistem uygunluk testleri sonuçları

Parametre	Analiz değeri	Tavsiye edilen değer
Tutunma zamanı (Rt, dk)	7,945	N/ A
Kapasite faktörü (k')	1,64	> 2
Asimetri faktörü (As)	1,04	0,95<x< 1,2
Kuyruklanma faktörü (T)	1,02	<2
Pik alanın % BSS	0,0009	<1,5
Tutunma zamanının % BSS	0,005	<1

Geliştirilen YPSK-DAD yöntemin validasyonu, ICH tarafından yayınlanan kılavuza göre valide edilmiştir. Bu kılavuz da doğruluk, kesinlik, doğrusallık, aralık, tayin alt sınırı, saptama sınırı, sağlamlık, seçicilik ve ayrıca sistem uygunluk testlerine yer verilmiş olup bunlara göre analiz gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla standart ekleme yöntemiyle geri kazanım çalışması yapılmıştır. Farklı numunelere 3 farklı konsantrasyonlarda standartlar eklenerek sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 7.3.'te yer almaktadır.

Tablo 7.3. Yöntemin doğruluğuna ilişkin yapılan çalışmaların sonuçları

Numuneler	Eklenen standart	Bulunan standart	Geri kazanım %
Örnek 1	40 ppm	39,3664	98,42± 2,13
Örnek 2	25 ppm	24,2025	96,81± 2,13
Örnek 3	10 ppm	10,1033	101,03± 2,13
Ortalama geri kazanım			98,75± 2,13
Standart sapma			2,13
%BSS			0,022
GA _{α=0,005}			± 12,2

Yöntemin kesinliği tekrar edilebilirlik çalışmasıyla bulunur. Yöntemin doğrusallığını bulmak için 10 ppm derişime sahip kafein standardı aynı gün içerisinde ayrıca ardışık 3 günlerde belirlenen analiz koşullarında gerçekleştirilmiştir. Standart sapması, varyans, bağıl standart sapması ve güven aralığının istatistiksel olarak değerlendirilip geliştirilen yöntemin kesinliğinin analitik hassasiyete (% BSS <2) sahip olduğu bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 7.4.'te yer almaktadır.

Tablo 7.4. Kafeinin kesinlik çalışması sonuçları

	1. Gün (n=3)	2. Gün (n=3)	3.Gün (n=3)	Günler arası (n=9)
Ortalama	10,0795	10,0827	9,4375	9,8666
SS	0,009	0,038	0,041	0,323
S ²	8,1x10 ⁻⁵	1,444x10 ⁻³	1,681x10 ⁻³	0,1043
% BSS	8,9 x10 ⁻⁴	3,7x10 ⁻³	4,3x10 ⁻³	0,033
GA _{α=0,005}	± 0,052	± 0,218	± 0,235	± 1,068

Yöntemin doğrusallığını test etmek için 10 ppm ila 50 ppm aralığındaki kafein standartları analiz edilmiştir. Doğrusallığın günler içi ve günler arasındaki değişimini tespit edebilmek için 3 gün boyunca 3 tekrar halinde analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği ile eğim, kesim noktası ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. r^2 değeri 0,999 olarak hesaplanan analizin bu aralıkta doğrusal sonuçlar verdiği söylenebilir. Yöntemin gün içi ve günler arasındaki doğrusallığı Tablo 7.5.'te verilmiştir.

Tablo 7.5. *Gün içi ve günler arası elde edilen doğrusallık analizlerinin sonuçları*

	1. Gün (n=3)	2. Gün (n=3)	3. Gün (n=3)	Günler arası (n=9)
Aralık (ppm)	10 ppm - 50 ppm			
Eğim	13252	7373,1	4811,1	8478,5
Kesim	34908	35173	34823	34968
r^2	0,999	0,999	0,998	0,999

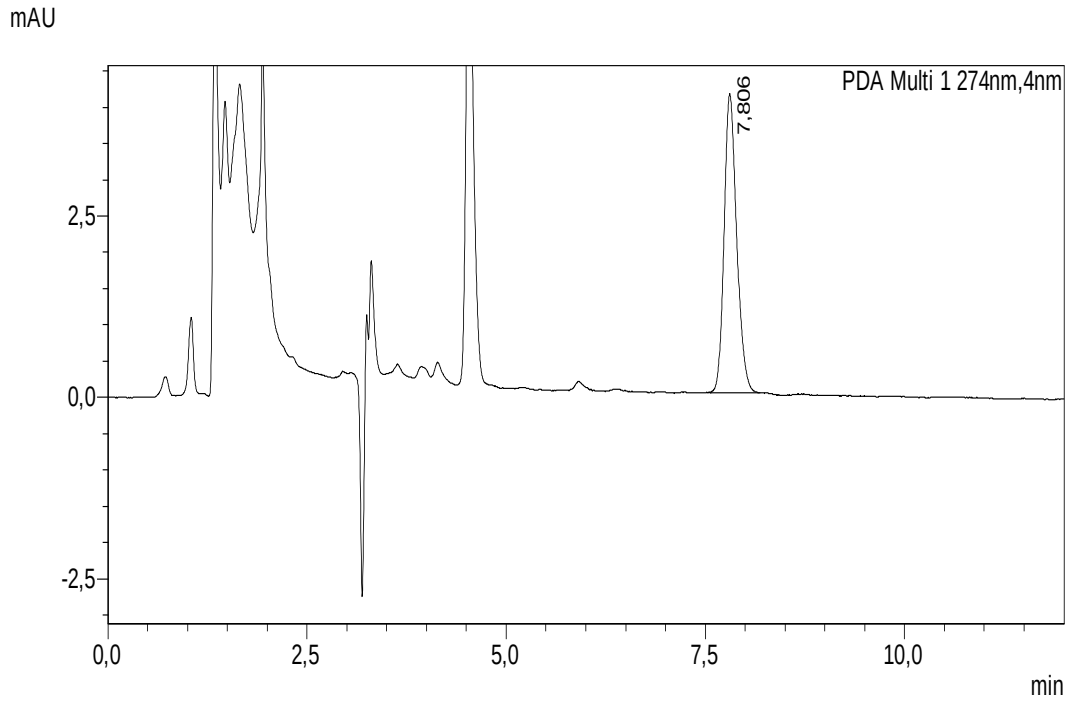
Yöntemin saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ), kalibrasyondan elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Standart sapmanın elde edilen eğime oranının 3,3 katı LOD, 10 katı da LOQ değeri olarak hesaplanmıştır. Elde edilen hesaplamalar sonucunda LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,029 ppm ile 0,088 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu yolla hesaplanan LOD ve LOQ değerleri Tablo 7.6.'da yer almaktadır.

Tablo 7.6. *Elde edilen saptama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri*

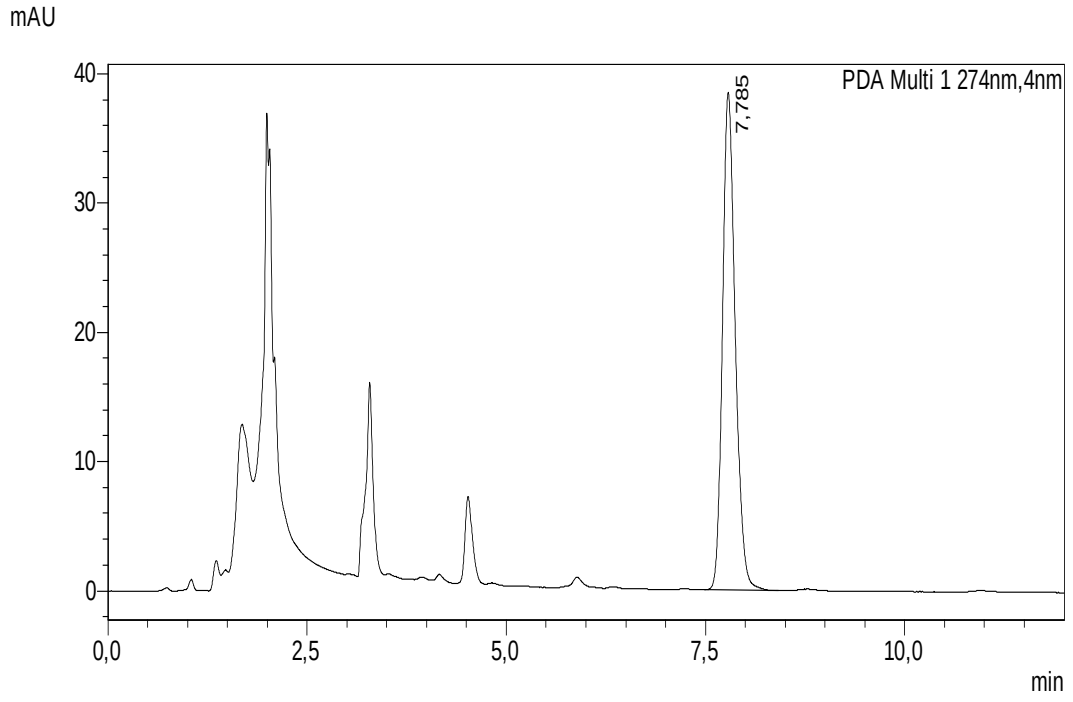
	1. Gün (n=3)	2. Gün (n=3)	3. Gün (n=3)	Günler arası (n=9)
Aralık (ppm)	10 - 50 ppm			
Kesim	13252	7373,1	4811,1	8478,5
Eğim	34908	35173	34823	34968
LOD	0,029	0,134	0,136	1,068
LOQ	0,088	0,406	0,412	3,235

Yöntemin sağlamlığının test edilebilmesi için mobil fazın organik çözücü yüzdesi, akış hızı, kolon sıcaklığı gibi şartlandırma basamakları üzerinde küçük değişiklikler yapılarak kafein sinyalleri incelenmiştir. Mobil fazın bileşiğinin yüzdesi (MeOH: Su, 44:56, *h/h*; MeOH: Su, 46:54, *h/h*), akış hızı (0,6 mL/dk, 0,8 mL/dk) ve kolon sıcaklığı (24°C, 26°C) parametrelerindeki küçük değişikliklerinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde istatistiksel açıdan bir farklılık gözlenmemiştir. Bu da yaptığımız analizlerinin sonuçlarının sağlamlığını doğrular niteliktedir.

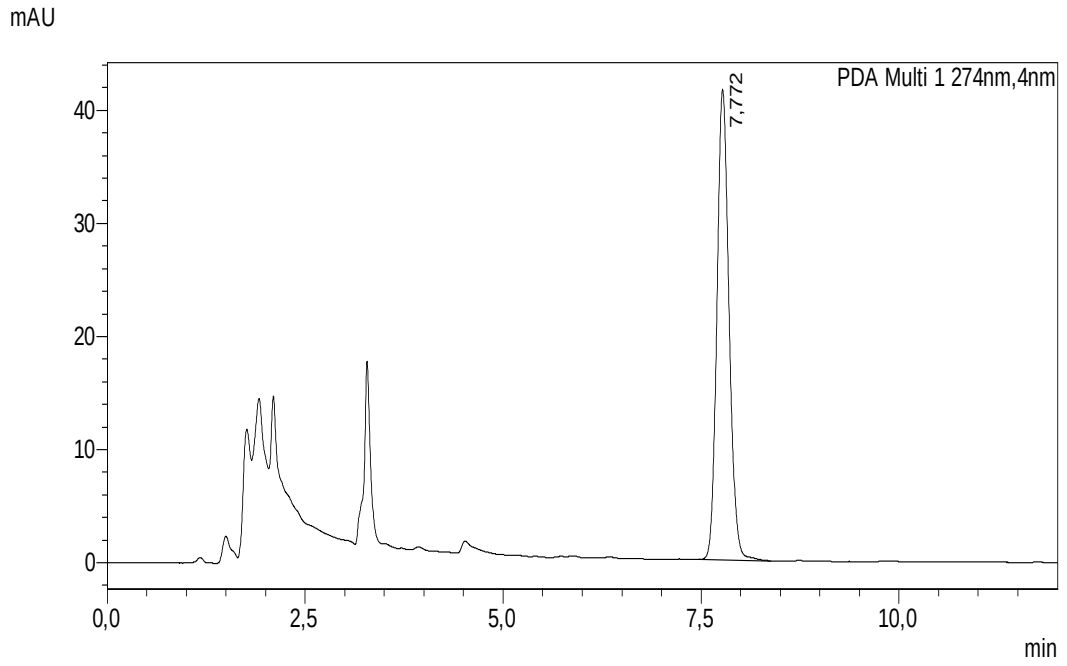
Bu çalışmada, birçok farklı kahve numuneleri piyasadan toplanılarak belirlenen yöntemle göre analizleri yapılmıştır. Bu örneklerden birkaçı Şekil 5.3.ile 5.7. arasında gösterilmiştir.



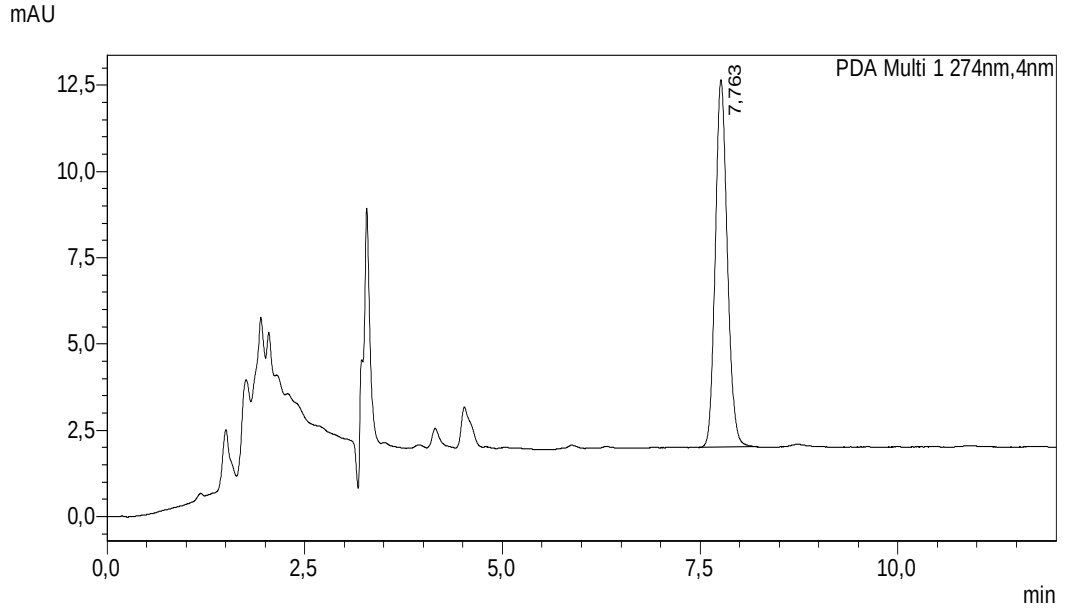
Şekil 5.3. 3 ü 1 arada kahve numunesinden elde edilen kromatogram



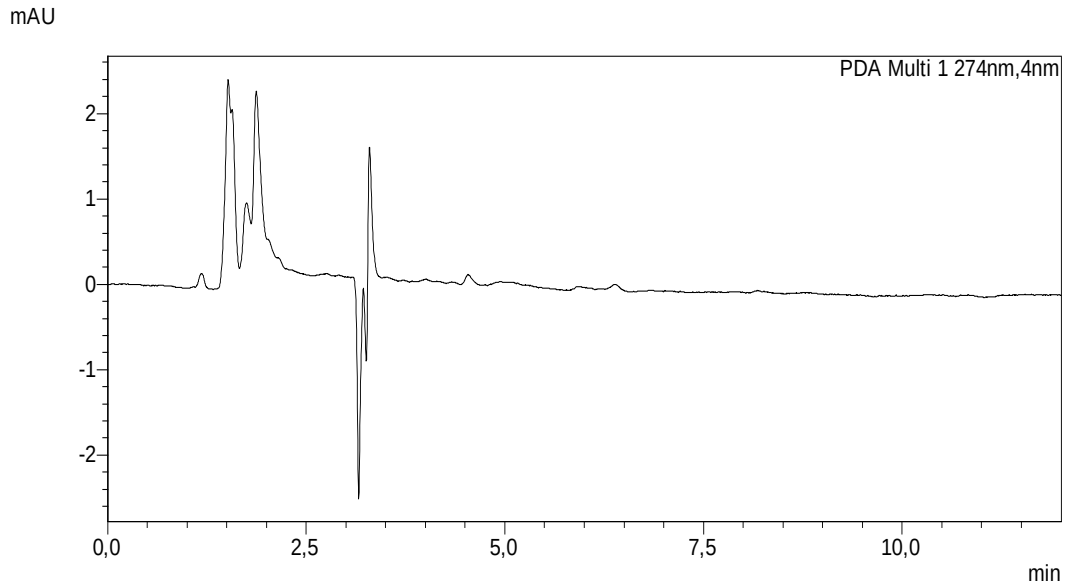
Şekil 5.4. *K. Türk kahvesi numunesinden elde edilen kromatogram*



Şekil 5.5. *Filtre kahve numunesinden elde edilen kromatogram*



Şekil 5.6. *Osmanlı kahve numunesinden elde edilen kromatogram*



Şekil 5.7. *Melengiç kahve numunesinden elde edilen kromatogram*

Demleme yöntemine göre elde edilen kafein miktarları ve oda sıcaklığında analiz edilen 32 kahve örneğinin derişimleri hesaplanarak Tablo 7.7.ile 7.12. arasında gösterilmiştir.

Tablo 7.7. Sıcaklık farklarına göre kafein miktarları

Örnekler	Sıcaklık (°C)	Derişim (ppm)	Alıkonma zamanı (Rt)	mg/ mL
Hazır Kahve	25	33,47	7,794	0,0334
	50	33,59	7,771	0,0335
	75	33,80	7,745	0,0338
	95	34,20	7,862	0,0342
Filtre Kahve	25	123,52	7,772	0,1235
	50	124,50	7,755	0,1245
	75	125,69	7,937	0,1256
	95	127,46	7,854	0,1274
Türk Kahvesi	25	127,16	7,785	0,1271
	50	124,88	7,764	0,1248
	75	126,78	7,76	0,1267
	95	134,43	7,81	0,1344

Tablo 7.8. Hazır kahve örneklerindeki kafein miktarları

Hazır Kahve Örnekleri	Derişim (ppm)	mg./mL
K. 3-1	9,40	0,0094
N. 2-1	29,42	0,0294
C. Soğuk K.	14,37	0,0144
C. Sütli köpüklü K.	90,09	0,0901
N. 3-1	33,47	0,0335

Tablo 7.9. Türk Kahve örneklerindeki kafein miktarları

Türk K Örnekleri	Derişim (ppm)	mg/mL
K. Hazır T.K.	70,41	0,0704
K. Osmanlı T.K.	19,44	0,0194
K. T.K.	119,54	0,1195
T.K.	130,17	0,1301
Çok Kavrulmuş T.K	130,45	0,1304
M.E. T.K	131,57	0,1315
A. T.K.	127,67	0,1276
S. Yeşil K.	60,88	0,0609
M.E. Kafeinsiz K.	23,73	0,0237

Tablo 7.10. Soğuk kahve örneklerindeki kafein miktarları

Soğuk K. Örnekleri	Derişim (ppm)	mg/ mL
C. Kutu Latte	559,29	0,5593
C. Kutu Mocha	386,22	0,3862
N. Xpress	398,75	0,3987

Tablo 7.11. Filtre Kahve örneklerindeki kafein miktarları

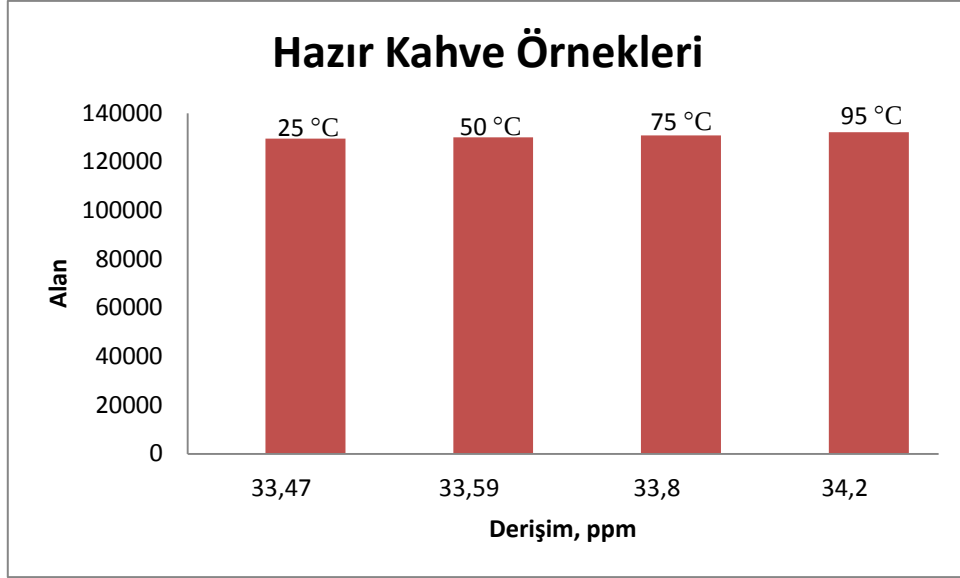
Filtre K Örnekleri	Derişim (ppm)	mg/mL
Cafissimo	136,15	0,1361
C. Hazır F.K	100,14	0,1001
Kâğıt F.K.	145,85	0,1458
F.K	136,38	0,1364
D. F.K	123,52	0,1235
C. Cappucino	27,08	0,0271
Espresso	154,12	0,1541

Tablo 7.12. Aromalı Tük Kahve örneklerindeki kafein miktarları

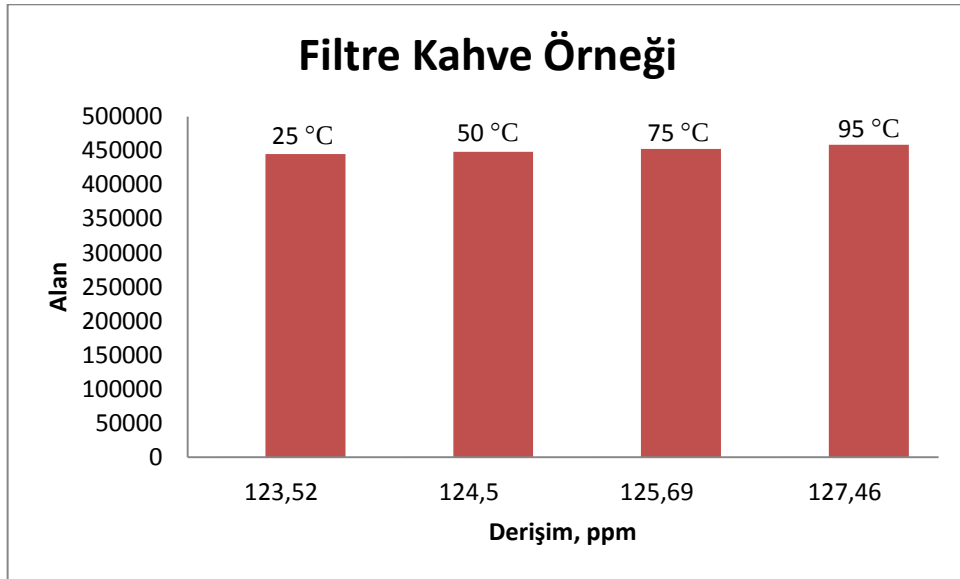
Aromalı K. Örnekleri	Derişim (ppm)	mg/mL
Damla S. T.K.	123,34	0,1233
Osmanlı K.	28,83	0,0288
Güllü K.	111,39	0,1114
Melengiç K.	-	-
Çikolatalı K.	182,92	0,1829
Dağ Çilekli K.	115,37	0,1154
Dibek K.	21,87	0,0218
Hürrem K.	101,69	0,1017
Harem K.	24,82	0,0248
Sütlü K.	59,61	0,0596

Yapılan incelemelerde, Türk kahvesi, filtre kahve ve hazır kahve örnekleri farklı sıcaklıklarda hazırlanan kahve örneklerinin içerdği kafein miktarları belirlenmiştir. Farklı sıcaklıklarda demlenerek hazırlanan kahve örneklerindeki kafein miktarları incelendiğinde hazır kahve filtre kahve ve Türk kahvesinde az da olsa bir değişim meydana geldiği gözlenmiştir. Hazır kahve örneği hazırlandıktan sonra dolapta soğutulmaya bırakılarak her saat başı kafein analizi yapıldı. Elde edilen kafein miktarları arasında yorum yapılabilecek anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. İlerleyen zamanlarda soğuk kahvelerdeki kafein miktarları ile ilgili geniş bir çalışma yapılması düşünülmektedir.

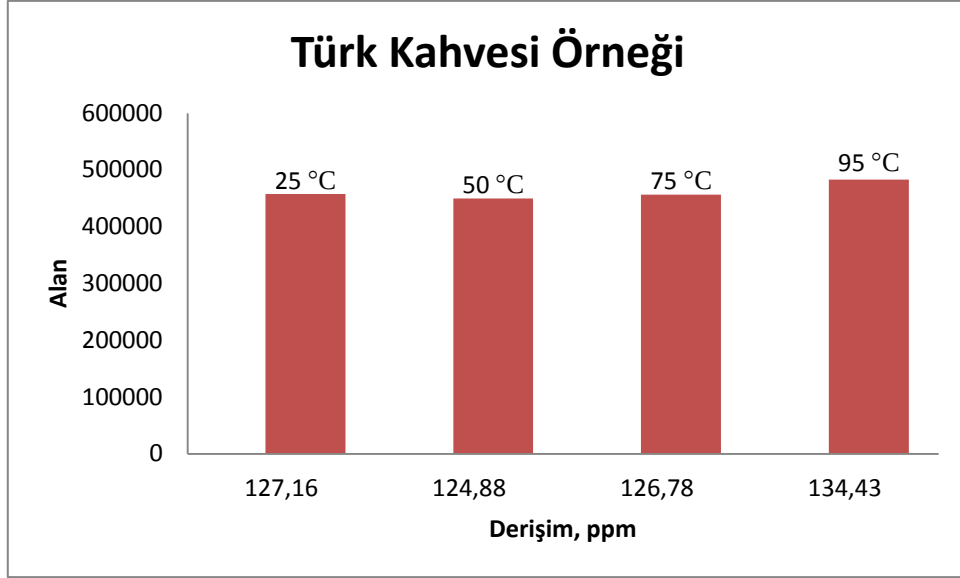
Hazır kahve, filtre kahve ve Türk kahvesinin sıcaklıkla meydana gelen değişim grafikleri Şekil 5.8 ile 5.10. arasında verilmiştir.



Şekil 5.8. Hazır kahve örneğindeki kafein miktarının sıcaklıkla değişimi



Şekil 5.9. Filtre kahve örneğindeki kafein miktarının sıcaklıkla değişimi



Şekil 5.10. *Türk Kahve örneğindeki kafein miktarının sıcaklıkla değişimi*

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde kahve üretimi olmamasına rağmen en çok tüketilen içecek olarak karşımıza çıkmaktadır. Yüksek dozlarda tüketilen kafeinin insan sağlığına olumsuz etkileri olmaktadır. Kafeine karşı intoleransı olan kişilerin kafeini günlük tüketilmesi gereken miktarın üzerine çıkarmamaları sağlık açısından önemlidir.

Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde BEF Fajaha ve H Susanti X,Y,Z örneklerinin analizinden elde edilen bir şişedeki kafein miktarlarını sırasıyla 132,05 mg, 109,70 mg ve 147,70 mg olarak hesaplamıştır. Mustafa Hancı vd. kahve numunelerindeki kafein miktarlarını sırasıyla hazır kahvelerde 1 litresinde en çok 509 mg ile en az 207 mg aralığında; Türk kahvelerinde en çok 827 mg ile en az 398 mg arasında; hazır kafeinsiz kahve numunesinde ise 30 mg bulmuştur.

Bu çalışmada, demleme yöntemi ile elde edilen kafein miktarları standart bir fincan kahve için (100 mL) hazır kahve örneğinde 3,42 mg; Türk kahvesinde 13,44 mg; filtre kahvede 12,74 mg olarak bulunmuştur. Oda koşullarında hazırlanan aromalı kahvelerde 1,53 mg ile 12,80 mg ve hazır kutu (33 mL) kahvelerde ise 12,75 mg ile 18,46 mg arasında değerler elde edilmiştir. Kafeinsiz kahveden elde edilen kafein miktarı (100 mL) ise 2,37 mg olarak bulunmuştur.

İnsanların Türk kahvesinden 5 g civarında alarak hazırladığı varsayılırsa bir fincanındaki kafein miktarı yaklaşık olarak 672 mg eder ve bu da günlük alınması gereken miktarın biraz üstündedir. Hazır kahveden (18 g) elde edilen kafein miktarı da yaklaşık 61,56 mg eder. Bu da günde 5 fincan hazır kahve sınırı aşılmaması önerilebilir.

KAYNAKÇA

- 1- Heckman M.A¹, Weil J, Gonzalez de Mejia E, Caffeine (2010). (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J. Food Sci.*, 75(3), 77–87.
- 2- Frary C.D¹, Johnson R.K, Wang M.Q (2005). Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *J. Am. Diet. Assoc.*, 105(1), 110–113.
- 3- Saltan F.Z, Kaya H. (2018). Kahve: Bir farmakognozik derleme. *FABAD J. Pham. Sci.*, 43(3), 279-289
- 4- Nurminen M.L, Niittynen L., Korpela R., Vapaatalo H.(1999). Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(11):831-839.
- 5- Higdon J.V, Frei B.(2006). Coffee and Health: A Review of Recent Human Research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.,46(2), 101-123.
- 6- A. Cano Marquina , Tarin J.J , A. Cano (2013). The impact of coffee on health. *Maturitas*, 75(1): 7-21.
- 7- Crews H.M, Olivier L, Wilson L.A. (2001). Urinary biomarkers for assessing dietary exposure to caffeine. *Food Addit Contam*, 18(12), 1075-1087.
- 8- James J. (2004). Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. *Psychosomatic Medicine*, 66(1), 63-71.
- 9- Bhatti S.K, O’Keefe J. H, Lavie C.J. (2013). Coffee and tea: perks for health and longevity? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16(6), 688-697.
- 10- Patil H¹, Lavie C, O’Keefe J.H. (2011). Cuppa Joe: Friend or Foe? Effects of Chronic Coffee Consumption on Cardiovascular and Brain Health, *Missouri Medicine*, 108(6), 339-346.
- 11- Production Guideline Coffee (*Coffea* spp.) (2012). Department of agriculture, Forestry and Fisheries. Republic of South Africa, printed and published by department of agriculture. Forestry and Fisheries.
- 12- Perrone D¹, Donangelo C. M¹, Farah A². (2008). Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography- mass spectrometry. *Food Chem.*, 110(4), 1030-1035,

- 13- Ky C.L, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noiro M. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea Arabica* L. And *Canephora* P. Accessions. *Food Chem.*, 75(2), 223-230.
- 14- Trugo L, C, Macrae R. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.*, 15(3) ,219-227.
- 15- Yılmaz D¹., Acar- Tek.N², Sözlü S. (2017). Turkish cultural heritage: a cup of coffee. *Journal of Ethnic Foods*, 4(4), 213-220.
- 16- Kaz G.F, Öztürk N, Demiray G, Tufan O, Turan G, Noyan N.E, Demirli A.O, Birincioglu G, Aydın C, Bilirgen E, Turan A.Z (2011). Tüm Zamanların Hatırına Sarayda Bir Fincan Kahve. Edited by Grand National Assembly of Turkey Head of the National Palaces.
- 17- Toros T (1998). Kahvenin Oyküsü, *İletişim Yayınları*: İstanbul.
- 18- Murray J, Bradley H, Craigie W, Onions C.T (1893). A New English Dictionary on Historical Principles, vol. II. *Oxford: Clarendon Press*, 589.
- 19- Özdem F. (2009). Karaların ve Denizlerin Sultanı, cilt 2. Yapı Kredi Yayınları: İstanbul
- 20- Kaye Alan S. (1986). The etymology of coffee: The dark brew. *Journal of the American Oriental Society*, 106(3), 557-558.
- 21- Van Arendok C. (1997). “Kahwa”. *Encyclopedia of Islam* (New edition), vol. IV. Leiden.
- 22- Abraham-Barna C.G (2013). The term of Turkish coffee e a semasiological approach. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 19(2), 271-275.
- 23- Heisse U (1996). Kahve ve Kahvehane, Dost Kitapevi: Ankara
- 24- Işın E. (1994). Coffee houses [Dünden Bugüne İstanbul Ansiklopedisi]. In *İstanbul Encyclopedia from past to today*. History Foundation Ministry of Culture Publications: İstanbul, Turkey, 386-392.
- 25- Işın E. (2001). “Bir İçecekten Daha Fazla: Kahve ve Kahvehanelerin Toplumsal Tarihi.” Tanede Saklı Keyif, Yapı Kredi Yayınları: İstanbul
- 26- Braudel F. (1985). Kahvenin Batı'da yayılması. (çev. Mehmet Genç) *Tarih Ve Toplum*, 14, 22-23.
- 27- Evren B. (1997). Eski İstanbul Kahvehaneleri, Milliyet Yayınları: İstanbul

- 28- Güray C. (2010). Archaic heritage combining two cities: coffee and coffee house culture from İstanbul to Paris. *Journal of İz Atılım University*, 9, 51-54.
- 29- Duvarcı A. (2012). Kültürümüzde İstanbul kahvehaneleri ve halk edebiyatına katkıları. *Journal of Life Sciences*, 1(1),75-86.
- 30- Brando C.H.J. (2004). Harvesting and green coffee processing. Wintgens J.N. (editör), Coffee: growing, processing, sustainable production: a Guidebook for growers,processors, traders, and researchers. Wiley-VCH Verlag GmbH, 604.
http-1: <https://doi.org/10.1002/9783527619627.ch24>. (erişim tarihi: 12.10.2019)
- 31- Gürsoy D. (2007). Sohbetin bahanesi kahve Oğlak Yayınları: İstanbul
- 32- Wongs P¹, Khampa N², Horadee S², Chaiwarith J³, Rattanapanone N⁴. (2019). Quality and bioactive compounds f blends of Arabica and Robusta spray-dried coffee. *Food Chemistry*, 283, 579-587.
- 33- Shehata A.B^a, Rizk M.S^b, Rend E.A. (2016). Certification of caffeine reference material purity by ultraviolet/visible spectrophotometry and high-performance liquid chromatography with diode-array detection as two independent analytical methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24, 703-715.
- 34- Tastan Y.K. (2009). Sufi Sarabından Kapitalist Metaya Kahvenin Oyküsü. Akademik bakış, 2(4), 53-86.
- 35- Coffee.Worldmarkets and trade United States department of agriculture (USDA) foreign agricultural service. International Coffee Organization, World coffee consumption; December 2016
http-2: <http://www.fas.usda.gov/data/coffee-worldmarkets> and trade
http-3:<http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf> (erişim tarihi 10.12.2019).
- 36- Ergener R. (2002).About Turkey: geography, economy, politics, religion, and culture. Pilgrim's Process, Inc. Boulder Co., 41.
- 37- M. Duran (2004).Kahve etüdü, dış ticaret araştırma servisi.
http-4:<https://www.scribd.com/document/6867018/Kahve-Etudu-2004> (erişim tarihi 1.10. 2019).
- 38- International Coffee Council (ICC) 109th Session 24-28 September 2012. London, United Kingdom. Trends in coffee consumption in selected importing countries. 14 September 2012.

- 39- Mesfine S, Legesse A, Israel A. (2018). Determination of coffeine content of Bale coffee using HPLC analysis. *Food Science and Quality Management*, 73, ISSN 224-6088.
- 40- Gracia-Lor E¹, Rousis N.I², Zuccato E², Bade R² Baz-Lomba J.A⁴, Castrignano E⁵, Causanilles. A⁶, Hernández. F., Kasprzyk- Hordern B⁵, Kinyua J⁸. McCall A.K.⁹, van Nuijs A.L.N. Plósz G.B¹⁰, Ramin P¹¹. Ryu Y⁴. Santos M.M., Thomas. K., de Voogt P¹⁴, Yang Z¹⁵, Castiglioni S¹⁶. (2017). Estimation of caffeine intake from analysis of caffeine metabolites in wastewater. *Sceince of the Total Environmen*, 609, 1582-1588
- 41- Kebene G.M, T. B. Tamene. (2017). Determination of coffeine in raw and roasted beans of ILU Abba Bora zone, South West Ethiopia. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 7(09), 463-470.
- 42- Wanyika H.N, Gatebe E.G, Gitu L.M, Ngumba E.K and Maritim C.W. (2010). Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market. *African Journal of Food Science*, 4(6),353-358.
- 43- Shrestha S, Pkhrel P, Rijal S.K, and Rai K.P. (2016). A simple HPLC method for determination of caffeine content in tea and coffee. *J. Food Sci. Techol. Nepal*, 9, 74-78.
- 44- Faraja B.E.P and Susanti H. (2017). HPLC determination of caffeine in coffee beverage. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 259,conference 1
- 45- Guidelines of the European Commisison about labelling of guinine and caffeine containing beverage, 2002.
[http-5:\[http://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_02_1096\]\(http://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_02_1096\)](http://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_02_1096)
(erişim tarihi: 11.08.2019)
- 46- Smith B.D, Gupta U, Gupta B.S.(editörler) Caffeine and activation theory: effects on health and behavior CRC Press, 331–334.
- 47- McCusker RR, Goldberger BA, Cone EJ. (2003). Caffeine content of specialty coffees. *J Anal Toxicol*, 27(7), 520-522.
- 48- Dyt. Ülger N. (2015). Türk kahvesi ve bazı kahve karışımlarının total fenol içeriği ve antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması. Yüksel Lisans Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Beslenme Bilimleri Programı.

- 49- Liguori A¹, Hughes J.R, Grass J.A. (1997). Absorption and subjective effects of caffeine from coffee, cola and capsules. *Pharmacol Biochem Behav.*,58(3), 721-726.
- 50- Lelo A, Birkett D.J, Robson R.A, Miners J.O. (1986). Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. *Br J Clin Pharmacol*, 22(2), 177–182.
- 51- http-6:<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/theobromine> (erişim tarihi: 11.11.2019)
- 52- http-7:<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/theophylline> (erişim tarihi: 11.11.2019)
- 53- Nehlig A¹ (1999). Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neurosci Biobehav Rev.* 23(4),563-576.
- 54- Ahluwalia N, Herrick K (2015). Caffeine intake from food and beverage sources and trends among children and adolescents in the united states: review of national quantitative studies from 1999 to 2011^{1,2,3,4,5}. *Adv Nutr.*, 6(1), 102-111.
- 55- Burrows T, Pursey K, Neve M, Stanwell P. (2013). What are the health implications associated with the consumption of energy drinks? A systematic review. *Nutr Rev.*, 71(3), 135-148.
- 56- Seifert S.M, Schaechter J.L, Hershorin E.R, Lipshultz S.E. (2011). Health effects of energy drinks on children, adolescents, and young adults. *Pediatrics*, 127(3), 511-528.
- 57- Seifert S.M¹, Seifert S.A, Schaechter J.L, Bronstein A.C, Benson B.E, Hershorin E.R, Arheart K.L, Franco VI, Lipshultz S.E. (2013). An analysis of energy-drink toxicity in the National Poison Data System. *Clin Toxicol. (Phila)*, 51(7), 566-574.
- 58- Sports drinks and energy drinks for children and adolescents: are they appropriate? (2011), *American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition and the Council on Sports Medicine and Fitness pediatrics*, 127, 1182-1189.
- 59- Temple J.L^{1,2}, Bernard C³, Lipshultz S.E⁴, Czachor J.D⁴, Westphal J.A⁴, Mestre M.A⁴. (2017). The safety of ingested caffeine: a comprehensive review. *Front Psychiatry*, 8, 80.

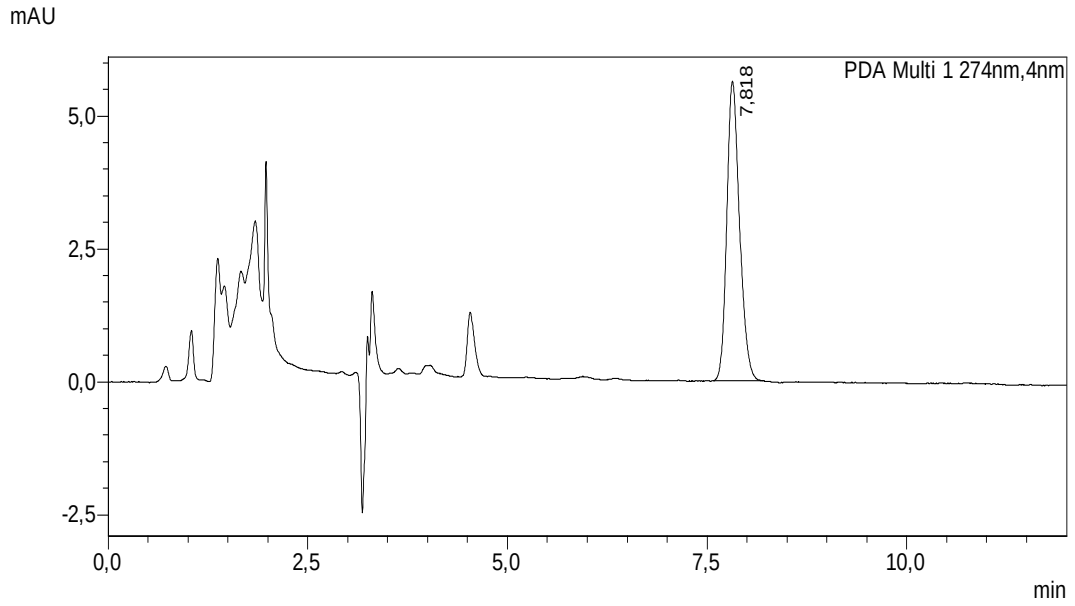
- 60- Barry R.J, Rushby J.A, Wallace M.J, Clarke A.R, Johnstone S.J, Zlojutro I. (2005). Caffeine effects on resting-state arousal. *Clinical Neurophysiology*, 116, 2693-2700.
- 61- Heatherley S.V, Hancock K.M, Rogers P.J. (2006). Psychostimulant and other effects of caffeine in 9- to 11-year-old children. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 47(2), 135-142.
- 62- Nehlig A¹, Daval J.L, Debry G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev.*,17(2), 139-170.
- 63- Garrett B.E, Griffiths R.R. (1998). Physical dependence increases the relative reinforcing effects of caffeine versus placebo. *Psychopharmacology. (Berl)*, 139(3), 195-202.
- 64- Garrett B.E , Griffiths R.R. (1997). The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacol Biochem Behav.*,57(3), 533-541.
- 65- Bernstein G.A¹, Carroll M.E, Dean N.W, Crosby R.D, Perwien A.R, N. Benowitz N.L. (1998). Caffeine withdrawal in normal school-age children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 37(8), 858-865.
- 66- James J.E¹, Rogers P.J. (2005). Effects of caffeine on performance and mood: withdrawal reversal is the most plausible explanation. *Psychopharmacology. (Berl)*, 182(1), 1-8.
- 67- Rogers P.J, Heatherley S.V, Mullings E.L, Smith J.E (2013). Faster but not smarter: effects of caffeine and caffeine withdrawal on alertness and performance. *Psychopharmacology. (Berl)*, 226, 229-240.
- 68- Bernstein G.A, Carroll M.E, Crosby R.D, Perwien A.R, Go F.S, Benowitz N.L. (1994). Caffeine effects on learning, performance, and anxiety in normal school-age children. *Journal of American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 33(3), 407-415.
- 69- Owens J.A¹, Mindell J, Baylor A. (2014). Effect of energy drink and caffeinated beverage consumption on sleep, mood, and performance in children and adolescents. *Nutr Rev.*,72(Suppl 1), 65-71.

- 70- Nunes R.A¹, Mazzotti D.R², Hirotsu C¹, Andersen M.L¹, Tufik S¹, Bittencourt L¹. (2017). The association between caffeine consumption and objective sleep variables is dependent on ADORA2A c.1083T>C genotypes. *Sleep Med.*, 30,:210-215.
- 71- Bryant Ludden A¹, Wolfson A.R. (2010). Understanding adolescent caffeine use: connecting use patterns with expectancies, reasons, and sleep. *Health Educ Behav.*, 37(3), 330-342.
- 72- Coplan J.D, Wolk S.I, Goetz R.R. (2000). Nocturnal growth hormone secretion studies in adolescents with or without major depression re-examined: integration of adult clinical follow-up data. *Biol Psychiatry*, 47, 594-604.
- 73- Cohen-Zion M, Shiloh E. (2017). Evening chronotype and sleepiness predict impairment in executive abilities and academic performance of adolescents. *Chronobiology International*, 35(1), 1-9.
- 74- Cannon M.E¹, Cooke C.T, McCarthy J.S. (2001). Caffeine-induced cardiac arrhythmia: an unrecognised danger of healthfood products. *Med. J. Aust.*, 174(10), 520-521.
- 75- Arroyo-Gomez J.J^a, Villarroel-Rocha D^a, de Freitas-Araujo K.C^b, Carlos A. Martinez-Huitle^{b,c}, Sapag K^a. (2018). Applicability of activated carbon obtained from peach stone as an electrochemical sensor for detecting caffeine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 822, 171-176.
- 76- Willson C. (2018). The clinical toxicology of caffeine: a review and case study. *Toxicology Reports*, 5, 1140-1152.
- 77- Lawrence E.L. (1986). What you need to know about food and cooking for health. *Viking Company*, 5(235), 254-258.
- 78- Jong-Sup Jeon^a, Han-Taek Kim^a, Il-Hyung Jeong^a, Se-Ra Hong^a, Moon-Seog Oh^a, Kwang-Hee Park^a, Jae-Han Shim^b, A.M.Abd El-Aty^{c,d}. (2017). Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various condition. *Journal of Chromatography B*, 1064, 115-123.
- 79- Jeanne C.S. (1987). Introductory clinical pharmacology. *J. B. Uppimcott Company*, 3(19), 122-125.
- 80- Stanley D, Passmore R, Brock J.F. (1979). Human nutrition and dietics. *Longman Publishers*, '(11), 200.

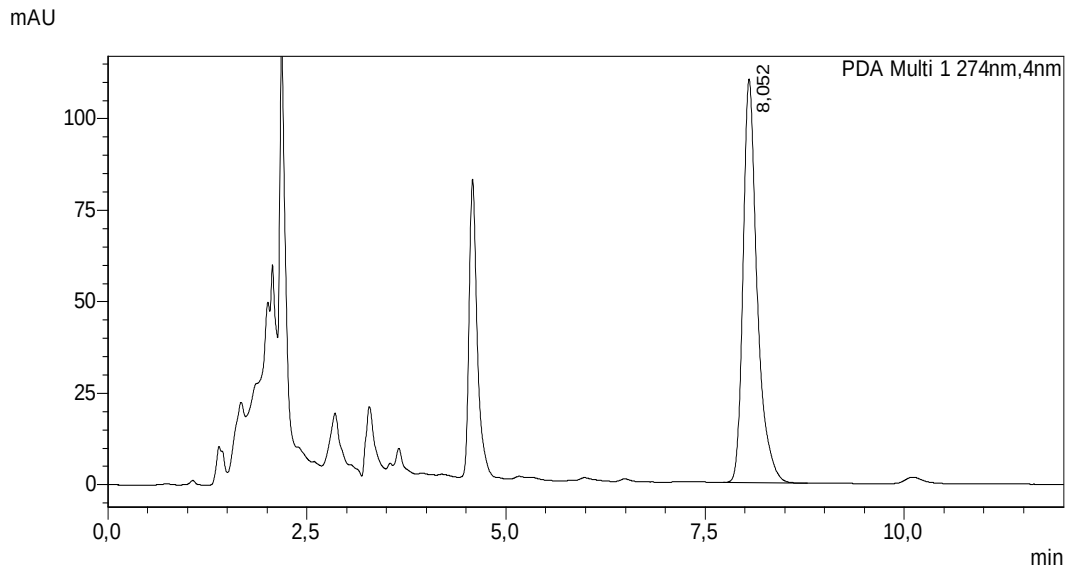
- 81- Akan, H. (2011), Kahve ve Sağlık, Mikado Yayınları: İstanbul.
- 82- Yrd. Doç. Dr. Diltemiz, S.E, Yrd. Doç. Dr. Süzen Y, Yrd. Doç. Dr. Yılmaz F, Arş. Gör. Dr. Ermiş E, Yrd. Doç. Dr. Berber H, Yrd. Doç. Dr. Özcan A. Yrd. Doç. Dr. Çimen Y. Yrd. Doç. Dr. Şahin M, Arş. Gör. Dr. Özcan A. (2011). Aletli Analiz Kitabı, Yrd. Doç. Dr. Diltemiz (editör). Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi. Eskişehir, 274-280.
- 83- Skoog A. D, West D. M, Holler F. J, Crouch S. R (2011). Analitik Kimya Temel İlkeleri 2. Prof. Dr. Kılıç E, Prof. Dr. Yılmaz H. (çeviri editörleri) Cilt 1. (8. Baskı). Ankara, 982-992.
- 84- Eser B, Dinçel A.S. (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanımında basit ipuçları. *Journal of Health Service and Education*, 2(2), 51-57
- 85- Yrd. Doç. Dr. Diltemiz, S.E, Yrd. Doç. Dr. Süzen Y, Yrd. Doç. Dr. Yılmaz F, Arş. Gör. Dr. Ermiş E, Yrd. Doç. Dr. Berber H, Yrd. Doç. Dr. Özcan A. Yrd. Doç. Dr. Çimen Y. Yrd. Doç. Dr. Şahin M, Arş. Gör. Dr. Özcan A. (2011). Aletli Analiz Laboratuvar Kitabı, Yrd. Doç. Dr. Diltemiz (editör). Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi. Eskişehir, 137-140.

EKLER

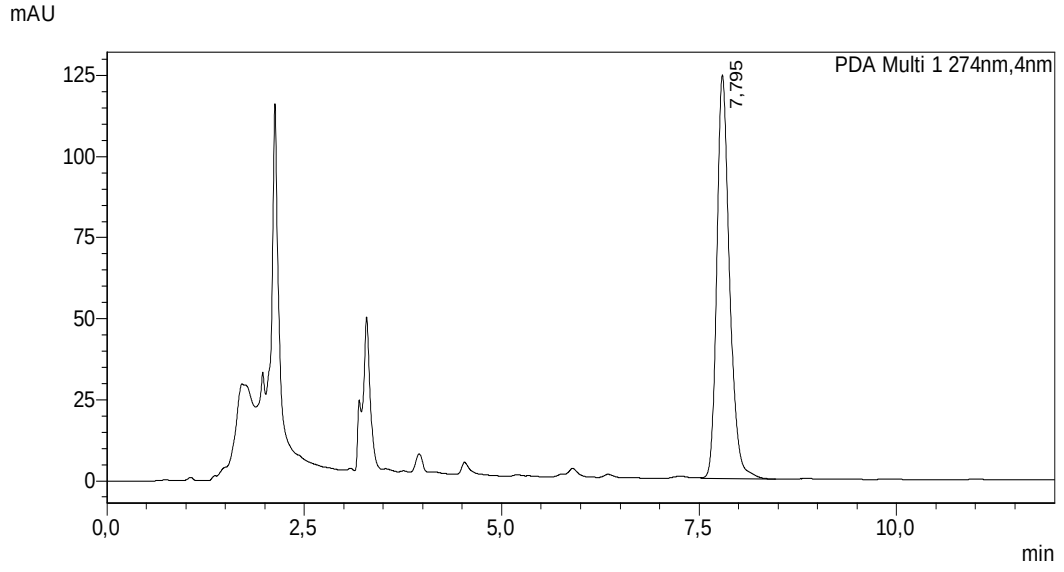
EK- 1 C. Soğuk Kahve Örneğinin Kromatogramı



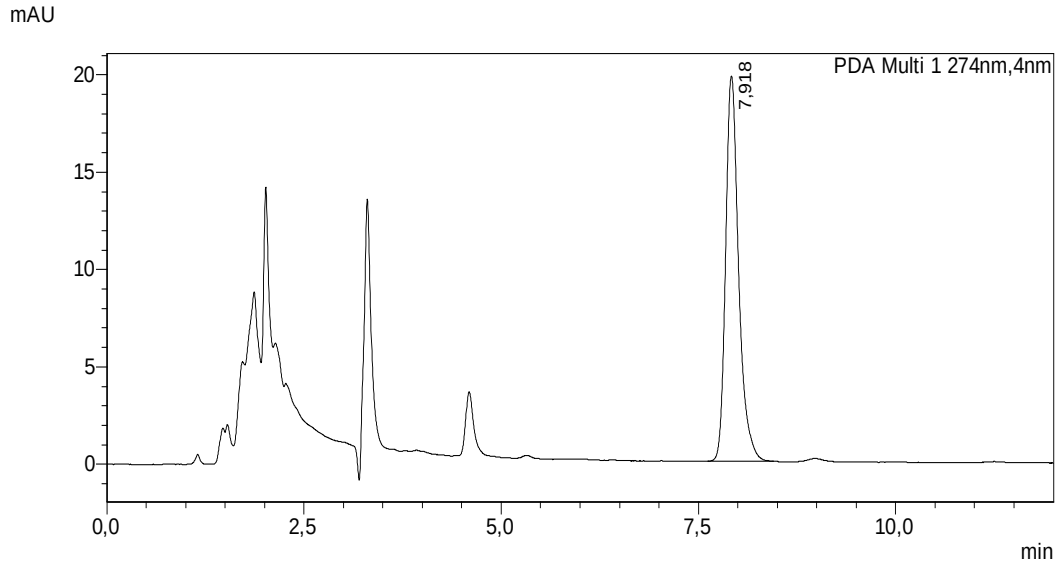
EK- 2 C. Kutu Mocha Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



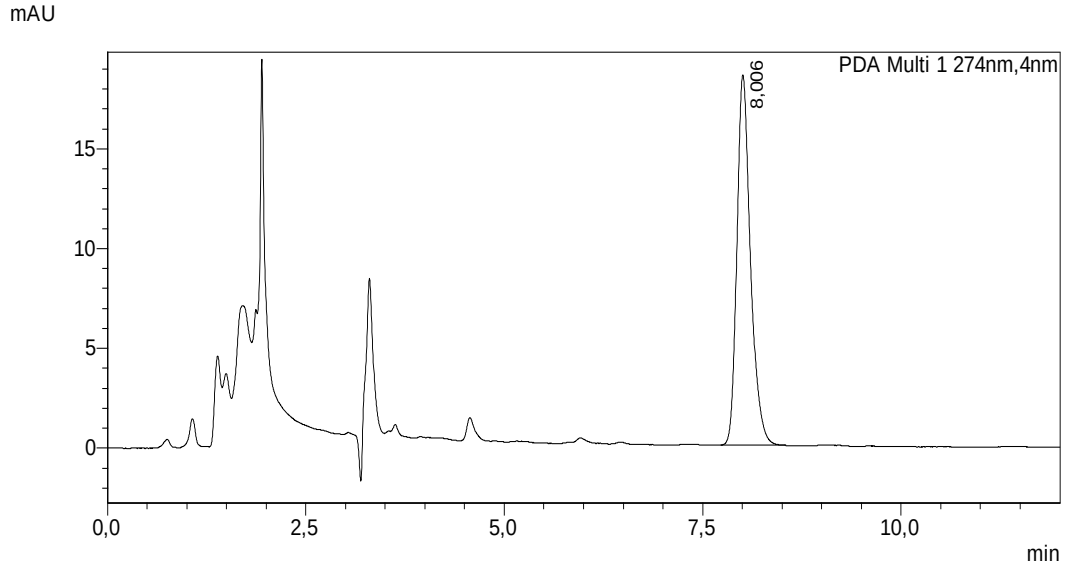
EK-3 C. Hazır Filtre Kahve Örneğinin Kromatogramı



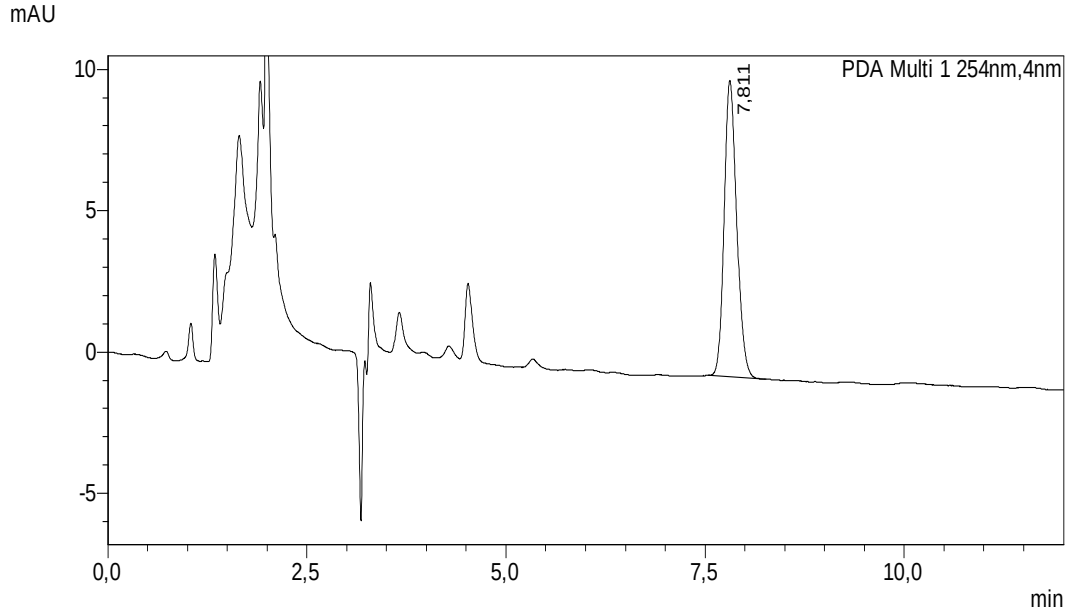
EK- 4 Yeşil Kahve Örneğinin Kromatogramı



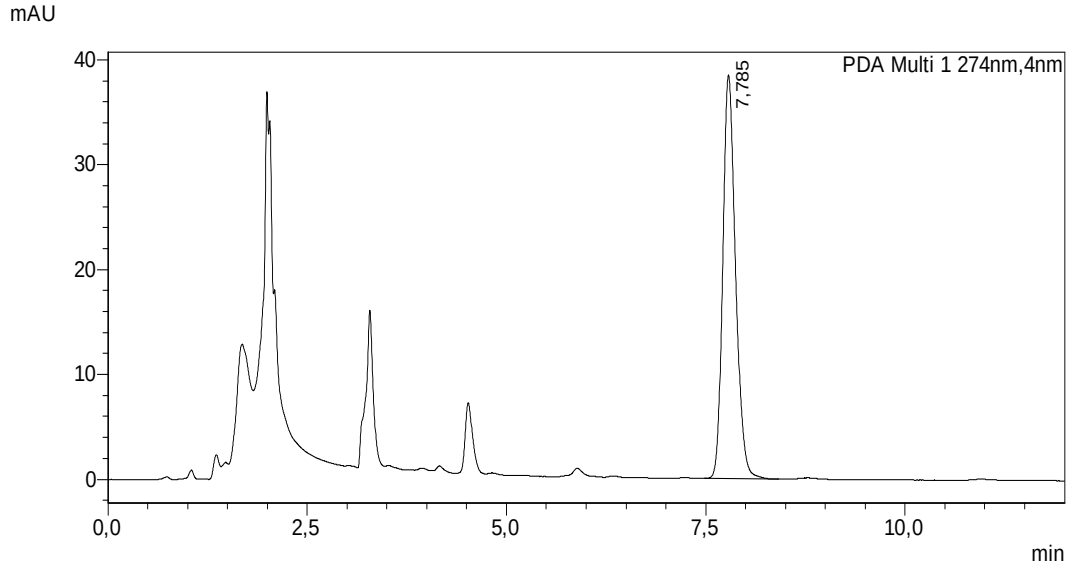
EK- 5 Sütli Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



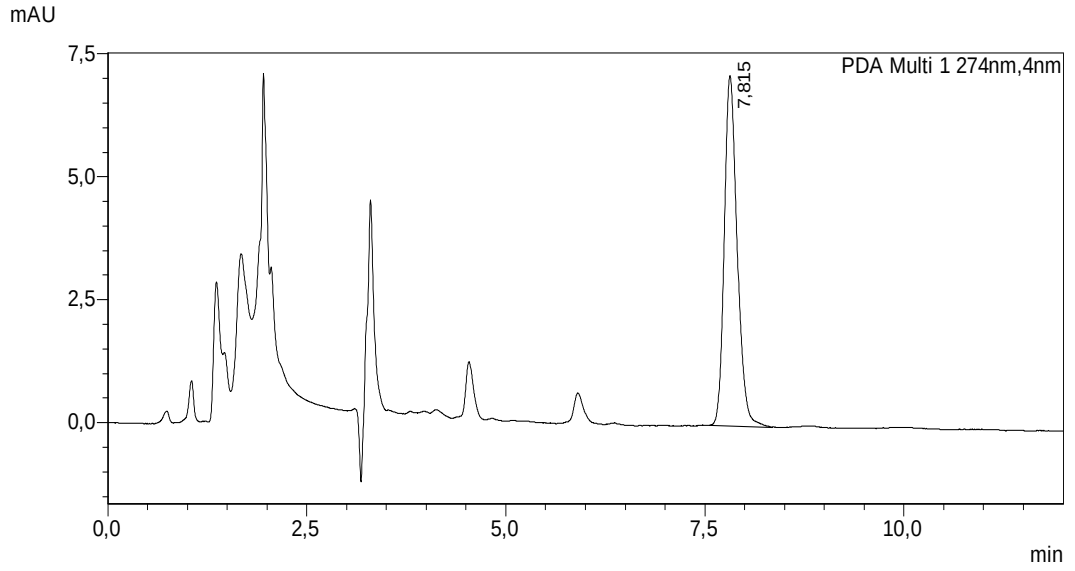
EK- 6 Hazır kahve 2 Si 1 Arada Kahve Örneğinin Kromatogramı



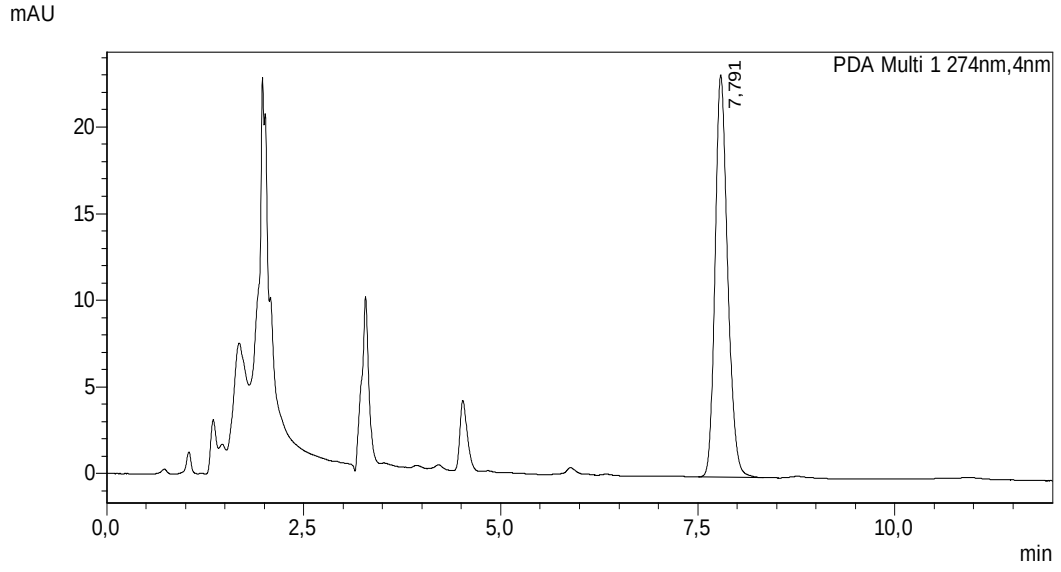
EK- 7 K₁. Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



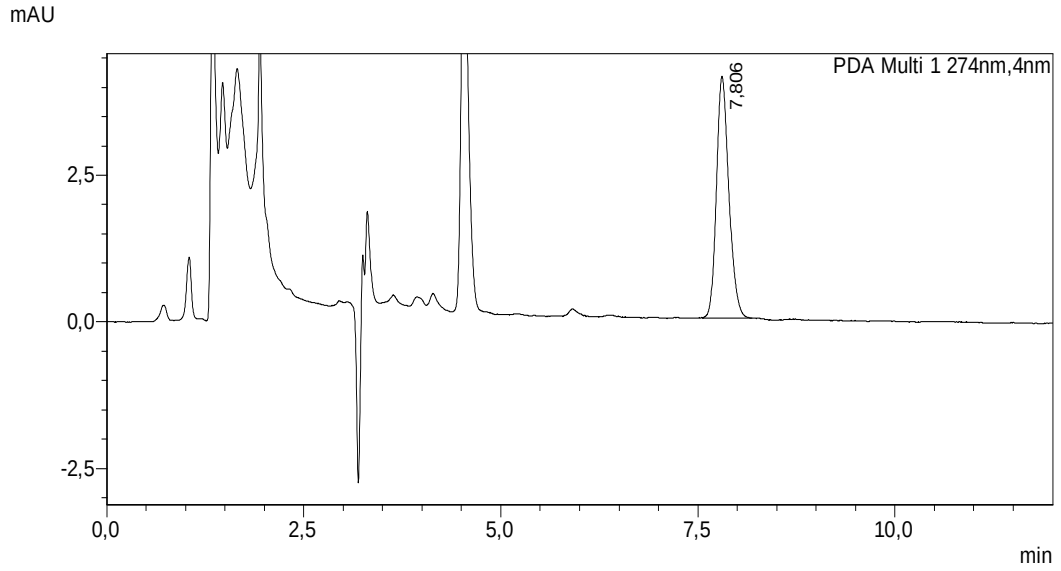
EK- 8 K₂ Osmanlı Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



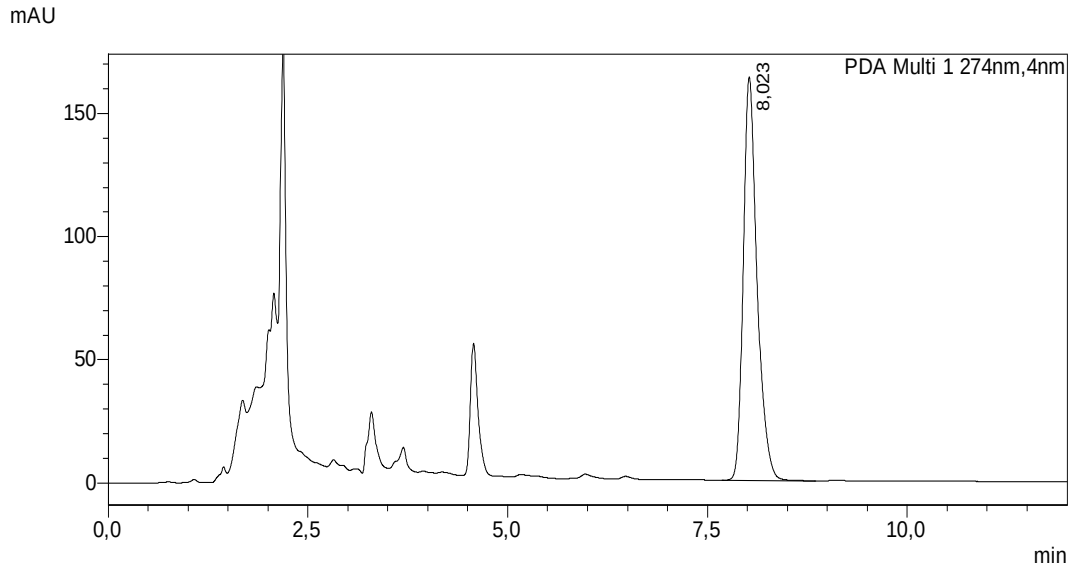
EK- 9 K₂ Hazır Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



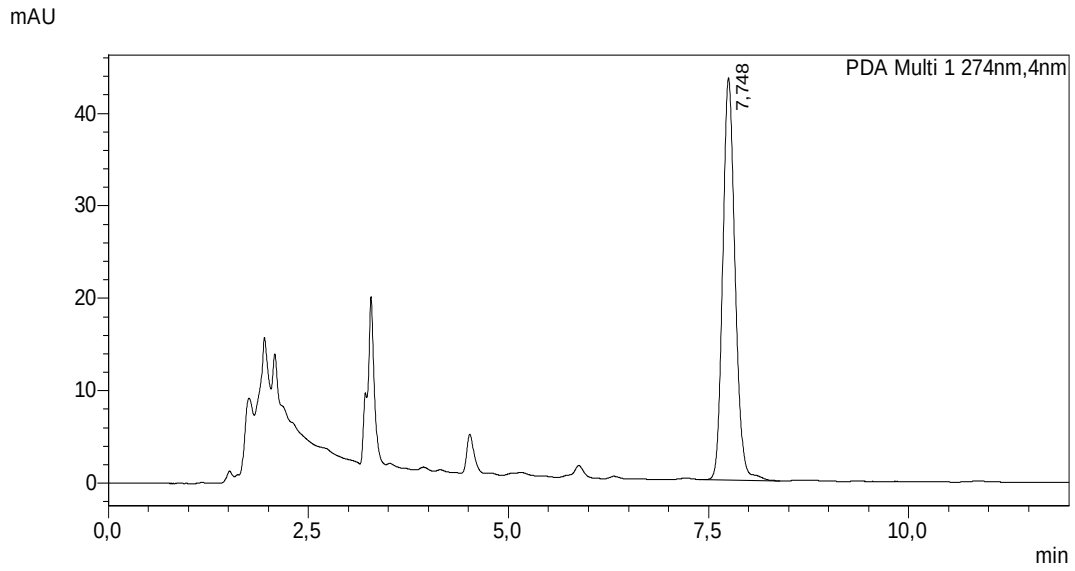
EK- 10 K₂ 3 in 1 Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



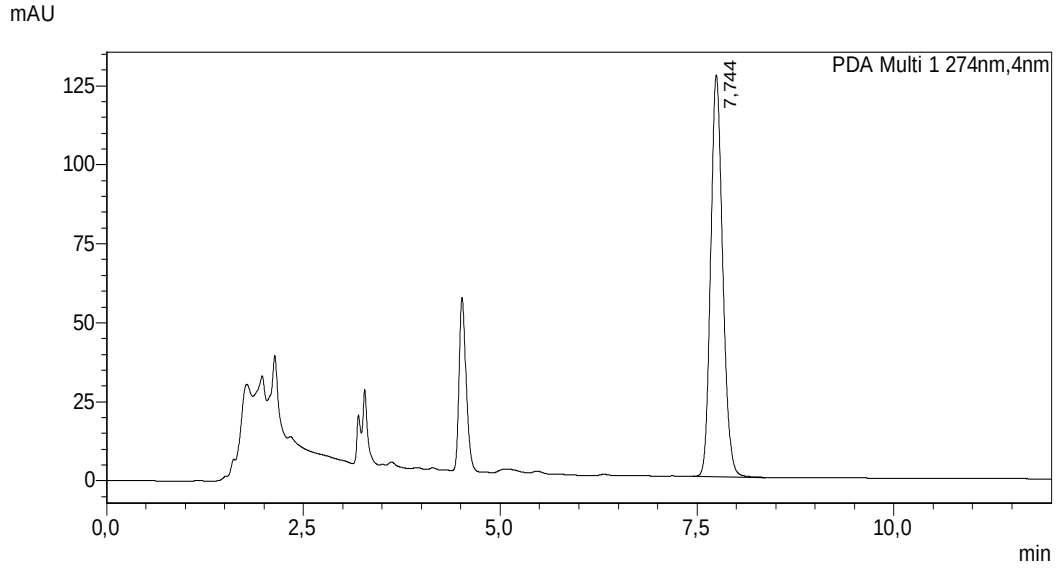
EK- 11 C. Kutu Latte Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



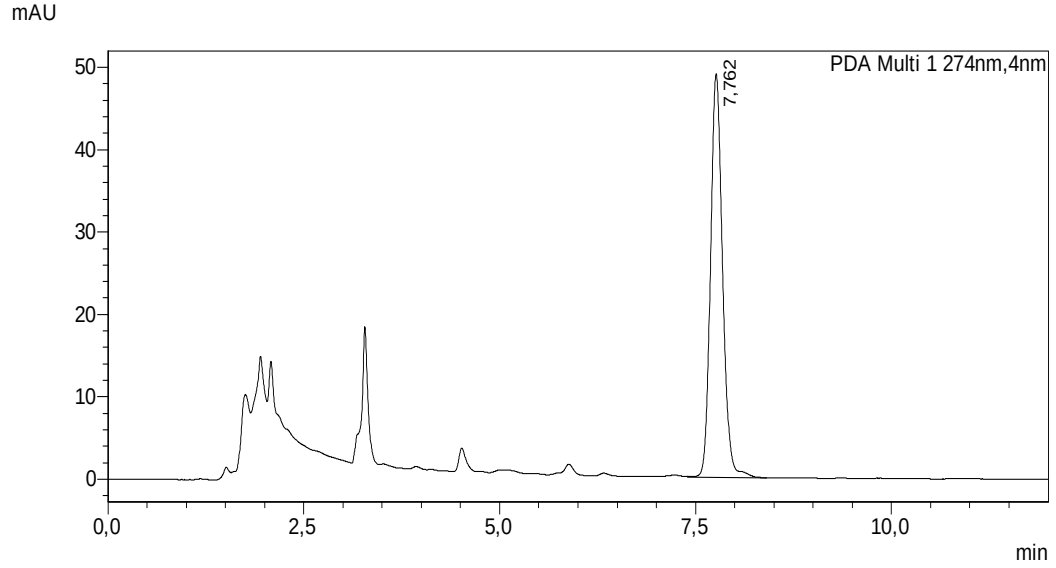
EK- 12 Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



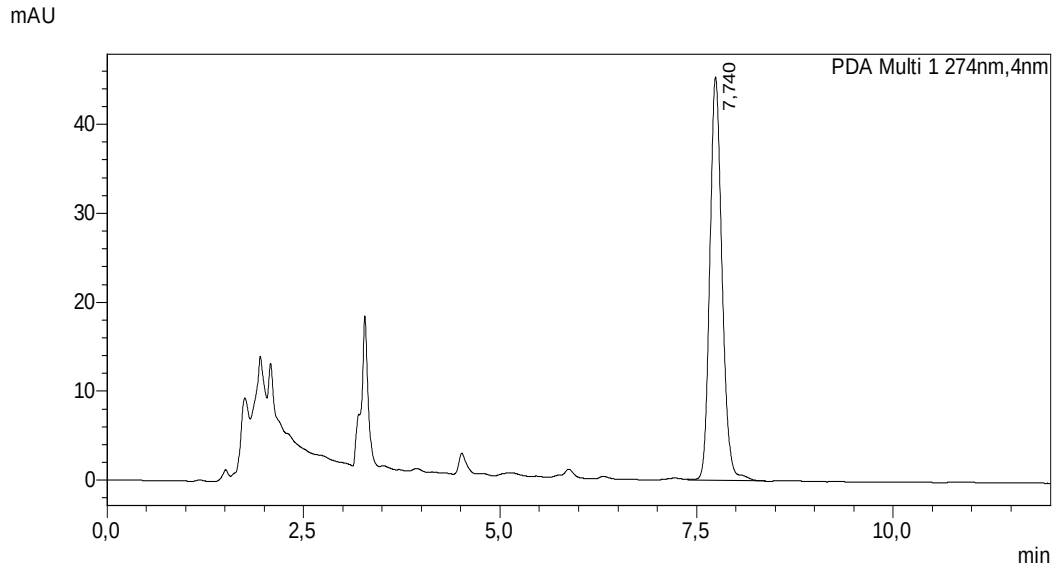
EK- 13 Hazır Kahve Örneğinin Kromatogramı



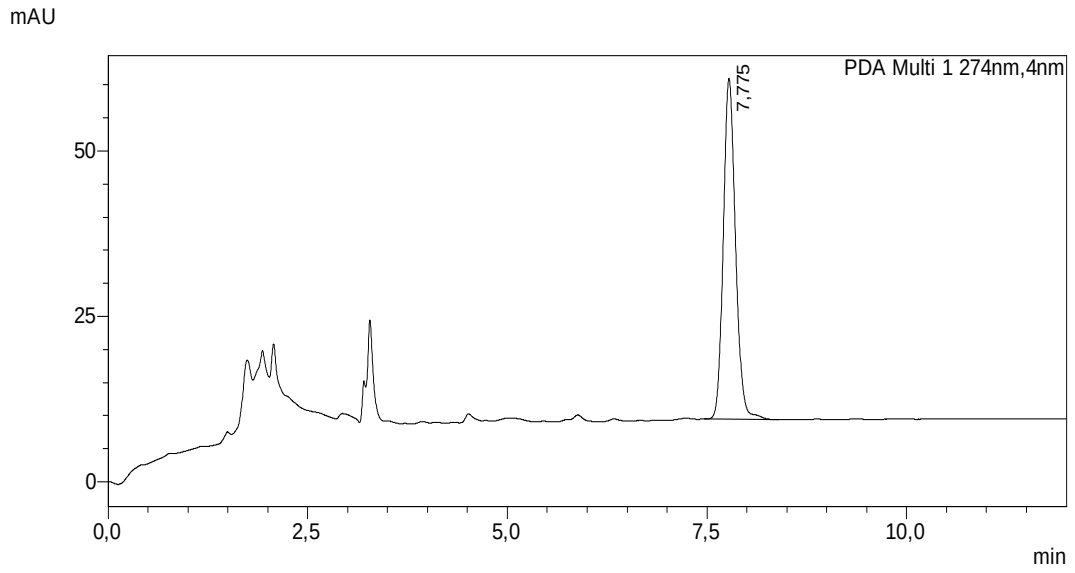
EK- 14 Kağıt Filtre Kahve Örneğinin Kromatogramı



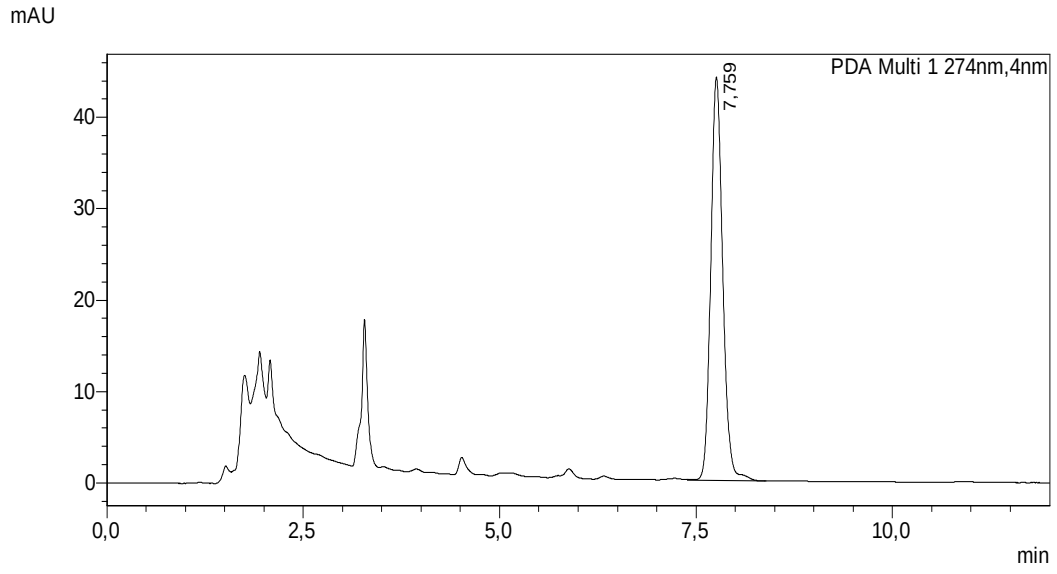
EK- 15 Filtre Kahve Örneğinin Kromatogramı



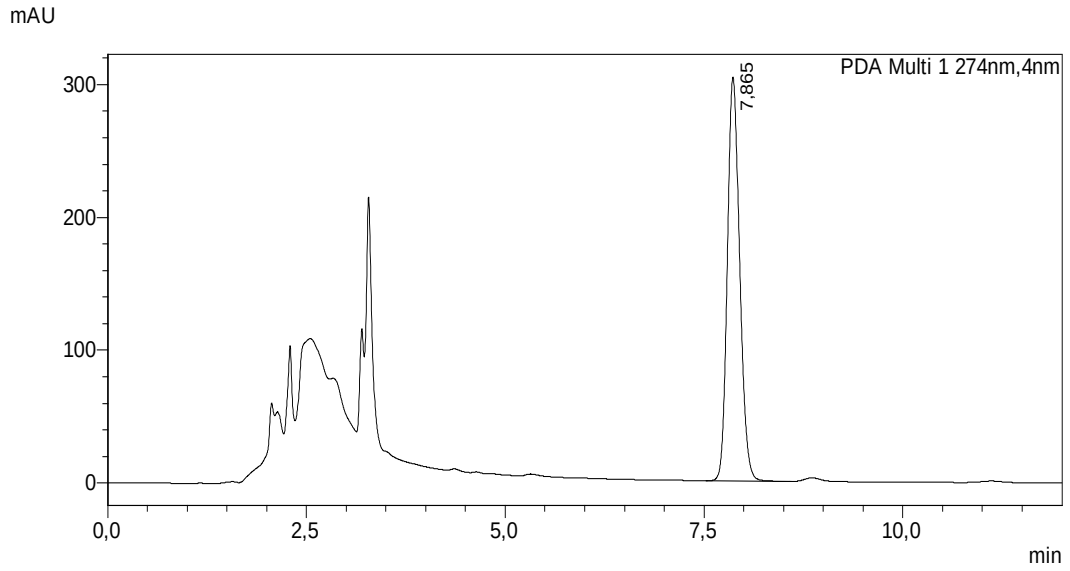
EK- 16 Espresso Kahve Örneğinin Kromatogramı



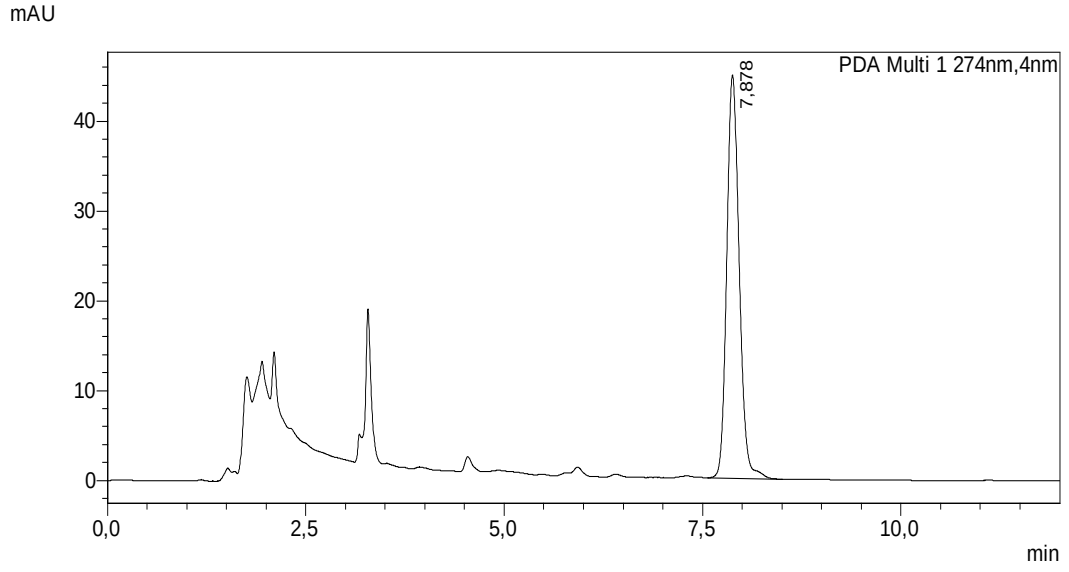
EK- 17 Çok Kavrulmuş Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



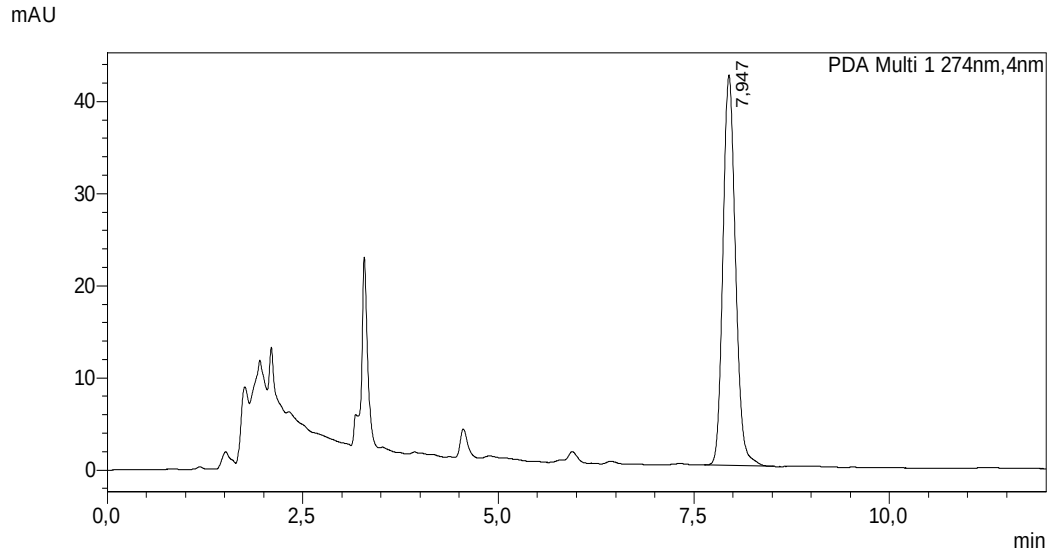
EK- 18 Latte Sütü Köpüklü Hazır Kahve Örneğinin Kromatogramı



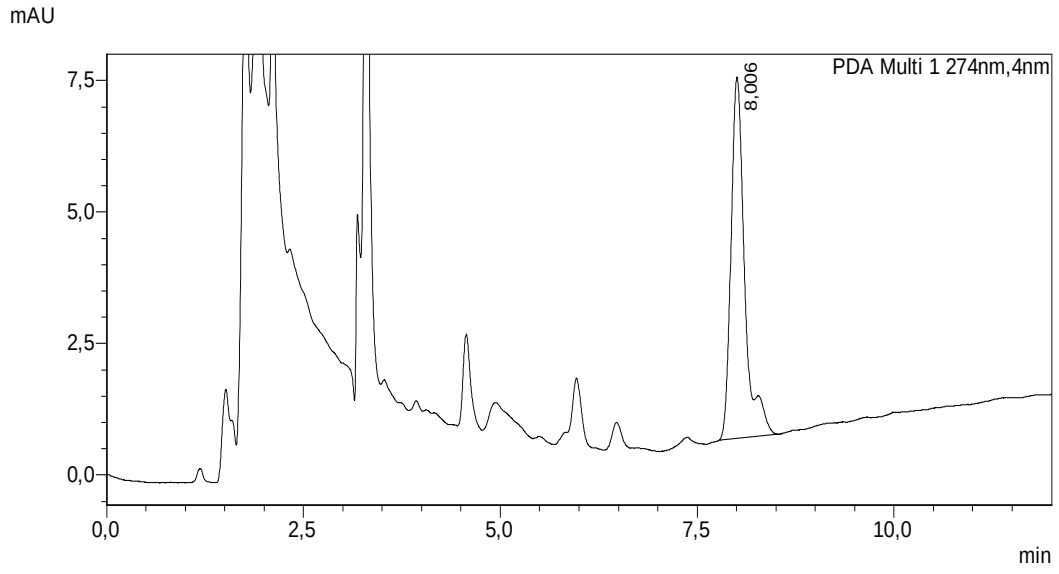
EK- 19 Cafissimo Filtre Kahve Örneğinin Kromatogramı



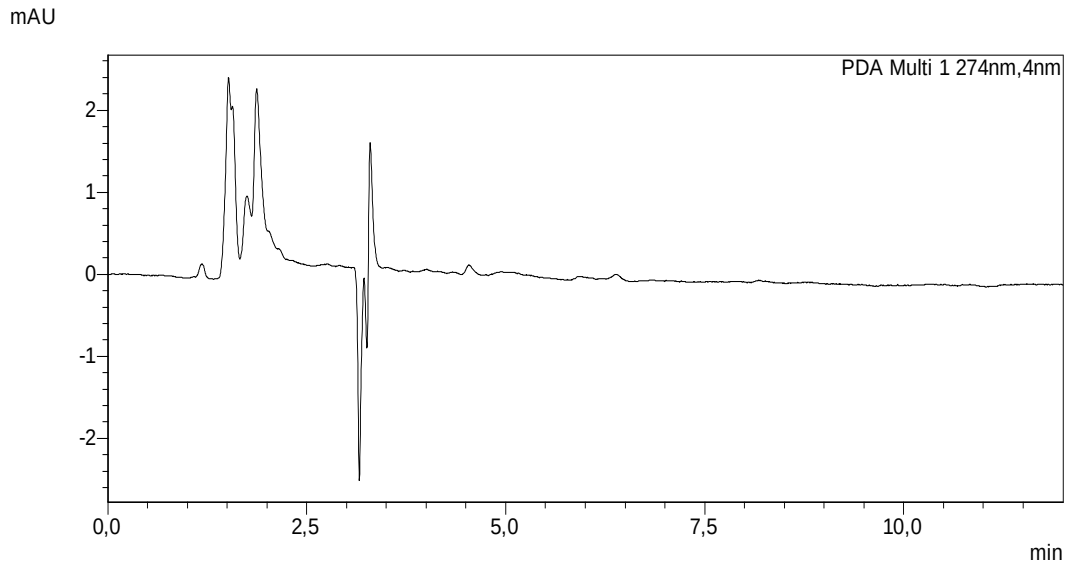
EK- 20 M.E.K. Kahve Örneğinin Kromatogramı



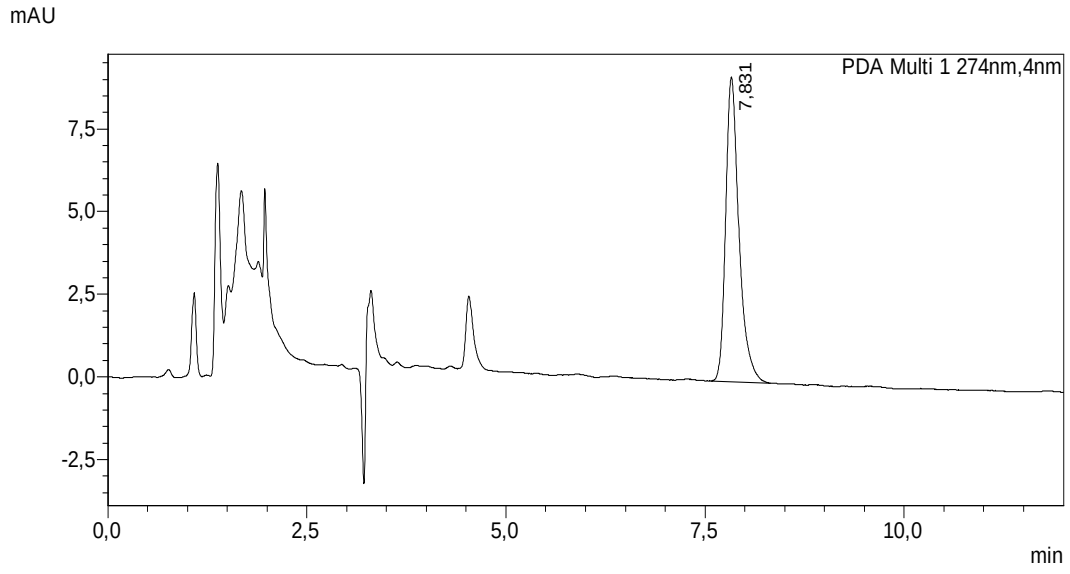
EK- 21 M.E Kafeinsiz Kahve Örneğinin Kromatogramı



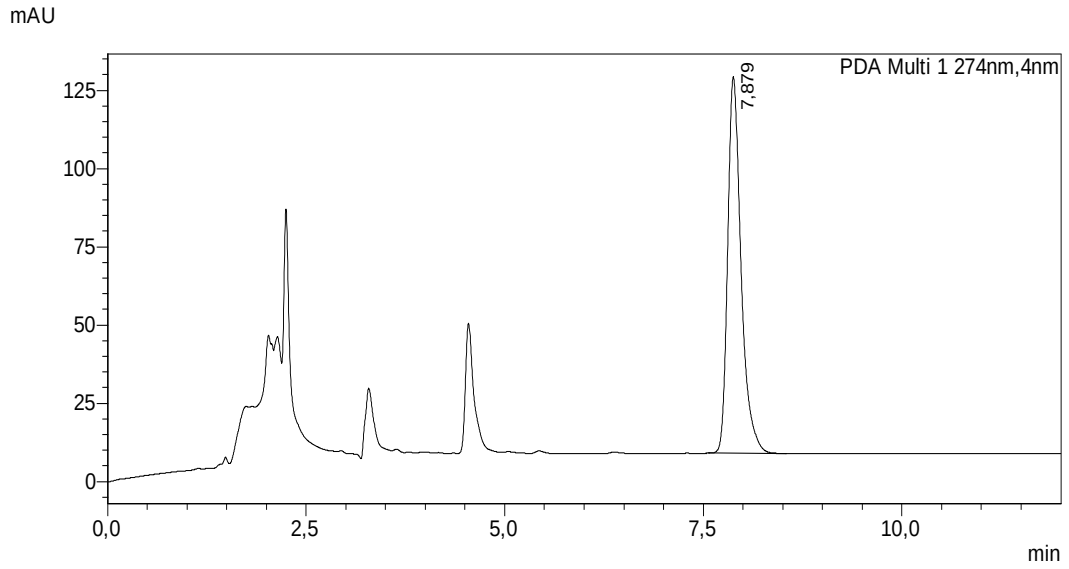
EK- 22 Melengiç Kahve Örneğinin Kromatogramı



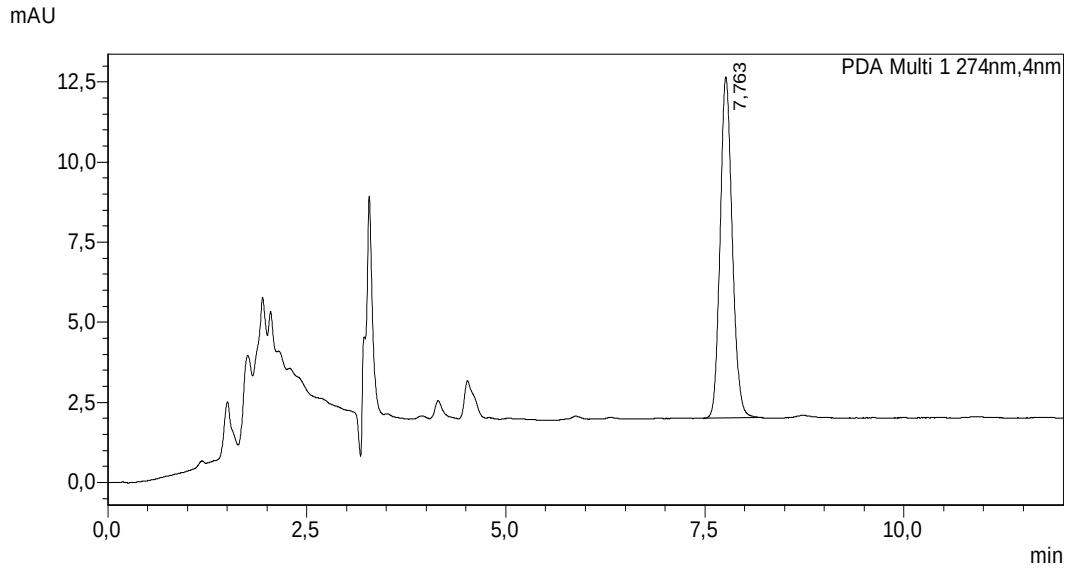
EK- 23 C. Cappuccino Kahve Örneğinin Kromatogramı



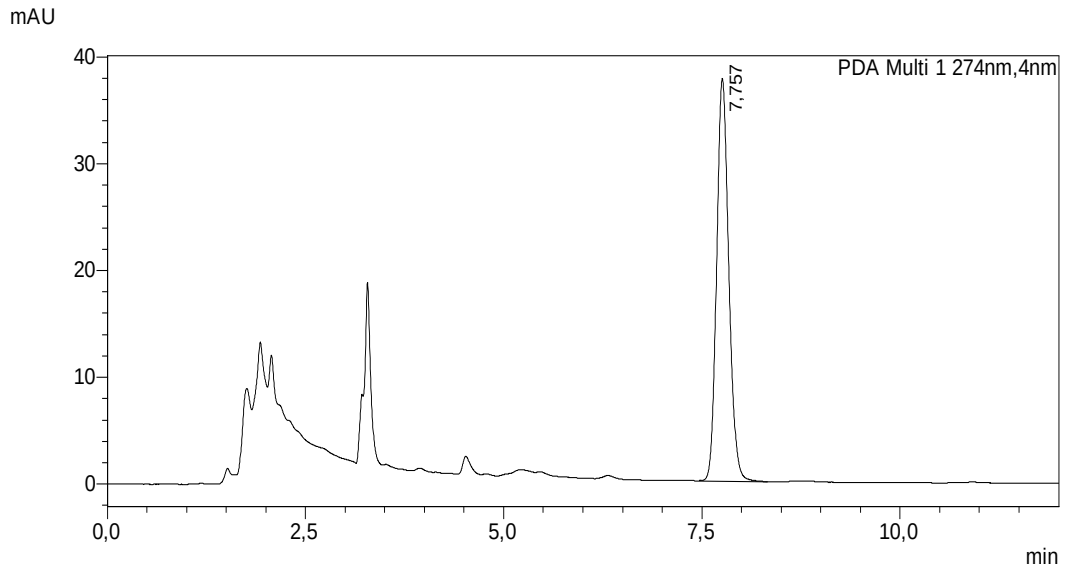
EK- 24 N. Xpress Kahve Örneğinin Kromatogramı



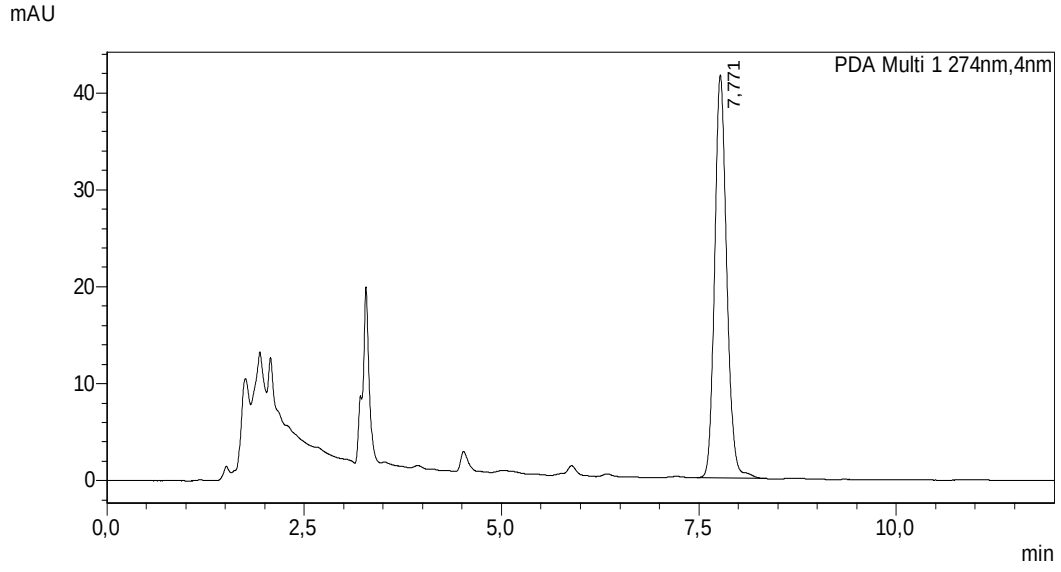
EK- 25 Osmanlı Kahve Örneğinin Kromatogramı



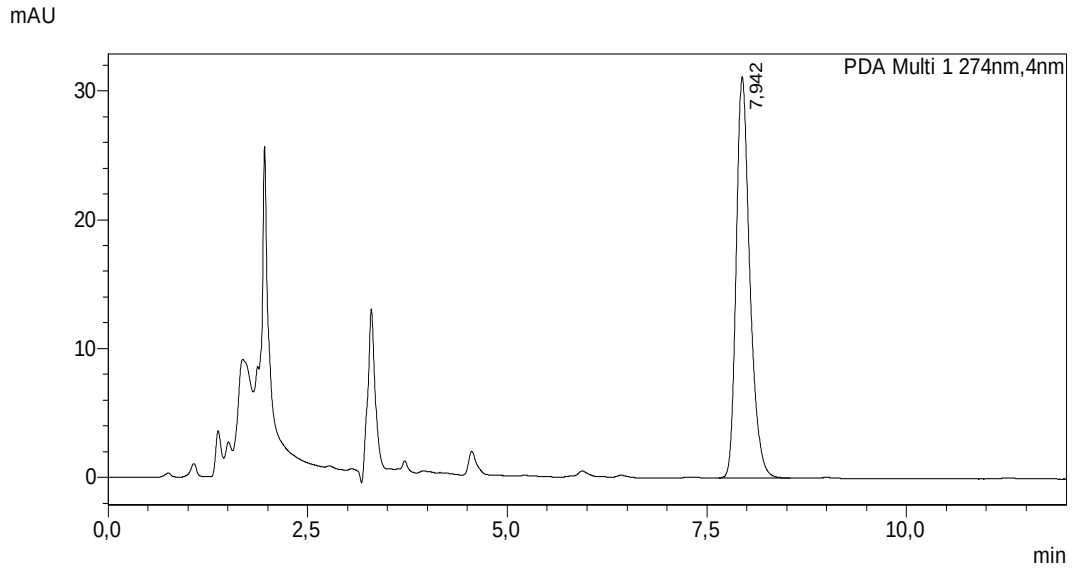
EK- 26 Güllü Kahve Örneğinin Kromatogramı



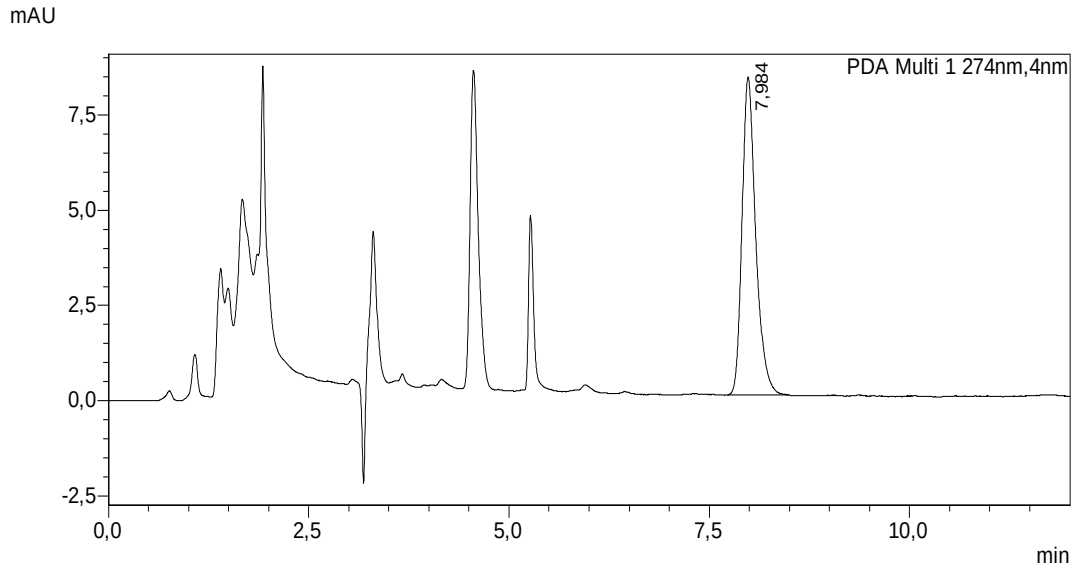
EK- 27 Damla Sakızlı Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



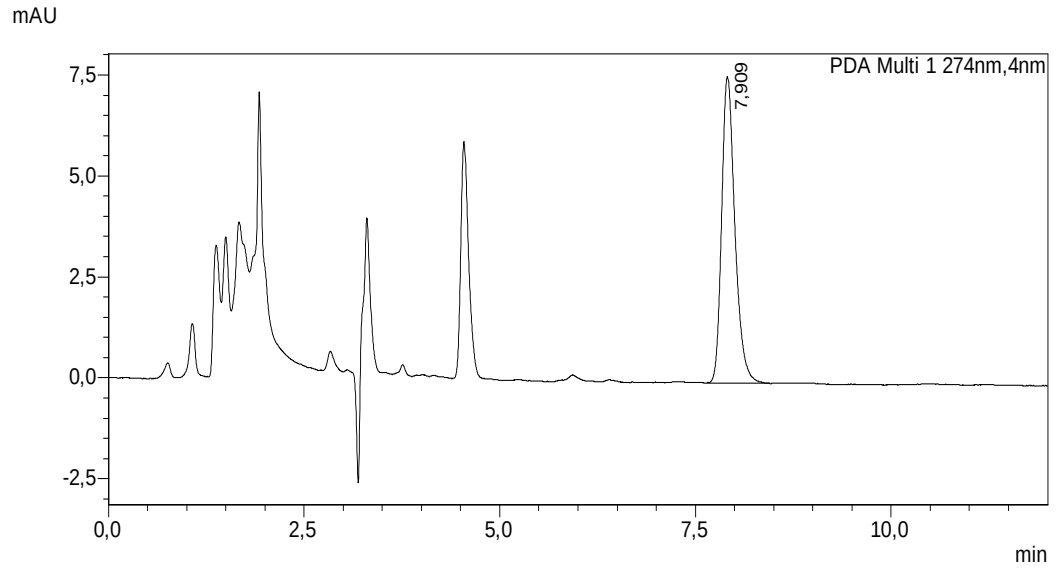
EK- 28 Hürrem Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



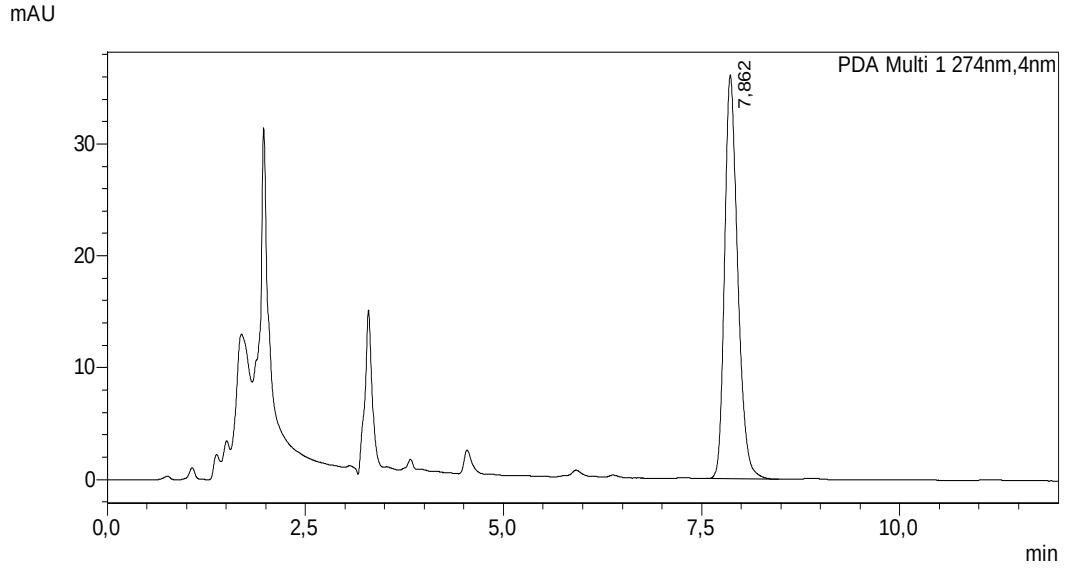
EK- 29 Harem Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



EK- 30 Dibek Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



EK- 31 Dağ Çilekli Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı



EK- 32 Çikolatalı Türk Kahvesi Örneğinin Kromatogramı

