Spectrophotometeric determination of phenols using gallic acid and iron in different samples of tea.

التقدير الطيفي بحامض الكاليك للفينولات وعنصر الحديد في نماذج مختلفة من الشاي.

أ.م. د. عارف محسن لفته الفتلاوي * م.م.نبراس محمد عبد الرسول عباس *
* مركز بحوث السوق وحماية المستهلك - جامعة بغداد

الخلاصة :

تم التقدير الطيفي لنماذج عددها سبعة من الشاي الأسود : (أحمد،لندن) و(العطور،سيلان) و(محمود،سيلان) و(التفاحة،سريلانكا) و(الوزة، سيلان) و(جوهرة الربيع، الهند) و(شاي فل أسود). أستخلصت عينات الشاي بالماء المقطر اللآيوني وبالأستعانة بمنحي المعايرة القياسي لحامض الكاليك كمادة مرجعية في حساب الفينولات في محاليل الشاي. أستخرجت تراكيز الفينولات في نماذج الشاي بجهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV-Visible عند الطول الموجي 280 نانومتر .

أظهرت النتائج أن أعلى تركيز للفينولات هو لشـــاي الوزة 3758 ملغم/لتر أو 75.2 mg GAE / gm of dry tea وحـامضية pH تعادل 4.71. بينما أعلى تركيز مسجل في المملكة المتحدة هو 103 mg GAE / gm of dry tea . وأظهرت النتائج أن أوطأ تركيز هو لشاي جوهرة الربيع 3164 ملغم/لتر أو 63.3 mg GAE / gm of dry tea وحامضية pH تعادل 4.51. بينما أوطأ تركيز مسجل في المملكة المتحدة هو 80.5 mg GAE / gm of dry tea ، وفحصت محاليل نماذج الشاي بجهاز الأمتصاص الذريAAS للتقصي عن أحتوائها على الحديد وبطريقة منحني التدريج القياسي وظهر أن بعض النماذج تحتوي على مقادير ضئيلة من الحديد تتراوح بين 0.1 لغاية 2.8 ملغم/لتر، والبعض الآخر من نماذج الشاي تحتوي على مقادير غير متحسس بها.

ABSTRACT

This research is dealing with seven sample of black tea that were respectively as follows: Ahmad Tea-London, Al-Otuor Tea-Ceylon, Mahmood Tea-Ceylon, Apple Tea-Srilanka, Alwazah Tea-Ceylon, Jawhart Alrabea-India, and unpacked mixed Local - Tea. Samples were extracted by distilled deionized water and by using standard calibration curve of gallic acid as a reference material in determination of phenols in tea solutions so the concentrations of phenols were determined and by using UV-Visible spectrophotometer working at 280 nm. Results have shown that the higher concentration of phenols was recorded for Alwazah Tea 3758 mg/L in other word equal to 75.2 mg GAE /gm of dry tea and at pH equal to 4.71.

While a higher concentration of phenols was recorded for black tea in United Kingdom at 2002 equal to 103 mg GAE /gm of dry tea. The results have also shown that the Lowest concentration of phenols was recorded for Jawhart Alrabea Tea 3164 mg/L in other word equal to 63.3 mg GAE /gm of dry tea and at pH equal to 4.51. While a lowest concentration of phenols was recorded for black tea in United Kingdom equal to 80.5 mg GAE /gm of dry tea. Samples were also tested for metal (Fe) content using atomic absorption spectrophotometer depending on standard calibration curve, results have shown that samples which have been subjected to analysis few concentrations of iron were existed in some of the samples and the range was from 0.1 mg/L to 2.8 mg/L, while the other samples the concentrations were not detected.

المقدمة :

إن موطن الشاي الأصلي في الهند والصين [1 - 6] وينتج الشاي على أنواع [7 - 8] الصيني والأخضر والأسود وتتواجد المركبات الفينولية في الشاي [9 - 12] وثبت أن لها وقع تأثير حسن على الصحة البشرية وبالتحديد الأينولات العطرية التي تدعى الكاتجينز catechins التي تعطي الصفات الجيدة للشاي [13 - 15] . وثبت أن كل أنواع الشاي هي غنية بمركبات متعدد الفينولات وبالتحديد القابلة للذوبان في المحاليل المائية، وتسمياتها العلمية مع مختصرها كالآتي [1 ، 16 - 17] :

1- α-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). 2- α-epigallocatechin (EGC).

3- α-epicatechin-3-gallate (ECG). 4- α-epicatechin (EC).

5- α-gallocatechin (GC). 6- β-catechin (C).

تؤلف هذه المكونات نسبة مئوية وزنية تتراوح من 30 % إلى 40 % من المواد الصلبة في الشاي الأخضر [18]، بينما تشكل نسبة الكافائيين فيه من 3 % إلى 6 %. هذه النسب تتأثر بظروف زراعته وبالعمليات الثانوية في أعداد المنتوج. إن الشاي الأسود

ينتج من الأوراق الطرية الخضراء بواسطة عملية أنزيمية فيها يتم تحويلها إلى اللون البني المائل إلى اللون الأسود وهذه العملية تنجز بواسطة أكسدة كيميائية لمتعدد الفينول وبالتحديد تأكسد الفلافينولات flavanols والفلافينول الكاليت flavanol gallate وتأكسد مركبات أخرى. ينتج عن التحولات هذه مدى من الصبغات اللونية الفريدة في الشاي والتي تشمل البني والأحمر البرتقالي [19]، وتعد thearubings من متعدد الفينولات الرئيسية في أوراق الشاي الأسود وشرابه حيث تمت تقدير هذه المكونات وظهر أن نسبتها تتراوح بين 3 % إلى 6 % [1].

بينما تساهم مركبات الثيافلافينز theaflavins في طعم الشاي الأسود وصفاء لونه وتتراوح نسبتها الوزنية في مستخلصه من 2 % إلى 6 %، وتتألف معظم مركبات الثيافلافينز theaflavins من مكونات theaflavin-3-digallate و-theaflavin-30 gallate و theaflavin-3. يحتوي الشاي الأسود على نسبة كبيرة من معقد الكاتجينز(catechins) مثل epigallocatechin gallate والفينولات الأخرى مثل ثيافلافينز theaflavins والروبينز rubins المتولدة من عمليات الأكسدة المستخدمة في إنتاج الشاي(20). وثبت وجود نسبة وزنية تقدر 10% من الوزن الجاف للشاي الصيني نوع yerba mate من الثيافلافينز theaflavins والمركبات الفينولية [21]. تنسب بصورة عامة الصفات الفعالة لمقاومة الأكسدة في الشاي إلى إحتواءه على مكونات الفلافينويد flavanoid مثل الثيافلافينز theaflavins و البيزفلافينولات bisflavanols و حامض الثيافلافيك theaflavic [22]. يمتص الجهاز الهضمي للإنسان مباشرة متعدد الفينولات المقاوم للأكسدة حيث يظهور متعدد الفينولات في بلازما الدم بعد تناول الشأي [23 - 26]. وظهر أن تناول 5 أكواب من الشاي كل 2 ساعة هي كافية لرفع كاجين catechin البلازما 12 مرة [1،26].

إن نبتة الشاي تمتص العناصر المعدنية من التربة والتي تتجمع في الأوراق أثناء فترة حياة نبتة الشاي [27 - 28]، في الماضي كان الأعتماد الرئيس بتنمية النبات على التربة الطبيعية لكن في الوقت الحاضر تستعمل الأسمدة بشكل كبير لزيادة الإنتاج وأصبح معلوماً أن تواجد العناصر في الشاي يعتمد على التربة [29]. بالرغم من تنوع الشاي ركزت الدراسات [30] على تراكيز العناصر في الشاي الأسود كما وأهتمت البعض [4 - 5] منها على الأختلافات الفصلية على تراكيز العناصر في نبتة الشاي.

يهدف بحثنا إلى تقريب صورة مهمة لمكونات الشاي الكيميائية والحساب الطيفي لتركيز الفينولات الكلية في نماذج مختلفة من الشاي بأستخدام منحني المعايرة القياسي لحامض الكاليك كمادة مرجعية في حساب الفينولات في محاليل الشاي، كما يهدف البحث إلى حساب تركيز الحديد في الشاي.

والجدول 1 الآتي يوضح صفات المنتجات التجارية للشاي الأسود التي أخضعت للفحوصات في هذا البحث وهذا الجدول يشمل أسم الشركة والمنشأ والوزن كما هو مطبوع على غلاف العينة.

جدول 1 العينات من منتجات الشاي الأسود.

رقم العينة	1	2	3	4	5	6	7
العلامة التجارية	جوهرة الربيع	العطور	محمود	أحمد	الوزة	التفاحة	شاي أسود فل
المنشأ	الهند	سيلان	سيلان	لندن	سيلان	سريلانكا	بغداد
التوزيع	الشركة العامة للأسواق المركزية	عبد الكريم علوان	مجموعة شركات ألتونكايا - دبي	لندن	شركة جيمس فينلي	شركة البراري/دبي شركة بركات المختار/العراق	السوق المحلية
الوزن	1000 غم	225 غم	200 غم	225 غم	225 غم	225 غم	-
الإنتاج	2008	2010	2010	2010	2010	2010	-
الانتهاء	2011	2013	2013	2013	2013	2013	-

الجزء العملي

الأجهزة المستعملة:

أستعمل جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV-Visible موديل UV-1100 ChromTech Med&Lab الأمريكي لقياس الأمتصاص للأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 280 نانومتر، وأستعمل جهاز حساب الحامضية نوع pH-meter Microprocessor موديل Hanna pH 211 الأمريكي، وأستعمل جهاز حديث لطيف الأمتصاص الذري AAS موديل AA-7000 من شركة شيمازو اليابانية عند ظروف تحليل مثلى لتحليل عنصر الحديد في المحاليل المائية وبأستعمال شعلة الأستيلين - هواء عند الطول الموجي 248.3 نانومتر مع مصباح الأشعة الخاص بالجهاز موديل BGC-D2 أيضاً وظروف مثلى لمنظومة الغازات.

المواد المستعملة:

أستعمل الماء المقطر اللآيوني في تحضير محلول الشاي وفي تحضير المحاليل القياسية الثانوية لحامض الكاليك gallic الذي يمتـلك وزن جزيئي 170.12 وتسميته 3,4,5-trihydroxybenzoic acid وصيغتـه الجزيئية $C_7H_6O_5$ أستخدم حامض الكاليـك في هذا البحث بنقاوة عاليـة من شـركة سيكما .Sigma Chemical Co ومحلول حامض الكاليـك المائي يبقى فعالاً [2،3،4،31،33] فترة خمسة أيام بدرجة حرارة الغرفة .

طريقة العمل:

حساب الفينولات الكلية في محلول الشاي بوساطة التحليل الطيفي:

كل المركبات الفينولية تمتص الأشعة الفوق بنفسجية UV وجميعها تظهر أمتصاص أعظم عند الطول الموجي 280 nm نانومتر [31]، لذلك تستخدم هذه الصفة لحساب الفينولات الكليـة بواسطة تقنية التحليل الطيفي [2،3،32،33]. لكن كل صنف class من المركبات الفينوليــة له معامل أمتصاص مولاري molar absorptivity coefficient ε مختلف لذلك تم أعتماد حامض الكاليـك gallic كمحلول قيـاسي ومرجع لحساب الفينولات الكلية في محلول الشاي[2،3،4].

تحضير النموذج:

أخذ وزن من ورق الشاي الجاف قدره 5 غم وأضيف إليه 250 مل من الماء المقطر اللآيوني ثم تركت العينة تغلي لمدة ثلاثة دقائق وترك محلولها ليركد ويبرد، في هذه المرحلة فحص كل نموذج من محلول الشاي بجهاز حساب الحامضية لقياس الأس الهيدروجيني pH فيه والجدول 2 التالي يوضح بيانات نتائج الفحص. يتم تخفيف محاليل الشاي ثم تفحص كل عينة بجهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية بعد التخلص من المواد العالقة فيها بإستعمال جهاز الطرد المركزي.

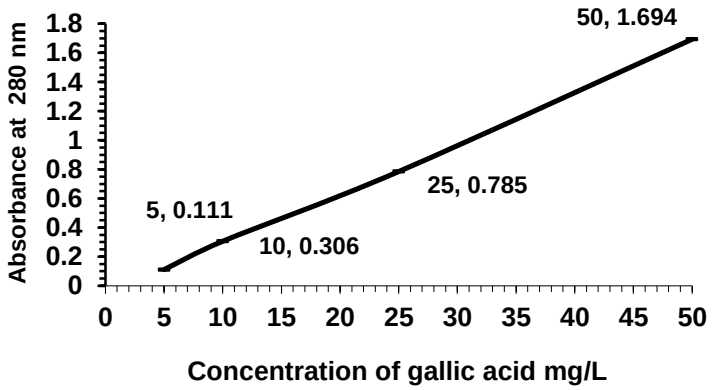
تحضير المحلول القياسي:

أخذ وزن 0.5 غم من حامض الكاليك gallic وأذيب في 10 مل من الكحول الأثيلي وخفف بالماء المقطر اللآيوني في قنينة حجمية سعة 100 مل وأكمل إلى العلامة لأجل الحصول على تركيز 5000 ملغم/لتر. ثم من هذا المحلول القياسي الأولي أخذت حجوماً بالماصة 1 مل و 2 مل و 5 مل و 10 مل على التوالي ووضعت كل منها في قنينة حجمية سعة كل منها 1000 مل وأكمل الحجم بالماء المقطر اللآيوني إلى العلامة لأجل الحصول عل محاليل ذات تركيز قياسية ثانوية من حامض الكاليك وعلى التوالي: 5 ملغم/لتر و 10 ملغم/لتر و 25 ملغم/لتر و 50 ملغم/لتر.

تم تحضير محاليل قياسية ثانوية للحديد Fe بتركيز2 و 4 و 6 و 8 ملغم/لتر من محلول مائي قياسي مرجع تركيزه 1000 ملغم/لتر من شركة MERCK - HC818177 Germany لجهاز الأمتصاص الذري AAS .

أعداد منحني المعايرة القياسي:

تم أعداد منحني المعايرة القياسي من خلال تحضير محاليل قياسية ثانوية لحامض الكاليك بتراكيز من 5 ملغم/لتر إلى 50 ملغم/لتر وبعد قراءة الأمتصاص لها عند الطول الموجي (λ_{max}) 280 نانومتر مقابل الماء المقطر اللآيوني في خلية cuvette المرجع كبلانك لجهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV-Visible ورسمت قيم الأمتصاص Abs مقابل التراكيز القياسية لحامض الكاليك، والشكل 1 التالي يوضح منحني المعايرة القياسي لمحاليل حامض الكاليك بوحدة ملغم/لتر مقابل الأمتصاص عند الطول الموجي 280 نانومتر ومثلت خطاً مستقيماً .



شكل 1 منحني المعايرة القياسي للأمتصاص عند الطول الموجي 280 نانومتر مقابل تركيز حامض الكاليك بوحدة ملغم/لتر .

حساب التراكيز:

أستخدمت طريقة النقاط المتعددة القياسية التي تتضمن رسم منحني المعايرة القياسي للأمتصاص Abs ضد تركيز حامض الكاليك شكل 1. وبما أن وزن كل نموذج من ورق الشاي الجاف قدره 5 غم تم وضعه في 250 مل من الماء المقطر اللآيوني خففت جميعها 200 مرة وذلك بوضع 0.5 مل من محلول الشاي المصفى في قنينة حجمية سعة 100 مل وتكملة الحجم إلى العلامة لغرض يبقى الأمتصاص Abs مطاوعاً لقانون لقانون بير - لامبرت. فأشتقت معادلة الخطية المستقيمة والتقاطع لمنحني المعايرة القياسي ببرنامج أحصائي متقدم Graphing Advantage Plus - Curve Fitting كما في المعادلة الآتية:

$$Y = 0.0349\ X\ -\ 6.18\times10^{-2} \qquad R^2 = 0.9992$$

حيث أن Y تمثل قراءة الأمتصاص Abs وأن X تمثل التركيز بوحدة ملغم/لتر، وعند التعويض في معادلة منحني المعايرة للأمتصاص مقابل التركيز تم أستخراج قيم التراكيز النهائية في محاليل نماذج الشاي المخففة، وأجري التحليل الأحصائي أيضاً ببرنامج SPSS إلى بيانات منحني المعايرة القياسي بأستخدام T-test والجدول 2 يبين فروقات فاصل الثقة 95 % وقيمة الأنحسار والمعنى Sig. and correlation إلى بيانات للأمتصاص مقابل التركيز .

النتائج والمناقشة:

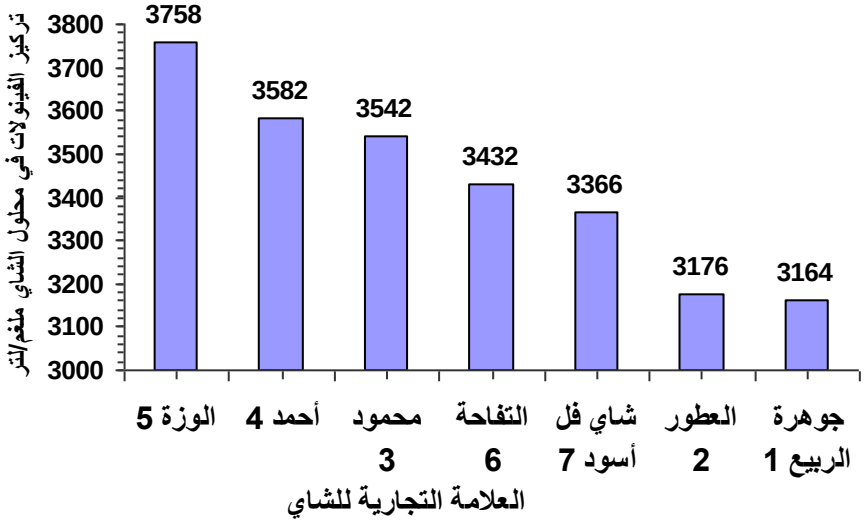
أصبح حامض الكاليك مقبولاً لحساب الفينولات الكلية في محلول الشاي كمركب فينولي قياسي من بين العديد منها لأسباب عديدة مثل رخص ثمن الصيغة النقية منه وهو مستقراً في الحالة الصلبة، بالرغم من أن الوحدات التي تقاس بها الفينولات الكلية هي متعددة مثل: ملغم/لتر [33] وملغم مكافيء حامض كاليك لكل غم ورق الشاي الجاف mg GAE/g of dry tea [2] والنسبة المئوية لحامض الكاليك GAE% وعدد الغرامات المكافئة لحامض الكاليك لكل 100 غم [3]. إلا أننا في بحثنا أخرجنا نتائج قياس التركيز بوحدتي قياس، الأولى مألوفة: عدد الملغرامات لكل لتر محلول [33]، ووحدة القياس الثانية: عدد الملغرامات المكافئة لحامض الكاليك لكل غرام من ورق الشاي الجاف والتي يعبر عنها أختصاراً ملغم/غم من ورق الشاي الجاف mg GAE/g of dry tea [2]. والجدول 3 و4 والشكل 2 التالية توضح التراكيز ملغم/لتر النهائية للفينولات وهي بالتسلسل 3758 ملغم/لتر لنموذج الوزة وظهر أقلها تركيزاً هو نموذج جوهرة الربيع 3164 ملغم/لتر، مع حامضية محاليل الشاي قبل تصفيتها بواسطة جهاز الطرد المركزي وتخفيفها.

جدول 2 يبين الفحص الأحصائي T-test نوع النماذج المقترنة إلى الأمتصاص Abs مقابل التركيز .Conc في بيانات منحني المعايرة لحامض الكاليك.

	Paired Sample Statistics					
		Mean	N	Std Deviation	Std Error Mean	
1	Y-Abs	0.724	4	0.70595	0.35298	
2	X-Conc.	22.5	4	20.20795	10.10363	
	Paired Sample Correlations					
			N	Correlation	Sig	
1	Y-Abs& X-Conc		4	1.000	0.000	
	Paired Sample Test					
		Paired Differences				
		Mean	Std Deviation	Std Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference	
1	Y-Abs& X-Conc				Lower	Upper
		-21.776	19.5079	9.75079	-52.807	9.255
		t	df	Sig. (2-tailed)		
1	Y-Abs& X-Conc	-2.233	3	0.112		

جدول 3 التركيز ملغم/لتر النهائي للفينولات الكلية في محلول الشاي مع بيانات منحني المعايرة لحامض الكاليك.

رقم العينة	العلامة التجارية لنموذج الشاي	الأمتصاص Abs عند الطول الموجي 280 نانومتر لمحلول الشاي بعد تخفيفه 200 مرة	pH محلول الشاي	التركيز ملغم/لتر المستخرج للفينولات في محلول عينات الشاي	التركيز ملغم/لتر النهائي للفينولات في محلول الشاي بعد الضرب بعامل التخفيف 200
			تركيز حامض الكاليك	5 ملغم/لتر	10 ملغم/لتر	25 ملغم/ لتر	50 ملغم/لتر
			الأمتصاص	0.111	0.306	0.785	1.694
1	جوهرة الربيع	0.484	4.51	15.82	3164
2	العطور	0.486	4.53	15.88	3176
3	محمود	0.542	4.64	17.71	3542
4	أحمد	0.548	4.60	17.91	3582
5	الوزة	0.575	4.71	18.79	3758
6	التفاحة	0.525	4.65	17.16	3432
7	شاي أسود فل	0.515	4.55	16.83	3366



شكل 2 التراكيز ملغم/لتر النهائية للفينولات وهي بالتسلسل 3758 ملغم/لتر لنموذج الوزة ويظهر نموذج جوهرة الربيع أقلها تركيزاً 3164 ملغم/لتر.

وبما أن وزن نموذج ورق الشاي الجاف 5 غم تم أذابته في 250 مل فإن عامل التحويل لمحلول الشاي إلى ورق الشاي الجاف يساوي 20 وبعد ضرب عامل التحويل في تراكيز الفينولات الكلية لمحلول الشاي المستخرجة بدلالة منحني المعايرة لحامض الكاليك شكل 1 وجدول 3 وتعديل وحداتها من ملغم/لتر إلى ملغم/غم. فيمكن أن نحصل على البيانات الموضحة في الجدول 4 التالي.

جدول 4 تراكيز الفينولات النهائية بوحدة الملغرام المكافيء لحامض الكاليك لكل غرام من ورق الشاي الجاف.

رقم العينة	العلامة التجاري لنموذج الشاي	التركيز النهائي للفينولات ملغم/لتر mg/L	التركيز النهائي للفينولات mg GAE / gm of dry tea	pH محلول الشاي
5	الوزة	3758	75.2	4.71
4	أحمد	3582	71.6	4.60
3	محمود	3542	70.8	4.64
6	التفاحة	3432	68.6	4.65
7	شاي فل أسود	3366	67.3	4.55
2	العطور	3176	63.5	4.53
1	جوهرة الربيع	3164	63.3	4.51

إن أعلى تركيز للفينولات الكلية في الشاي الأسود بوحدة mg GAE/gm of dry tea مسجل في المملكة المتحدة بأستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل الأداء العالي [2] هو 103، وأن أوطأ تركيز لها بوحدة mg GAE/gm of dry tea مسجل في المملكة المتحدة أيضاً [2] هو 80.5 . الجدول 4 يبين أعلى تركيز للفينولات الكلية في الشاي هو لمنتوج شاي الوزة ويساوي 75.2 mg GAE / gm of dry tea الذي حامضيته pH تعادل 4.71. وأوطأ تركيز للفينولات الكلية في الشاي هو لمنتوج شاي جوهرة الربيع ويساوي 63.3 mg GAE / gm of dry tea الذي حامضيته pH تعادل 4.51.

تم أعداد منحني المعايرة القياسي للحديد شكل 3 من خلال تحضير محاليل قياسية ثانوية بتراكيز من 2.0 ملغم/لتر إلى 8.0 ملغم/لتر وبعد قراءة الأمتصاص مقابل التركيز محسوباً بحاسبة جهاز الأمتصاص الذري AAS موديل AA-7000 وحسب الجدول 5 الآتي :

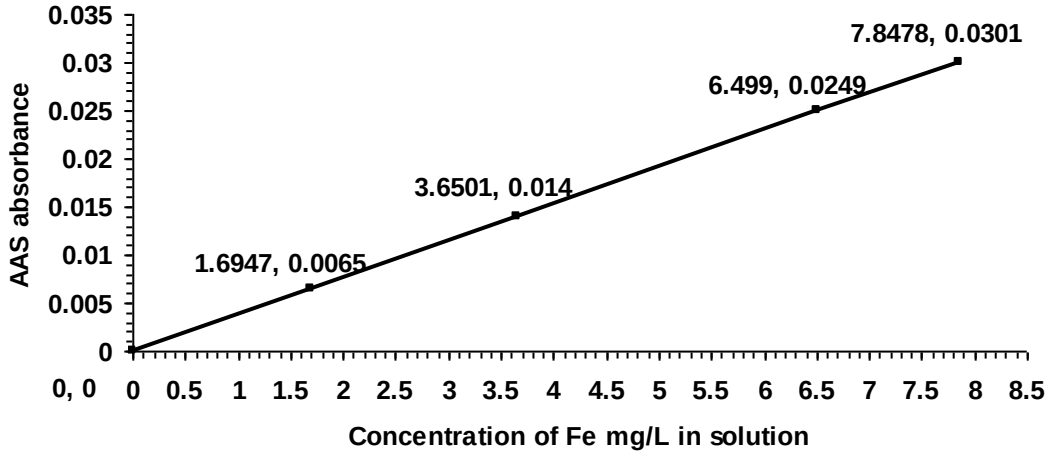
جدول 5 يبين بيانات التركيز الفعلي للحديد المقاس بجهاز الأمتصاص الذري AAS مقابل الأمتصاص Abs .

الأمتصاص Abs	0.0	0.0065	0.0140	0.0249	0.0301
التركيز الفعلي Conc. ملغم/لتر	0.0	1.6947	3.6501	6.4990	7.8478

وبعد رسم بيانات جدول 5 أعطى منحني معايرة قياسي شكل 3 وتم أشتقاق معادلة الخط المستقيم لها ببرنامج الأحصائي المتقدم Graphing Advantage Plus - Curve Fitting كما في المعادلة الآتية:

$$\mathbf{Y(Abs) = 3.83\times10^{-3}\ X\,(Conc.) + 1.047\times10^{-6} \qquad R^2 = 1.0}$$

حيث أن Y تمثل قراءة الأمتصاص Abs بجهاز AAS وأن X تمثل قراءة التركيز الفعلي ملغم/لتر بجهاز AAS



شكل 3 منحني المعيرة القياسي لتركيز Fe بوحدة ملغم/لتر في المحلول المائي مقابل الأمتصاص بجهاز الأمتصاص الذري AAS .

فحصت نماذج الشاي الأسود المرقمة 1 لغاية 7 للتقصي عن تراكيز العناصر [5،4] (الحديد Fe) فيها بأستخدم جهاز الأمتصاص الذري AAS .
ظهر أن النماذج تحتوي على مقادير ضئيلة من الحديد تتراوح بين 0.1 لغاية 2.8 ملغم/لتر، والبعض من النماذج تحتوي على مقادير غير متحسس بها، ويوضح الجدول رقم 5 التالي تراكيز الحديد في محاليل نماذج الشاي بدون تخفيف والمحضرة وفق الطريقة الموضحة بفقرة تحضير النموذج.

جدول 5 تراكيز الحديد في محاليل نماذج الشاي بدون تخفيف مقاسة بجهاز الأمتصاص الذري AAS.

رقم العينة	العلامة التجاري لنموذج الشاي	الأمتصاص Abs	التركيز النهائي للحديد Fe ملغم/لتر	pH محلول الشاي
5	الوزة	0.0000	0.0000	4.71
4	أحمد	0.0000	0.0000	4.60
3	محمود	0.0004	0.1043	4.64
6	التفاحة	0.0034	0.8865	4.65
7	شاي فل أسود	0.0108	2.8158	4.55
2	العطور	0.0024	0.6257	4.53
1	جوهرة الربيع	0.0000	0.000	4.51

REFERENCES

1-Sharma VK, Bhattacharya A, Kumar A, and Sharma H.K. "Review Article Health Benefits of Tea Consumption" *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* (2007) 6(3):785-792 .

2-Khokhar S and Magnusdottir SGM "Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly in the United Kingdom" *J. Agric. Food Chem*. (2002)50:565-570 .

3-Anesini C, Graciela E., Rosana F. "Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Commercially Available Tea (Camellia Sinensis) in Argentina" *J. Agric. Food Chem*. (2008) 56:9225-9229.

4-Yasar E., Seai E., Memnune S., Zeynep E., Ayhan H.and Metin T. "Seasonal Variation of Total Phenolic, Antioxidant Activity and Minerals in Fresh Tea Shoots(Camellia Sinensis Var Sinensis)" *Pak.J.Pharm. Sci.* (2010) 23(1): 69-74.

5-Fernandez P.L, Pablos F., Martin M.J. and Gonzalez A.G. "Multi-element Analysis of Tea Beverages by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry" *Food Chemistry* (2002) 56: 483-489.

6-Mendlilcioglu K.. FDA "Tea Growth Techniques" Ege University Agricultural Faculty (2000) No. p43.

7-Kuroda Y, and Hara Y. "Antimutagenic and Anticarcinogenic Activity of Tea Polyphenols" Mutat. Res. (1999) 436:69-97.

8-Langley-Evans SC. "Antioxidant Potential of Green and Black Tea Determined Using Ferric Reducing Power Assay (FRAP)" *Int. J. Food Sci. Nutr.*, (2002) 51: 181-188.

9-Riemersma R.A, Rice-Evans C.A., Tyrrell R.M., Clifford M.N. and Lean M.E. "Tea Flavonoids and Cardiovascular Health" *Q. J. Med.* (2001) 94: 277-282.

10-Mukhtar H. and Ahmad N. "Tea Polyphenols Prevention of Cancer and Optimizing Health" *Am. J. Clin. Nutr.* (2000) 71: 1698S-1704S.

11-Balentine D.A , Wiseman S.A and Bouwens L.C.M. " The Chemistry of Tea Flavonoids" *Crit. Rev. Food Sci. Nutr* (1997) 37: 693-704.

12-Lakenbrink C., Lapczynski S., Maiwald B. and Engelhardt U.H. " Flavonoids and other Polyphenols in Consumer Brews of Tea and other Caffeinated Beverages", *J. Agric Food Chem.* (2000) 48: 2848-2852.

13-Vinson J.A., Dabbagh Y.A., Serry M.M. and Jang J. "Plant Flavonoids Especially Tea Flavonols, are Powerful Antioxidants Using an In Vitro Oxidation Model for heart disease" *J. Agric. Food Chem.* (1995) 43: 2800-2802.

14-Vinson J.A., Jang J., Yang J., Dabbagh Y., Liang X., Serry M. and Proch J. Cai S. "Vitamins and Especially Flavonoids in common beverages are Powerful In Vitro antioxidants which Enrich Low Density Lipoproteins and Increase their Oxidative Resistance after ex vivo Spiking in Human Plasma" *J. Agric. Food Chem.* (1999) 47: 2502-2504.

15-Rice-Evans C.A., Miller M.N. and Pganga G. "Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids" *Free Radic. Biol. Med.* (1996) 20: 933-956.

16-Willson K.C., and Clifford M.N. "Tea Cultivation To Consumption" London: Chapman & Hall (1992).

17-Bors W., Heller W., Michel C. and Stettmaier K. "Flavonoids and Polyphenols: Chemistry and Biology in Cadenas E, Des, PL (eds.)" *Handbook of Antioxidants New York:Marcel Dekker Inc.* (1996) 409-466.

18-Chng S., Liao Y.J., Yang G.Y. and Lu G. "Inhibition of Lung Tumorigenesis by Tea" *Exp. Lung Res.* (2005) 31: 135-144.

19-Harbow M.E. and Balentine D.E. "Tea Chemistry" *CRC Crit. Rev. Plant Sci*. (1997) 16: 415-480.

20-Van het Hof K.H.,de Boer H.S., Wiseman S.A., Lien N., Westrate J.A. and Tijburg L.B. "Consumption of Green or Black Tea Does Not Increase Resistance of Low Density Lipoproteinto Oxidation in Humans" *Am. J. Clin. Nutr.* (1997) 66:1125-1132.

21-Dall Orto V.C., Vago G.M., Carball R.R. and Rezzano I.N. "Comparison of Tyrosinase

Biosensor and Colorimetric Method for Polyphenol Analysis in Different Kinds of Teas" *Analyt. Lett.* (2005) 38: 19-33.

22-Rice-Evans C. "Implications of Mechanisms of Action of Tea Polyphenols as Antioxidants In Vitro for Chemoprevention in Humans" *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* (1999) 220: 262-265.

23-Van Acker SABE, Van Den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., Griffoen D.H., Van Bennekom W.P., Van Der Vijgh W.J.F. and Bast A. "Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids" *Free Rad. Biol. Med.* (1996) 20: 331-342.

24-Weisburger JH "Tea and Health: The Underlying Mechanisms" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1999) 220: 203-209.

25-Van het Hof K.H., Wiseman S.A., Yang C.S. and Tijburg L.B.M. "Plasma and Lipoprotein Levels of Tea Catechins following Repeated Tea Consumption" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1999) 220: 213-219.

26-Langley-Evans SC "Consumption of Black Tea Elicits an Increase in Plasma Antioxidant Potential in Human" *Int. J. Food Sci. Nut.* (2000) 51: 309-315.

27-Pennington JAT "Aluminum Content of Foods and Diets" *Food. Addit. Contam.* (1987) 5: 161-232.

28-Ruan JY and Wong MH "Accumulation of Fluoride and Aluminum Related to Different Varieties of Tea Plant" *Environ. Geochem. Health.* (2001) 23: 53-63.

29-Jackson ML and Huang PM "Aluminum of Acid Soils in the Food Chain and Senility" *Sci. Total Environ* (1983) 28: 269-276.

30-Mitsue FH, Celso S.Q., Cinthia P.M.T. and Jaime A.C "Fluoride and Aluminum in Teas and Tea-Based Beverages" *Rev.Saude Publica* (2004) 38(1):100-105.

31-Sinkard K and Singleton VL "Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods" *AJEV*(1977) 28:49-55.

32-Cizkova H, Voldrich M., Mlejnecka J. and Kvasnicka F. "Authenticity Evaluation of Tea-Based Products" *Czech J. Food Sci*. (2008) 26(4): 259-267.

33-Andrew L and Waterhouse "Determination of Total Phenols" *Current Protocols in Food Analytical Chemistry,* John Wiley & Sons, Inc. Supplement 6: Polyphenolics (2002) 11.1.1- 11.1.8 .