

Gıda Flavonoidlerinin Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi İle Analizi

Arş.Gör.Mustafa ÇAM Prof.Dr.Yaşar HIŞIL
Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir
e-mail: mcam@erciyes.edu.tr hisil@food.ege.edu.tr

ÖZET

Polifenolik bileşiklerden flavonoidler bitkilerde en çok ve en yaygın şekilde bulunan bileşiklerdir. Şu ana kadar 5000 den fazla flavonoid bileşiği tanımlanmıştır ve bunlar genelde 6 kimyasal grup olarak sınıflanmıştır (antosiyanidinler, flavanonlar, flavonlar, flavonoller, flavanoller, izoflavonlar). Bitkilerin yaprak, tohum, kabuk ve çiçeklerinde ve genellikle glikozitleri şeklinde bulunurlar. Tıbbi açıdan pek çok öneme sahip bitkide flavonoidlerin aktif bileşenler olduğu düşünülmektedir. Besinsel fonksiyonları olmamasına rağmen diyetteki flavonoidlerin sağlık üzerine olumlu etkileri sebebiyle dikkat çekmektedirler. İnsan vücudunu serbest radikallere karşı koruyarak antioksidan aktivite gösterirler. Kromatografik yöntemler arasında yüksek basınç sıvı kromatografisi flavonoidlerin analizinde en sık kullanılan yöntemdir. Flavonoid analizlerinde bir, iki ya da üç alt sınıfın bir arada analizinin yapıldığı pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmada flavonoidlerin yüksek basınç sıvı kromatografisi ile analizinde kullanılan yöntemler ve örnek hazırlama işlemleri özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Flavonoidler, HPLC, fenolik bileşikler

ANALYSIS OF FOOD FLAVONOIDS BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

Flavonoids are the most common and widely distributed group of polyphenolic compounds. Over 5000 different flavonoids have been described in literature and they are generally classified into 6 chemical groups (anthocyanidins, flavanones, flavones, flavonols, flavanols isoflavones). Flavonoids are found in seeds, fruits, leaves and flowers of plants, especially in the form of glycosides. Although flavonoids are non-nutritive agents, the health effects of flavonoids in human diet have attracted much attention. They show powerful antioxidant activity which can protect the human body from free radicals. Among the chromatographic methods, high pressure liquid chromatography is the most widely used method for the analysis of flavonoids. Many systems have been developed for the analysis of flavonoids together one, two, or three subclasses. The methods that have been developed to analysis of flavonoids by high pressure liquid chromatography and sample preparation procedures are summarized in this review.

Keywords: Flavonoids, HPLC, phenolic compounds

Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler bitkilerde bulunan en geniş ve en yaygın gruplardan biridir. Bitkilerde ikincil metabolizma ürünleri olarak ortaya çıkarlar ve

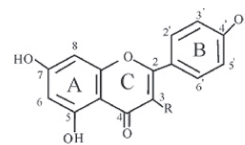
genellikle glikozitleri şeklinde bulunurlar. 8000 den fazla türü bulunan fenolik bileşiklerin ortak özelliği en az bir hidroksil grubu içermeleridir [1]. Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları gibi birçok açıdan önem taşırlar [2].

Fenolik bileşikler aşağıdaki gibi sınıflamak mümkündür; Basit fenoller, benzokinonlar, fenolik asitler, asetofenonlar, fenilasetik asitler, hidroksisinnamik asitler, fenilpropenler, kumarinler, izokumarinler, kromonlar, naftokinonlar ksantonlar, stilbenler, antrakininler, lignanlar, neolignanlar ligninler, flavonoidler [3].

Flavonoidler

Flavonoidler bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan bir grup bileşiklerdir. Kimyasal olarak 2 adet benzen halkası ile bir üçlü karbon köprüsü içerirler. C₆-C₃-C₆ difenilpropan yapısındadırlar. Flavonoidlerin temel yapısı şekil 1 de verilmiştir. Fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü oksijenle halka oluşturmaktadır. Değişik flavonoidler arasındaki farklar; bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyinden kaynaklanmaktadır [2]. Şu ana kadar 5000 den fazla flavonoid bileşiği tanımlanmıştır. Flavonoidleri yapılarına bağlı olarak 6 grupta toplamak mümkündür. Bu gruplar; Antosiyanidinler, flavanonlar, flavonlar, flavonoller, flavanoller, izoflavonlar dır. Bu 6 sınıfın hepsinde bir C Halkası bulunur. C halkasının bağ yapısına ve bu halkaya bağlanan bileşiklere göre gruplandırılırlar. Difenilpropan yapısında aromatik yapıda bir A halkası, oksijen içeren heterosiklik bir C halkası ve bu C halkasına C-C bağıyla bağlı aromatik bir B halkası bulunmaktadır [4].

Şekil 1. Flavonoidlerin temel yapısı



Gıda kaynakları

Flavonoidler meyve, sebze, çay, kakao ve şarap gibi bitkisel orijinli içeceklerde yaygın bulunur. Flavonoller grubundan kuersetin gıdalarda en sık bulunan bileşiktir. Kemferol, kuersetin, apigenin ve luteolin de yaygın bulunan flavonoidlerdir. Soğan ve çay flavonlar ve flavonoller için ana kaynaktır. Çay önemli oranda kuersetin ve kamferol içerirken soğanda en bol bulunan flavonol kuersetin dir [1].

Flavonoidlerin alımı

Gıdalardaki flavonoid miktarı bazı faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bu faktörler; flavonoid formasyonu, bitki genetiği, çevresel şartlar, olgunlaşma derecesi, proses ve depolamadır. Günlük alım miktarları, Hollanda'da 23 mg/gün [5] Amerika Birleşik Devletleri'nde flavonlar ve flavonoller 115 mg/gün, toplam flavonoid alımı 1,1 gr/gün [6], İngiltere' de toplam flavonoid alımı 430 mg/gün [7], Danimarka'da flavonlar, flavonoller ve flavanonlar 28 mg/gün [1] olarak belirlenmiştir.

Absorpsiyon ve biyoyararlılık

Bu konudaki çalışmalar da sınırlı olmakla birlikte kuersetinde belirlenen absorpsiyon oranları; kuersetin aglikonlarında % 24, soğandaki kuersetin glikozitlerinde % 52 olarak belirlenmiştir. Buradan da glikozit kısımlarının absorpsiyonu artırdığı ileri sürülmektedir [8]. Çaydaki kuersetinlerin absorpsiyonu soğandaki kuersetinlerin yarısı kadardır [9]. Flavonoidlerin alındığı gıdaya göre absorpsiyonu değişmektedir. Çay, kırmızı şarap ve soğan karşılaştırıldığında kırmızı şarapta absorplanmadan atılan kuersetin miktarı soğan ve çaydakinden yüksektir [10].

Flavonoidlerin HPLC ile analizi

Flavonoidlerin HPLC ile analizi ilk olarak 1976 yılında Fisher ve Wheaton tarafından yapılmıştır. Sonraki yıllarda analiz işlemi genelde 6 grupta toplanmıştır (Antosiyaninler, kateşinler, flavanonlar, flavonlar, flavonoller, İzoflavonlar). Bazen de iki ya da üç sınıfın analizi beraber yapılmıştır.

Kromatografik koşullar

Kolon: Genelde 100-300 mm uzunluğunda ve 4,6 mm iç çaplı zıt faz kolonlar kullanılmaktadır.

Çözücü: Analizlerde genelde ikili çözücü sistemleri kullanılmaktadır. Çözücü olarak asetik, fosforik, perklorik, sülfürik asit ile asitlendirilmiş su-asit çözeltisi (Çözücü A) ve çözücü A ya göre polaritesi daha düşük olan metanol (CH₃OH), asetonitril (CH₃CN) gibi organik bir çözücü (Çözücü B) kullanılmaktadır. En son yapılan çalışmalara göre her iki çözücüde triflorasetik asit (CF₃COOH) kullanımı ile kateşinlerin analizinde pik kuyruklanmasının önlenildiği ve rezolüsyonun zenginleştiği gözlenmiştir [11].

Akış hızı: Analizler genelde 1-1,5 ml/dak akış hızında gerçekleştirilmektedir.

Süre: Yaklaşık 1 saat

Kolon sıcaklığı: Oda sıcaklığı ve biraz üzerindeki sıcaklıklar.

Enjeksiyon hacmi: 1-100 mikrolitre

Dedeksiyon

Fenoller UV bölgede absorpsiyon yaparlar. Flavonoidler için iki band karakteristiktir. 240-285 nm arası Band II dir. Bu bandın flavonoidlerdeki A halkasından ileri geldiği düşünülmektedir. 300-550 nm arası Band I dir. Bu bandın ise B halkası tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. Flavonoid analizlerinde uv-vis dedektör ve diyot dizinli dedektör (DAD) kullanılmaktadır. Genel olarak antosiyaninler 510, 520 nm de, kateşinler 210, 280 nm de, flavanonlar 280, 290 nm de, flavonlar ve flavonoller 270, 280 nm de, izoflavonlar 260, 280 nm de teşhis edilmektedir [11].

Örnek Hazırlama

Ekstraksiyon işlemi analiz edilen örneğe göre değişiklik göstermektedir. Flavonoidlerle girişim yapan lipitler, karotenoidler ve klorofil gibi bileşenlerin uzaklaştırılması gerekir. Son yıllarda bu amaçla katı faz ekstraksiyon kartuşları (SPE cartridge) sıkça kullanılmaktadır. Bazı örnekler için herhangi bir hazırlama işlemi gerekmez. Katı gıdalarda ise bu işlem genelde ezme, öğütme, homojenize etme, ekstraksiyon ve asitle hidroliz

basamaklarını içerir.

Hidroliz

Asidik, bazik ya da enzimatik yolla yapılabilen hidroliz işlemi flavonoidleri glikozit formundan aglikon formuna çevirmek amacıyla sıklıkla uygulanan bir işlemdir. Özellikle glikozit formda ve açıl glikozit formundaki antosiyanin standartlarını elde etmek zor olduğundan antosiyaninler antosiyanidin formuna dönüştürülür.

$$\text{GLİKOZİT} = \text{AGLİKON} + \text{GLİKON}$$

$$\text{ANTOSİYANİN} = \text{ANTOSİYANİDİN} + \text{ŞEKER}$$

Flavonoid glikozitlerinin hidroliz işlemi ise 1-2 molar konsantrasyonlu mineral asitleri ve metanol-su karışımlarıyla yapılmaktadır [5]. Ancak Merken ve Beecher [11]' e göre bu koşullarda antosiyanidinler ve kateşinlerde kısmi parçalanma görülmektedir. Bunun için analizde teşhis edilecek flavonoid cinsine göre örnek hazırlama prosedürü gerekir. Örnekteki flavonoidlerin glikozit formu analiz edilmek isteniyorsa hidroliz işlemi yapılmaz. Toplam flavonoid içeriği belirlenmek isteniyorsa aglikon formunda analiz yapılır. Flavonoidlere bağlı 80 çeşit şeker ve bu şekerlerin bağlanma durumuna göre sadece kuersetin de 179 çeşit glikozit tespit edilmiştir [4]. Bunların tek tek analizini yapmak zor olduğundan hidroliz işlemi ile toplam aglikon formunda artış sağlanmaktadır.

1. Antosiyanidinler

Doğal olarak genellikle antosiyanin adı verilen glikozit formunda bulunurlar. Meyve ve sebzelerin kırmızıdan mora kadar değişen renkleri bu glikozitlerden kaynaklanmaktadır. Antosiyaninlerin aglikon kısmını oluşturan fenolik bileşiklerin molekülünde OH grubu sayısı arttıkça renkte mavilik, OCH₃ grubu sayısı arttıkça renkte kırmızılık artar [2]. Antosiyanidinler çilek, üzüm ve kirazda bol bulunur. Bazı antosiyanidinlerin, flavanonların, flavonların, flavonollerin, flavonollerin ve izoflavonların formülleri ayrıntılı olarak Çam ve Hışıl [12] tarafından belirtilmiştir. Antosiyanidinlerin HPLC ile analizine ait bazı çalışmalar çizelge 1 de verilmiştir.

2. Flavanonlar

Mono ve diglikozitleri şeklinde özellikle portakal, grefurt, limon ve erik te bol bulunurlar. Naringin ve neohesperidin grefurt sularında bulunan, kalite ve acılık kontrolü için önemli bileşenlerdir.

3. Flavonlar ve flavonoller

Bitkilerde genellikle O-glikozitleri şeklinde bulunurlar. Flavonollerde C₃ halkasında bir OH grubu, flavonlarda ise H bulunur. Kuersetin, kemferol, apigenin, luteolin sebzelerde bol bulunur. Meyvelerde ise kuersetin bol miktarda, mirisetin ve kemferol ise iz miktarda bulunur.

4. Flavonoller (Kateşinler)

Kateşinler siyah çay, yeşil çay, Oolong çayı ve kırmızı şarapta bol bulunur. Yeşil çaydaki kateşin konsantrasyonu siyah çay ve Oolong çayındakinden fazladır. Yeşil çay taze yapraklardan elde edilmektedir. Siyah çayda polifenollerin oksidasyonuyla teafavinler ve tearubiginler oluşmaktadır. Kısmi fermente edilen Oolong çayı ise kateşinlerin pek çoğunu orijinal miktarıyla içerir.

5. İzoflavonlar (İzoflavonoidler)

Fermente soya ürünlerinde aglikonları şeklinde bulunan izoflavonlar gıdalarda genellikle glikozitleri şeklinde bulunur. İzoflavonları yaklaşık 15 tanesi gıdalarda hakimdir. Soya dışındaki diğer baklagillerde izoflavon miktarı düşüktür.

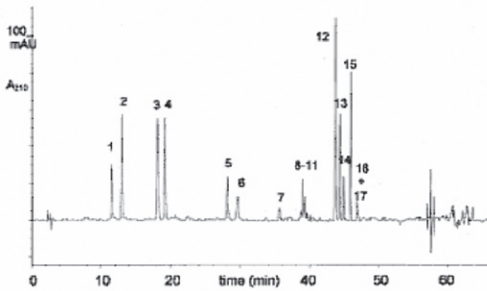
Bitki orijinli gıdalardaki flavonoid içeriğinin bilinmesi; flavonoidlerin bitki fizyolojisi ve insan sağlığı üzerindeki etkilerini anlamaya yarayacaktır. Yapılan çalışmalarda genellikle bir gıdadaki bir veya birkaç flavonoid sınıfı saptanmaya çalışılmıştır. Şu ana kadar flavonoidlerin 5

sınıfını aynı anda analiz edebilecek yalnızca birkaç metod geliştirilmiştir. Buradaki metodlardaki ortak nokta; izoflavonlar hariç diğer 5 sınıfın analiz edilmesidir. (İzoflavonlar yalnızca soya ve baklagillerde bulunmaktadır). Bazı flavonoid sınıflarının HPLC ile analizine ait tipik çalışmalar çizelge 2 de verilmiştir.

Merken and Beecher [11] tarafından yapılan ve çizelge 2 de kromatografik koşulları verilen flavonoid sınıflarının aynı anda analizine ait kromatogram şekil 2 de verilmiştir. Bu çalışmada gıda örneğindeki 5 flavonoid sınıfına ait 17 çeşit flavonoid aynı anda analiz edilmiştir. Diode Array Detector (DAD) kullanımı ile antosiyanidinlerin teşhisi 520 nm dalga boyunda yapılırken, diğer 4 flavonoid sınıfı için 210 nm dalga boyunda teşhis yapılmıştır.

SONUÇ

Flavonoidlerin kansere karşı koruyucu etkilerini araştırmak amacıyla yürütülen çalışmalar çay ve soya dışında çok azdır. Özellikle son üç yılda elde edilen deneysel verilerde flavonoidlerin çeşitli kanser türlerine karşı faydalı olabilecek etkileri tespit edilmiştir. Ancak bu faydalı etkilerin şekli henüz net değildir. Bu etkilerin fizyolojik konsantrasyonlardan mı ortaya çıktığı yoksa flavonoidlerin insanlar için etkili metabolitler mi olduğu açık değildir. Flavonoidlerin kanser türlerine karşı koruyucu etkilerini destekleyen epidemiyolojik deliller sınırlı ve tutarsızdır. Ancak soya tüketimi (özellikle genç yaşta) ile menopoz öncesi göğüs kanseri riski arasında, yeşil çay tüketimi ile mide kanseri, soğan ve elma tüketimi ile akciğer kanseri riski arasında zıt bir ilişki tespit edilmiştir. Diyetle flavonoid miktarının tespiti ve tutarlı diyet önerileri yapabilmek için daha fazla bulguya ihtiyaç vardır. Flavonoid analizlerinde



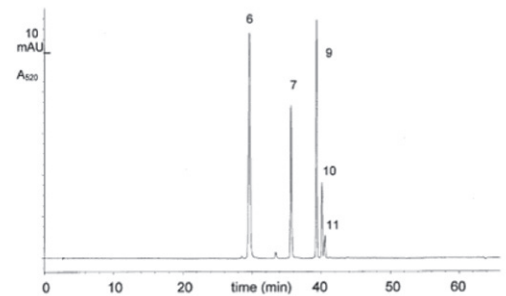
Şekil 2. 5 flavonoid sınıfına ait 17 adet flavonoid standartının kromatogramı. 520 nm'de antosiyanidinler, 210 nm'de 4 flavonoid sınıfı teşhis edilmiştir.

1-) (-)-Epigallokateşin **2-)** (+)-Kateşin **3-)** (-)- Epigallokateşingallat **4-)** (-) Epikateşin **5-)** (-)-Epikateşingallat **6-)** Delfinidin **7-)** Siyanidin **8-)** Mirisetin **9-)** Pelargonidin **10-)** Peonidin **11-)** Malvidin **12-)** Kuersetin **13-)** Luteolin **14-)** Naringenin **15-)** Hesperetin **16-)** Kemferol **17-)** Apigenin

özellikle son 20 yılda HPLC sıkça kullanılmaktadır. Analizlerde bir ya da birkaç flavonoid sınıfı analiz edilebilmektedir. Diyetle alınan flavonoid miktarını belirlemek amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

- [1] Ross J.A and Kasum M.C. 2002 Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. Annu. Rev. Nutr. 22:19-34
- [2] Saldamlı, İ., 1998. Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara
- [3] Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutr Rev, 11:317-333
- [4] Harborne J.B. 1993. The Flavonoids. Advance in Research Science since 1986 London, Chapman&Hall;
- [5] Hertog M.G and Holman PCH. 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of Potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. J. Agric. Food Chem, 40: 1591-1598
- [6] Wiseman S and Nulder T. 2001. Tea Flavonoids: bioavailability in vivo and effects on cell signalling pathways in vitro. Antioxidants Redox Signalling, 3:1009-1021.
- [7] Hollman P.C.H. 1995. Absorption of dietary quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am J. Clin Nutr, 62:1276-1282
- [8] De Vries J.H and Hollman P.C. 1998. Plasma concentrations and urinary excretion of the Antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. Am. J. Clin. Nutr, 68: 60-65
- [9] De Vries J.H and Hollman P.C. 2001. Red wine is a poor source of bioavailable flavonols in Men. J. Nutr, 131: 745-748
- [10] Dalluge J.J and Nelson B.C. 1998. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high performance liquid chromatography J. Chromatography A, 793: 265-274
- [11] Merken H.M and Beecher G.R..2000. Measurement of flavonoids by high performance liquid chromatography. J. of Agr. Food Chem, 48:577-599
- [12] Çam M ve Hışıl Y. 2003. Gıdalardaki flavonoidler ve önemleri. 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, 67-82 s, 2-5 Mayıs 2003, Ankara.
- [13] Bloor S.J and Abrahams S. 2002. The structure of the major anthocyanin in Arabidopsis thaliana. Phytochemistry, 59:343-346
- [14] Dao L.T and Takeoka G.R. 1998. Improved method for the stabilization of anthocyanidins. J. Agric. Food Chem, 46: 3564-3569
- [15] Paganga G, Miller N and Rice-Evans C.A. 1999. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? Free Radical Res, 30: 153-162
- [16] Kawaii S and Tomono Y. 1999. 60 differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from citrus juices. J. Agric. Food Chem, 47:128-135
- [17] Bailey R.G and Nurtsen H.E. 1994. A comparison of the HPLC, mass spectra, and acid degradation of tea flavins from black tea and proanthocyanidin polymers from wine and cider. J. Sci. Food Agric, 64: 231-238
- [18] Justensen U, Knuthsen P and Leth T. 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and Flavanones in fruits, vegetables and beverages by HPLC with photodiode array and mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A, 799:101-110
- [19] Larrauri J.A and Sanches-Moreno C. 1999. Free radical scavenging capacity in the aging of Selected red Spanish wines. J. Agric. Food Chem, 47: 1603-1606



Çizelge1. Antosiyanidinlerin HPLC ile analizi

Gıda	Örnek hazırlama	Sabit faz	Hareketli faz	Referans
Ahududu suyu Böğürflen suyu Şarap	Filtrasyon	Supelcosil LC-1 (250x4,6mm,5µm)	A: 15% CH ₃ COOH B: CH ₃ CN 100%A, 0-5. dak., 0-5%B, 5-15. dak.	[11]
Kırmızı şarap	yok	µBondapak C18 (250x4,6mm, 10µm)	A:CH ₂ O ₂ / H ₂ O (v/v) B: CH ₃ CN 10-15%B, 0-10.dak. 15-20%B, 10-20.dak 20-30%B, 20-38.dak.,	[11]
Fasulye	Ezme, MeOH ile Ekstraksiyon, SPE	ODS / B (250x4,6mm,5µm)	A: 10%CH ₂ O ₂ / H ₂ O B:CH ₂ O ₂ / H ₂ O/ MeOH (10.40:50) 40-80%B, 0-50.dak.,	[14]
Arabidopsis thaliana bitkisi	Homojenize etme MeOH ile ekstr.	Purosphere STAR (55x4mm,3µm)	A: 17,6 % CH ₂ O ₂ B: CH ₃ CN 50% A, 0-15. dak. 100% B, 15-20. dak	[13]

Çizelge 2. Bazı flavonoid sınıflarının HPLC ile analizi

Gıda	Flavonoid	Örnek hazırlama	Sabit faz	Hareketli faz	Referans
Patlıcan elma soğan domates	Antosiyanin kateşinler flavonoller flavonlar flavononlar	Liyofilizasyon, LLE	Nova-Pak C18 (250x4,6mm,4µm)	A:20% MeOH ile %0,1 lik HCl B: CH ₃ CN 5%B 0-10. dak., 5-50%B 10-50. dak. 50-5%B 50-55. dak. 5%B 55-60. dak.	[15]
Narenciye suları	Flavonlar flavonlar flavonoller	SPE	RP-18 (Hewlett- packard) (125x4mm,5µm)	A: 0,01M MeOH B: MeOH 20%B 0-2. dak. 20-100%B 2-55. dak.	[16]
Siyah çay	Kateşinler flavonol glükozitleri	Kaynatma	Hypersil ODS (250x4,6mm,4µm)	A:2%CH ₃ COOH/ H ₂ O B: CH ₃ CN 8-31%B 0-50. Dak.	[17]
Bazı meyve, sebze ve içecekler	Flavononlar flavonlar flavonoller	Liyofilizasyon MeOH/H ₂ O ile ekstraksiyon	RP-C18 (250x4,6mm,4µm)	A:%1 'lik CH ₂ O ₂ ile asitlendirilmiş MeOH/H ₂ O (3: 7) B:MeOH 25-86%B 0-50. dak.	[18]
Kırmızı şarap	Antosiyanin kateşinler flavonoller	Filtrasyon	Hypersil BDS (125x3mm,3µm)	A:CH ₃ COOH ile pH=2,65' e ayarlı H ₂ O B: CH ₃ COOH/CH ₃ CN (20:80) 25-100%B 0-50. dak.	[19]
Maydanoz, yeşil çay	Antosiyanin kateşinler flavonoller flavonlar flavononlar	Liyofilizasyon MeOH/HCl ile hidroliz	Zorbax Eclipse XDB- C18 (250x4,6mm,5µm)	A: H ₂ O , B: MeOH C: CH ₃ CN (Her üç çözücü %0,05 TFA içermektedir)	[11]