



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

MODİFİYE CAMSI KARBON ELEKTROT KULLANILARAK
YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN EŞZAMANLI
ELEKTROKİMYASAL TAYİNİ

Asiye Aslıhan AVAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hayati FİLİK

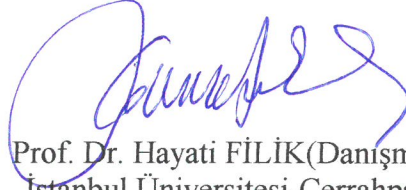
Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

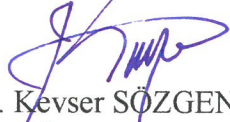
İSTANBUL-2019

Bu çalışma, 4.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

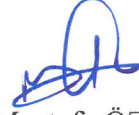
Tez Jürisi



Prof. Dr. Hayati FİLİK(Danışman)
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Hüsnu CANKURTARAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete' yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'nın aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince kendisi ile çalışmaktan memnuniyet duyduğum bana olan inancını ve güvenini her zaman hissettiğim, her konuda bana destek olan ve beni yönlendiren, engin bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan kaçınmayan, beni ileriki çalışmalara hazırlayan ve kısa sürede çok sayıda yayın yapmamı sağlayan değerli danışman hocam, Prof. Dr. Hayati FİLİK'e

Tez çalışmam boyunca değerli zamanlarını ayıran, tez izleme komitesinde yer alan saygı değer hocalarım, Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN ve Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU'na

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca manevi destekleriyle her an yanımda olan dostluk ve yardımlarını esirgemeyen laboratuvarında birlikte çalıştığım kıymetli arkadaşlarım, Seda UZUNBOY ve Özge KARAKAŞ'a, çalışma arkadaşım ve ikiz kardeşim Aslı Neslihan AVAN'a

Hayatımın her aşamasında karşılıksız sevgi ve desteklerini hiç esirgemeyen, sabır ve anlayışla hep yanımda olan AİLEME sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2019

Asiye Aslıhan AVAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. VİTAMİN	4
2.1.1. A Vitamini	4
2.1.2. D Vitamini	7
2.1.3. E Vitamini.....	9
2.1.4. K Vitamini	10
2.2. SİKLODEKSTRİNLER.....	13
2.3. KARBON NANOTÜP	14
2.4. LİTERATÜRDEKİ YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN TAYİNİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	15
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	23
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR	23
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER.....	23
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması	23
3.2.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp'ün Hazırlanması	24
3.2.3. Örneklerin Hazırlanması.....	24
3.3. YÜZEY MODİFİKASYONU	26
3.3.1. β -Siklodekstrin Miktarının Optimizasyonu	26
3.3.2. MWCNT Miktarının Optimizasyonu	26
3.3.3. β CD/MWCNT/GCE'nin Hazırlanması	26
3.4. ELEKTROT YÜZEYİNİN ELEKTROKİMYASAL KARAKTERİZASYONU	27

3.5.	A, D ₃ , E VE K ₁ -VİT'LERİNİN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞI.....	27
3.6.	YÜZEY AKTİF TÜRÜNÜN VE MİKTARININ BELİRLENMESİ	27
3.7.	NaCl MİKTARININ ETKİSİ	28
3.8.	OPTİMUM PH'IN BELİRLENMESİ	28
3.9.	TARAMA HIZININ ETKİSİ.....	28
3.10.	KARE DALGA VOLTAMETRİSİ PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ	29
3.11.	VİTAMİNLERİN TEK TEK VE EŞ ZAMANLI ANALİTİK PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ	29
4.	BULGULAR.....	30
4.1.	β-SİKLODEKSTRİN MİKTARININ OPTİMİZASYONU.....	30
4.2.	MWCNT MİKTARININ OPTİMİZASYONU	30
4.3.	TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU KARAKTERİZASYONU	31
4.4.	ELEKTROT YÜZEYİNİN ELEKTROKİMYASAL KARAKTERİZASYONU	32
4.5.	A, D ₃ , E VE K ₁ -VİT'İN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞI.....	35
4.6.	YÜZEY AKTİF TÜRÜNÜN VE MİKTARININ BELİRLENMESİ	37
4.7.	NaCl MİKTARININ ETKİSİ	40
4.8.	OPTİMUM PH'IN BELİRLENMESİ	42
4.9.	TARAMA HIZININ ETKİSİ.....	47
4.10.	KARE DALGA VOLTAMETRİSİ PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ	48
4.11.	ANALİTİK PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ.....	50
4.12.	TEKRARLANABİLİRLİK VE STABİLİTE.....	52
4.13.	ÖRNEK UYGULAMASI.....	53
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	56
	KAYNAKLAR	60
	ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: A Vitamininin formları.	5
Şekil 2.2: D vitamininin formları.	8
Şekil 2.3: E-Vit'nin formları.	9
Şekil 2.4: K vitamininin formları.	11
Şekil 2.5: α CD (a), β CD (b), γ CD (c).	13
Şekil 2.6: SWCNT ve MWCNT'ün yapısı.	15
Şekil 4.1: %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda, v : 50 mV s ⁻¹ , 10 ⁻⁴ M A-Vit, 5 × 10 ⁻⁵ M D ₃ -Vit, 2 × 10 ⁻⁵ M E-Vit ve 2 × 10 ⁻⁵ M K ₁ -Vit'in %0,1, %0,2, %0,5, %1 ve %2 β CD/MWCNT/GCE ile elde edilen döngülü voltamogramları.....	30
Şekil 4.2: %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda, v : 50 mV s ⁻¹ , 10 ⁻⁴ M A-Vit, 5 × 10 ⁻⁵ M D ₃ -Vit, 2 × 10 ⁻⁵ M E-Vit ve 2 × 10 ⁻⁵ M K ₁ -Vit'in 2, 3, 4 ve 5 μ L 2 mg/mL %1 β CD/MWCNT/GCE ile elde edilen döngülü voltamogramları.....	31
Şekil 4.3: MWCNT(A), β CD(B) ve β CD/MWCNT(C)'ün SEM görüntüleri.	32
Şekil 4.4: 5 mM [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 'ün 0,1 M KCl ortamında yalnız GCE (a), β -CD/GCE (b) MWCNT/GCE (c) ve β CD/MWCNT/GCE (d) deki döngülü voltamogramları. v : 50 mV s ⁻¹	33
Şekil 4.5: Yalnız GCE (a), β CD/GCE (b) MWCNT/GCE (c) ve β CD/MWCNT/GCE (d) 5 mM Fe(CN) ₆ ^{4-/3-} (1:1) ve 0,1 mol L ⁻¹ KCl içeren çözelti ortamında elektrokimyasal empedans spektroskopisi, genlik 5mV; frekans aralığı:100000 Hz - 0.01 Hz.	35
Şekil 4.6: 50mV s ⁻¹ tarama hızında %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 10 ⁻⁴ M A-Vit, 5 × 10 ⁻⁵ M D ₃ -Vit, 2 × 10 ⁻⁵ M E-Vit ve 2 × 10 ⁻⁵ M K ₁ -Vit'in GCE (a), β CD/GCE (b), MWCNT/GCE (c), β CD/MWCNT/GCE (d) döngülü voltamogramları.....	36
Şekil 4.7: β CD/MWCNT/GCE ile 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 10 ⁻⁴ M A-Vit, 5 × 10 ⁻⁵ M D ₃ -Vit, 2 × 10 ⁻⁵ M E-Vit ve 2 × 10 ⁻⁵ M K ₁ -Vit'in farklı TX-100 (w/v) konsantrasyonlarındaki döngülü voltamogramları, v : 50 mV s ⁻¹	38

Şekil 4.8: β CD/MWCNT/GCE ile 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D ₃ -Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K ₁ -Vit'in farklı SDS (w/v) konsantrasyonlarındaki döngülü voltamogramları, v : 50 mV s ⁻¹	39
Şekil 4.9: β CD/MWCNT/GCE ile 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D ₃ -Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K ₁ -Vit'in % 0,02(w/v) SDS ve farklı TX-100 (w/v) konsantrasyonlarındaki döngülü voltamogramları, v : 50 mV s ⁻¹	40
Şekil 4.10: β CD/MWCNT/GCE ile pH 5 BR tamponunda %0,01(w/v) TX-100, %0,02(w/v) SDS varlığında 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D ₃ -Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K ₁ -Vit'in farklı NaCl konsantrasyonlarındaki döngülü voltamogramları, v : 50 mV s ⁻¹	41
Şekil 4.11: β CD/MWCNT/GCE ile pH 5 BR tamponunda %0,01 (w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D- Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K ₁ -Vit'in farklı NaCl konsantrasyonlarındaki pik akım değerleri, v : 50 mV s ⁻¹	41
Şekil 4.12: β -CD/MWCNT/GCE ile %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 10^{-4} M A-Vit'in çeşitli pH'larda 0,1 M BRT ile elde edilen döngülü voltamogramları v : 50 mV s ⁻¹	42
Şekil 4.13: A-Vit'in oksidasyonunun reaksiyon mekanizması.	43
Şekil 4.14: β CD/MWCNT/GCE ile %0,01(w/v) TX-100, %0,02(w/v) SDS varlığında 5×10^{-5} M D ₃ -Vit'in çeşitli pH'larda 0,1 M BRT ile elde edilen döngülü voltamogramları, v : 50 mV s ⁻¹	43
Şekil 4.15: D ₃ -Vit'in oksidasyonunun reaksiyon mekanizması.	44
Şekil 4.16: β CD/MWCNT/GCE ile 50mV s ⁻¹ tarama hızında %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 2×10^{-5} M E-Vit'in çeşitli pH'larda BRT ile elde edilen döngülü voltamogramları, v : 50 mV s ⁻¹	45
Şekil 4.17: E-Vit'nin oksidasyon reaksiyon mekanizması.	45
Şekil 4.18: β CD/MWCNT/GCE ile %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 2×10^{-5} M K ₁ -Vit'in çeşitli pH'larda BRT ile elde edilen döngülü voltamogramları, v : 50 mV s ⁻¹	46
Şekil 4.19: K ₁ -Vit'in redoks reaksiyon mekanizması.	46
Şekil 4.20: β CD/MWCNT/GCE ile 0,15M NaCl, %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D ₃ -Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K ₁ -Vit'in farklı pH'larda 0,1 M BR tamponundaki pik akım değerleri, v : 50 mV s ⁻¹	47
Şekil 4.21: β CD/MWCNT/GCE ile 10^{-4} M A-Vit (A), 5×10^{-5} M D ₃ -Vit (B), 2×10^{-5} M E-Vit'nin (C) ve 2×10^{-5} M K ₁ -Vit'nin 0,1 M pH 5 BR tampon çözeltisi içerisinde %0,01 (w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında farklı tarama hızlarındaki voltamogramları (10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mV s ⁻¹).	48

Şekil 4.22: Kare dalga parametrelerinin genlik (A), frekans (B), basamak yüksekliği (C)'nin vitaminlerin pik akımına etkisi.49

Şekil 4.23: β CD/MWCNT/GCE ile %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS ve 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda A-Vit; 6, 20, 40, 60, 80, 100, 200 μ M (A), D₃-Vit; 0,5; 4,0; 6,0; 10; 20; 40; 60; 80 μ M (B), E-Vit; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ M (C), K₁-Vit; 0,1; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10, 20, 40 μ M (D) konsantrasyonlarında SWV ile elde edilen voltamogramları.....50

Şekil 4.24: β CD/MWCNT/GCE ile %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS ve 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 20 μ M D₃-Vit, 20 μ M E-Vit, 6 μ M K₁-Vit ve A-Vit; 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ M (A), 80 μ M A-Vit, 20 μ M E-Vit, 6 μ M-K₁ Vit ve D₃-Vit; 0,8; 2; 4; 6; 10; 20; 40; 60 μ M (B), 80 μ M A Vit, 20 μ M D₃-Vit, 6 μ M K₁-Vit ve E-Vit; 0,5;1; 5; 8; 10; 20; 40; 60 μ M (C),80 μ M A-Vit, 20 μ M D₃-Vit, 20 μ M E-Vit ve K₁-Vit; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 20 μ M (D) SWV voltamogramları.51

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Yağda çözünen vitaminlerin stabilitelere etki eden faktörler.	25
Tablo 4.1: GCE, β CD/GCE, MWCNT/GCE ve β CD/MWCNT/GCE'nin redoks probu ile bulunan anodik/katodik pik akım değerleri ve pik potansiyel değerleri.	33
Tablo 4.2: Elektrotların Randles-Sevcik eşitliğinden hesaplanan yüzey alanları.....	34
Tablo 4.3: A, D ₃ , E ve K ₁ -Vit'lerinin yalın ve modifiye GCE yüzeyinde döngülü voltametri ile belirlenen pik potansiyeli ve pik akım değerleri.	37
Tablo 4.4: A, D ₃ , E ve K ₁ -Vit'lerinin eş zamanlı SWV yöntemi kullanılarak β CD/MWCNT/GCE ile elde edilen analitik parametreleri.	52
Tablo 4.5: Gün içi ve günler arası %RSD değerleri	52
Tablo 4.6: Süt, vitamin suyu ve ilaç karışımı örneklerinde vitaminlerin eşzamanlı olarak belirlenmesi.	54
Tablo 5.1: Geliştirilen yöntemin literatürdeki A, D ₃ , E ve K ₁ -Vit'lerinin tayininde kullanılan elektrokimyasal yöntemlerle karşılaştırılması.	58

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
A	: Elektroaktif yüzey alanı
D	: Diffüzyon katsayısı
E	: Potansiyel
E_{dep}	: Biriktirme Potansiyeli
E^{o'}	: Formal Potansiyel
I_p	: Pik akımı
n	: Elektron transfer sayısı
R_{ct}	: Yük transfer direnci
v	: Tarama Hızı

Kısaltmalar	Açıklama
A-SWSV	: Anodik kare dalga sıyırma voltametri
Ad-SDPV	: Adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametri
BR tamponu	: Britton-Robinson Tamponu
CV	: Döngülü voltametri
CNT	: Karbon nanotüp
DPV	: Diferansiyel puls voltametri
ds-DNA	: Çift sarmallı DNA
EIS	: Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
GCE	: Camsı karbon elektrot
GE	: Grafit elektrot
LSV	: Doğrusal tarama voltametri
MD	: Mikrodisk
MWCNT	: Çok duvarlı karbon nanotüp
PBHQ	: poli(2,2'-(1,4-fenilendivinilen)-bis-8-hidroksikinaldin)
p(ARS)	: poli(Alizarin kırmızısı S)
PE	: Pasta elektrot
pP	: Polipirol

RAE	: Retinol aktivite eşdeğeri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SPC	: Setil pridinyum klorür
SPGNE	: Yüzey baskılı grafen-nafyon elektrot
STAB	: Setil trimetil amonyum bromür
SWCNT	: Tek duvarlı karbon nanotüp
SWV	: Kare dalga voltametrisi
TX-100	: Triton X-100
Vit	: Vitamin
α-TOAc	: α -Tokoferol asetat
α-TOH	: α -Tokoferol
βCD	: β -Siklodekstrin

ÖZET

MODİFİYE CAMSI KARBON ELEKTROT KULLANILARAK YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN EŞ ZAMANLI ELEKTROKİMYASAL TAYİNİ

DOKTORA TEZİ

Asiye Ashhan AVAN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Hayati FİLİK

İnsanlarda giderek artan iyi beslenme alışkanlıkları vitamin takviyeli gıdaların, multivitamin kapsülleri ve tabletlerinin kullanımını önemli ölçüde arttırmıştır. Bunların işlenmesi ve depolanması sırasında kimyasal reaksiyonlar nedeniyle vitamin miktarları önemli ölçüde azalabilmektedir. Aynı zamanda lipofilik vitaminlerin fazlasının vücutta depolanması sonucunda sağlık açısından vücutta bazı zararlı etkileri olmaktadır. Bu nedenle, bu ürünlerin içeriğindeki vitamin miktarlarının doğruluğunu belirlemede kalite kontrol yöntemleri gereklidir. Bu amaçla çalışmada voltametrik yöntemle yağda çözünen A, D₃, E ve K₁ vitaminlerinin sulu yüzey aktif ortamında tayini için β-siklodekstrin/Çok duvarlı karbon nanotüp (βCD/MWCNT) modifiye camsı karbon elektrot temelli bir elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Lipofilik vitaminlerinin eş zamanlı kantitatif tayini için optimum koşullar döngülü voltametri ile %0,01(w/v) TX-100 ve %0,02 (w/v) SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 Britton-Robinson (BR) tamponu olarak belirlenmiştir. A, D₃, E ve K₁ vitaminlerinin tek tek kare dalga voltametrisi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri sırasıyla 6-200, 0,5-80, 0,5-100 ve 0,1-40 µM konsantrasyon aralığında doğrusaldır. A, D₃, E ve K₁ vitaminlerinin eş zamanlı olarak kare dalga voltametrisi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri sırasıyla 8-100, 0,8-60, 0,5-60 ve 0,1-20 µM konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Ayrıca, βCD/MWCNT/GC elektrot ile yağda çözünen vitaminlerin tayininde iyi bir tekrarlanabilirlik ve seçicilik gösterdiği bulunmuştur. Önerilen voltametrik yöntemle, yağda çözünen vitaminler hızlı ve basit bir şekilde belirlenebilmektedir. Geliştirilen elektrokimyasal yöntem son olarak ilaç

ve katkılı gıda örneklerinde (devam sütü ve vitamin suyunda) bulunan yağda çözünen vitaminlerin belirlenmesi için uygulanmıştır. Bu amaçla örnekler alkali ortamda sabunlaştırılmış ve hekzan ile ekstrakte edildikten sonra başarılı bir şekilde analiz edilmiştir.

Temmuz 2019, 85 sayfa.

Anahtar kelimeler: A Vitamini, D Vitamini, E Vitamini, K Vitamini, Yağda znen vitaminler, Voltametri, Gıda analizi, İla analizi.



SUMMARY

SIMULTANEOUS ELECTROCHEMICAL DETERMINATION of FAT-SOLUBLE VITAMINS with USING MODIFIED GLASSY CARBON ELECTRODE

Ph.D. THESIS

Asiye Ashhan AVAN

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Hayati FİLİK

Increasingly, good nutrition habits in humans have significantly increased the use of vitamin-fortified foods, multivitamin capsules and tablets. Due to the chemical reactions during their processing and storage, the amounts of vitamins can be significantly reduced. At the same time, storage of excess lipophilic vitamins in the body has some harmful effects on the body. Therefore, quality control methods are necessary to determine the correctness of the vitamin content of these products. For this purpose, an electrochemical sensor based on β -cyclodextrin /Multi-walled carbon nanotube (β CD/MWCNTs) modified glassy carbon electrode was developed for the determination of the fat-soluble A, D₃, E, and K₁ vitamins by voltammetric method in aqueous surfactant medium. The optimum conditions for the simultaneous quantitative determination of lipophilic vitamins were determined as the pH 5 Britton-Robinson (BR) buffer with 0.15 M NaCl in the presence of 0.01% TX100 and 0.02% SDS with cyclic voltammetry. Calibration curves obtained by individual square wave voltammetry of vitamins A, D₃, E, and K₁ are linear in the concentration range of 6-200, 0.5-80, 0.5-100 and 0.1-40 μ M, respectively. Calibration curves obtained by simultaneous square wave voltammetry of vitamins A, D₃, E and K₁ are linear in the concentration range of 8-100, 0.8-60, 0.5-60 and 0.1-20 μ M, respectively. Moreover, it is found that β CD/MWCNTs displays

high reproducibility and selectivity for the determination of fat-soluble vitamins. The proposed voltammetric method permit the rapid and simple simultaneous determination of fat-soluble vitamins. At the end of the study, the improved electrochemical method was applied to the determination of the fat-soluble vitamins content in drugs and fortified food samples (follow up milk and vitamin water). For this purpose, the samples were saponified in an alkaline medium and were successfully analyzed after extraction with hexane.

July 2019, 85 pages.

Keywords: Vitamin A, vitamin D, vitamin E, vitamin K, fat-soluble vitamins, voltammetry, food analysis, drug analysis.



1. GİRİŞ

Vitaminler, yaşamımız için gerekli birçok fizyolojik fonksiyonun gerçekleşmesinde rol alan besinler arasındadır. Vitaminler, canlı organizmaların gelişimi ve normal büyümesi için vazgeçilmez olan çeşitli işlevlere sahip, esansiyel mikro besin maddeleri sınıfının büyük bir kısmını oluşturmaktadır ve bunların bulunmaması, ciddi fizyolojik sorunlara neden olmaktadır. Bu bileşiklerin her biri farklı biyoyararlanım, biyolojik etki veya fizyolojik rolü olan çok sayıda homolog (vitamin) ve metabolitini kapsamaktadır (Combs, 2012; Waldenstedt, 2006). Çözünürlüklerine bağlı olarak, vitaminler iki gruba ayrılır; bunlar suda çözünen (sekiz B-kompleks vitamini ve C vitamini) ve yağda çözünen vitaminlerdir. Yağda çözünen vitaminler retinol (A vitamini), tokoferol (E vitamini), kalsiferol (D vitamini) ve antihemorajik vitaminleri (K₁ vitamini) içerir (Nelson ve Cox, 2013). Gıda teknolojisinde, vitamin analizi, çeşitli biyokimyasal ve beslenme bozukluklarının değerlendirilmesinde büyük ilgi çekmektedir. Besin maddelerindeki vitamin içeriği, iyi depolanmaya ve paketlemeye bağlıdır, bu nedenle vitamin içeriği, gıdaların tazeliğinin veya iyi saklama koşullarının bir göstergesi olabilir. Bu nedenle, süt ürünleri insan beslenmesinde hayati bir rol oynadığı için gıda numunelerindeki vitaminlerin (yani su ve yağda çözünen) analizleri büyük önem taşımaktadır.

Son yirmi yılda, bu amaçla, kapiler elektroforez, spektrofotometri, florimetri, kolorimetri ve kromatografi gibi çeşitli geleneksel analitik yöntemler kullanılarak tayin yöntemleri geliştirilmiştir (Amin, 2001; Delgado-Zamarreño ve diğ. 2002; Karaźniewicz-Łada ve Główka, 2016; Pérez-Ruiz ve diğ. 1999; Ravisankar ve diğ. 2015; Tütem ve diğ. 1997; Zhang ve diğ. 2018). Yağda çözünen vitaminler çeşitli örnek matrislerinde analiz edilmiştir (Song ve diğ. 2000). HPLC, su ve yağda çözünen vitaminlerin tayini için en yaygın yöntem olarak kullanılmıştır. Hızlı ayrılma, yüksek hassasiyet ve doğru miktar tayini nedeniyle HPLC yöntemleriyle, çeşitli matrislerdeki vitaminlerin tespitinde popüler hale gelmiştir. Ters faz HPLC, vitamin analizi için uygun bir tekniktir. Ters faz HPLC yöntemi, genel olarak hayvan yemi ve gıda maddelerinde yağda çözünen vitaminlerin (A, D, E ve K) eş zamanlı belirlenmesi için kullanılmıştır. (Casal ve diğ. 2001; Escrivá ve diğ. 2002; Gimeno ve diğ. 2000; Gomis ve diğ. 2000; Iwase, 2000; Momenbeik ve Bagheri, 2015; Moreno ve Salvadó, 2000; Rodrigo ve diğ. 2002).

Bu yöntemlerin çoğunda, çok fazla miktarda organik çözücü (MeOH, ACN, EtOH, THF, 1,4-dioksan, bütanol veya bunların karışımları ve benzeri), mobil faz olarak kullanılmıştır ve bunların da çevreye zararlı etkileri bulunmaktadır. Tüm bu yöntemler, zaman alıcı analiz ve ekonomik olarak zorlu enstrümantasyon gerektirmektedir. Kısacası, bu tekniklerin en büyük dezavantajı uzun ve kapsamlı iş akışıdır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için kullanımı kolay, düşük maliyetli, taşınabilir, hassas ve basit elektroanalitik yöntemler günümüzde büyük önem kazanmıştır. Elektrokimyasal analiz, basit ekipmanı, düşük maliyeti ve yüksek hassasiyeti sayesinde yağda çözünen vitaminleri tayin etmede dikkat çeken bir yoldur. Elektrokimyasal sensörlerin yağda çözünen vitaminlerin etkili analizi için büyük bir potansiyele sahip yenilikçi araçlar olduğu görülmüştür. Şimdiye kadar, yağda çözünen vitaminlerin tekli (Atuma ve diğ. 1974; Cincotto ve diğ. 2014; Filik ve diğ. 2016b; Jaiswal ve diğ. 2001; Li ve diğ. 2006; Ly, 2008; Michalkiewicz ve diğ. 2004; Mikheeva ve Anisimova, 2007; Sýs ve diğ. 2017; Sýs ve diğ. 2016; Ziyatdinova ve diğ. 2010) veya ikili (eşzamanlı tayini) tayini için farklı elektrokimyasal sensörler hazırlanmıştır (Filik ve Avan, 2017; Filik ve diğ. 2016a; Men ve diğ. 2017; Robledo ve diğ. 2013). Yukarıda belirtilen yöntemlerin tümü, organik çözücülerde, sulu organik karışımlarda veya sulu yüzey aktif madde çözeltilerinde katı elektrotlarla gerçekleştirilmiştir.

Yağda çözünen vitaminler (Vit) yüksek düzeyde elektrokimyasal aktiviteye sahip olduklarından A, D₃, E ve K₁-Vit'lerinin aynı anda belirlenmesi her zaman önemli olmuştur (Lovander ve diğerleri, 2018; Tan ve diğ. 2014). Bu nedenle, elektrokimyasal tayin yöntemleri, yağda çözünen vitaminlerin eşzamanlı olarak belirlenmesi için oldukça uygundur. Buna rağmen literatürde yağda çözünen vitaminlerin tümünün eşzamanlı olarak belirlenmesinde voltametrik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar çok az yapılmıştır. Bu amaçla, Thangphatthanarungruang ve diğ. (Thangphatthanarungruang ve diğ. 2018), yüzey baskılı grafen-nafyon elektrodu (SPGNE) kullanarak yağda çözünen vitaminlerin eşzamanlı olarak tayinini gerçekleştirmiştir. Yağda çözünen vitaminlerin elektrokimyasal davranışları, kare dalga voltametri (SWV) kullanılarak etanol/sodyum perklorat karışımı içinde incelenmiştir. Sýs ve ark. (Sýs ve diğ. 2016), yağda çözünen vitaminlerin hassas eş zamanlı elektrokimyasal tayini için adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametrisini (Ad-SDPV) kullanarak yöntem geliştirmişlerdir. Yağda çözünen vitaminlerin elektrokimyasal davranışlarını, Ad-SDPV kullanılarak su-asetonitril karışımı içerisinde incelemişlerdir.

Nanoteknolojinin ortaya çıkışı, sensör stratejilerinde büyük ilerlemelere yol açmıştır. Elektrokimyasal sensörler nanomalzemelerle modifiye edilerek analitlerin voltametik cavabı geliştirilebilmektedir. Karbon nanotüpler (CNT) de bu amaçla fiziksel ve katalitik özellikleri dolayısıyla sensörlerde kullanılan ideal elektrot malzemeleridir. Genel olarak CNT esaslı sensörler, yüksek yüzey alanı ve hızlı elektrot kinetiği özellikleri sayesinde sinyal şiddetini arttırarak düşük dedeksiyon limitlerini tayin edilebilmektedir. CNT'lerin kovalent veya kovalent olmayan yöntemlerle işlevselleştirilmesi, polimerizasyon matrisi içindeki dağılımını arttırmanın etkili bir yoludur. Çünkü işlevselleştirme, CNT ve polimer zincirleri arasındaki ara yüz etkileşimlerini arttırır ve böylece polimer matrisi içindeki yığılmaları azaltır (Sahoo ve diğ. 2010). Camsı karbon elektrot üzerinde β -siklodekstrin ve çok duvarlı CNT (MWCNT) nanokompozitleri son zamanlarda, her iki malzemenin sinerjik etkisi nedeniyle birçok organik molekülü incelemek ve tayin etmek için başarıyla kullanılmaktadır (Garrido ve diğ. 2016; Rahemi ve diğ. 2012; Rahemi ve diğ., 2013; Shen ve Wang, 2009).

Literatürde β CD/MWCNT/GCE kullanılarak yağda çözünen vitaminlerin elektrokimyasal tayinine rastlanmamıştır. Bu çalışmada amaç, sulu yüzey aktif çözeltilerinde β CD/MWCNT/GCE kullanarak yağda çözünen vitaminlerin pahalı ve uzun zaman gerektiren cihazlar olmadan seçici ve eşzamanlı olarak belirlenmesi için basit, güvenilir bir sensör geliştirerek elektrokimyasal davranışını araştırmaktır. Yağda çözünen vitaminlerin anyonik (SDS) ve noniyonik (TX-100) yüzey aktif varlığında davranışları döngülü voltametri ile incelenmiş, tayini ise kare dalga voltametri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan, β CD/MWCNT modifiye camsı karbon elektrot (β CD/MWCNT/GCE) ilaç ve vitamin katkılı gıda örneklerinde A, D₃, E ve K₁ vitamin(vit)'lerinin eşzamanlı olarak tayininde başarıyla kullanılmıştır. Elektrokimyasal sonuçlardan, β CD/MWCNT/GCE ile yağda çözünen vitaminlerin tayininde iyi bir elektrokatalitik aktivite sergilediği ve bu nedenle A, D₃, E ve K₁-Vit'lerinin eşzamanlı olarak tayininde kullanılabileceğini göstermiştir.

2. GENEL KISIMLAR

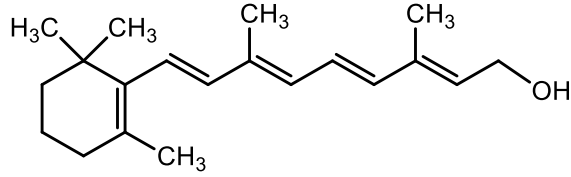
2.1. VİTAMİN

Vitamin terimi 1912'de ilk kez Funk tarafından önerilmiştir. Latince yaşam anlamına gelen "vita" sözcüğünden ve "amin" ise eksikliğinde beri beri hastalığına neden olan thiaminin keşfi sonucu bu ve buna benzer tedavi edici bileşenlerin amin içerdiği düşünülerek verilmiştir. Vitaminler metabolizmamızda yaşam için gerekli birçok fizyolojik fonksiyonun devam ettirilebilmesi için eser miktarda dışarıdan alınması gereken organik maddelerdir. Vitaminler beslenmeyle alınan diğer organik maddelerden farklı olarak vücuda doğrudan enerji sağlamazlar ve doku yapısının oluşumuna katılmazlar (Marshall, 1983). Vitaminlerin bazıları metabolik reaksiyonlarda redoks tepkimelerinde kofaktör olarak rol alırken (C, E, K vitaminleri, pantoteik asit, riboflavin gibi) bazıları da biyolojik antioksidan (E ve C vitamini gibi) olarak rol alırlar. A ve D vitaminleri ise hormon fonksiyonuna sahip vitaminlerdir. Vitaminler çözünürlüklerine göre suda çözünenler (B vitaminleri ve C vitamini) ve yağda çözünenler (A, D, E ve K) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (deMan, 1999). Suda çözünen vitaminlerin aşırısı vücuttan atılırken, yağda çözünen vitaminlerin aşırısı ise karaciğer ve yağ dokularında depolanmaktadır. Bu sebeple yağda çözünen vitaminler vücut için gerekli olan düzeyden fazla alınması durumunda toksik olabilmektedir.

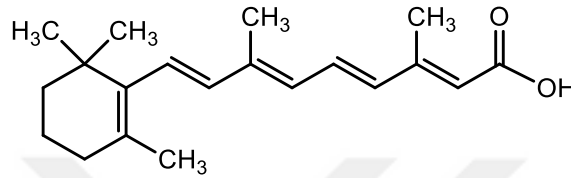
2.1.1. A Vitamini

Retinoidler, doğal veya yapay A vitamini aktivitesine sahip olan veya olmayan formları için kullanılırken, A vitamini, genellikle biyolojik olarak A vitamini aktivitesi gösteren molekülleri ifade etmek için kullanılır. A vitamininin alkol (retinol) (1,3,7-dimetil-9(2,6,6-trimetil-1-sikloheksen-1-il)-2,4,6,8-onatetraen-1-ol, eski adı oftallamin, all-trans-retinol), ester ve metabolik olarak eşdeğeri olan aldehit (retinal, retinaldehit, retinen, vitamin A aldehit, akseroftal) formu bulunmaktadır. Temelde β -iyonon halkası ve izopren biriminden oluşmaktadır. Retinoidlerin en önemli trans ester yapılarından olan retinol palmitat karaciğerdeki depo şeklidir. Beta-karoten, α -karoten, β -kriptoksantin ve metabolik olarak retinal ve retinol'e dönüştürülebilen diğer birkaç karotenoid, provitamin A olarak adlandırılır. Önemli biyolojik fonksiyonları olan ve retinol metaboliti olan retinoik asit (vitamin A asidi, 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-sikloheksen-1-il)-2,4,6,8-nonatetraenoik asit, tretinoin)

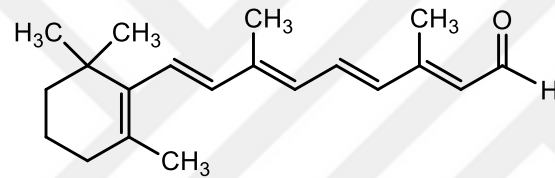
öncülüne geri dönüştürülemediği için retinoik asit için A vitamini terimi kullanılmamaktadır (Albahrani ve Greaves, 2016).



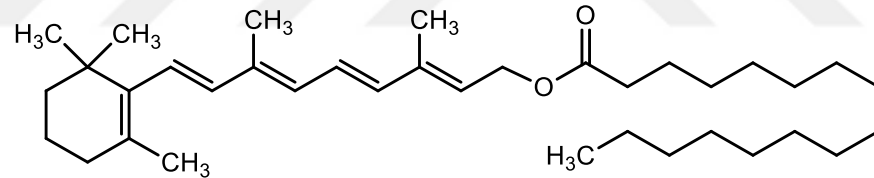
all-trans-retinol



Retinoik asit



all-trans-retinal



Retinil palmitat

Şekil 2.1: A Vitamininin formları.

A vitamini insan metabolizmasında birçok rol oynar. A vitamininin en önemli rolü görme ile ilgilidir. Ayrıca, bağışıklık sisteminde ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde, embriyonik kök hücre farklılaşması ve gelişiminde, cildin ve vücudun tüm epitel dokularının sağlıklı yapısının ve fonksiyonunun korunmasında yardımcı olmaktadır. Bundan başka, karbonhidratların, lipidlerin ve proteinlerin makrobesin metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynadığı tahmin edilmektedir (Albahrani ve Greaves, 2016; Kohlmeier, 2015; Marshall, 1983).

Yiyecekler retinol, retinil esterler, provitamin A karotenoidleri gibi bileşikler içerirler. Hem retinol türevlerinin hem de karotenoidlerin çeşitli izomerik formları bulunmaktadır. Doğal gıdalarda en yaygın retinol şekli all-trans izomeridir. Çok az miktarda 9-cis-retinol ve diğer

A-vit metabolitleri bazı gıdalarla birlikte alınmaktadır. A-Vit aktivitesine sahip bileşikler oksidasyon, izomerizasyon ve polimerizasyona karşı çok hassastır. Birçok gıdada karotenoidlerin biyoyararlanımı, retinol takviyeleri kadar iyi değildir. Saf karotenoidlerin bağırsaklardaki emilimi retinolden daha azdır. Ayrıca, β -karoten dışındaki provitamin A karotenoidleri, β -karoten'in A vitamini aktivitesinin sadece yarısını vermektedir. Lutein ve likopen gibi diğer karotenoidler ise A vitamini oluşturamazlar (Food and Nutrition Board, 1989; Kohlmeier, 2015; McLaren ve Frigg, 2001). A vitamini kaynakları arasındaki değerlendirmeyi kolaylaştırmak için, farklı A-vit formlarının alımı genellikle 1 μ g all-trans-retinol ile retinol aktivite eşdeğerleri (RAE) olarak ifade edilmektedir. Retinol olmayan bileşikler için dönüşüm faktörleri biyoyararlanımı ve metabolik verimi hesaba katar. Bu nedenle, 12 μ g beta-karoten 24 μ g alfakaroten ve 24 μ g beta-kriptoksantin 1 RAE'ye karşılık gelmektedir.

Retinol ve retinol türevi bileşikler sadece hayvansal kaynaklı yiyeceklerde bulunur. En yüksek konsantrasyonda A vitamini karaciğer (106 μ g RAE/g) ve sakatatlarda bulunmaktadır. Bundan başka yumurta ve vitamin katkılı sütler A vitamini açısından zengin kaynaklardır. Bitkisel kaynaklı provitamin A karotenoidlerince zengin gıdalar ise ıspanak (8,2 μ g RAE/g), lahana (7,4 μ g/g), pazı (3,1 μ g/g) ve brokoli (1,4 μ g/g) gibi yeşil yapraklı sebzeler, havuç (24,6 μ g /g) gibi turuncu veya kırmızı sebze ve meyvelerdir. Sebze ve meyvelerdeki karotenoidlerden sağlanan bu A vitamini kaynağı, gelişmekte olan ülkelerdeki çoğu insan için ana kaynaktır ve beslenmeyle A vitamini alımının % 70-90'ını oluşturur. Yetişkinlerde 700 (kadın) ile 900 (erkek) RAE arasında olmalıdır (Kohlmeier, 2015; McLaren ve Frigg, 2001).

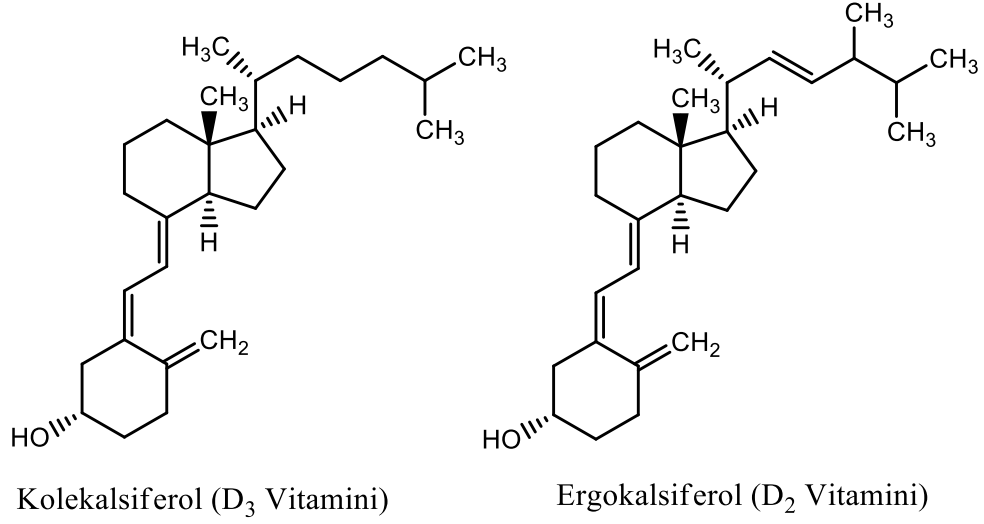
A-Vit eksikliği ilk olarak geri dönüşümlü gece körlüğüne neden olmakta, daha sonra göz yapısındaki değişikliklerden (konjonktivanın kurumması ile birlikte xeroftalmi ve korneanın opaklığının artması) dolayı artan şiddetli ve dönüşü olmayan bir şekilde görme kaybına neden olmaktadır.

A vitamini eksikliği en sık 5 yaşından daha küçük çocuklarda bulunur ve genellikle beslenmeyle yetersiz alımı nedeniyledir. Eksikliği ayrıca kronik yağ emilim bozukluğundan kaynaklanabilmektedir (Food and Nutrition Board, 1989). Hiperkeratoz ve diğer cilt lezyonları A vitamininin yetersiz alımının diğer tipik etkilerindedir. Yetersizliğindeki bir başka etki ise, özellikle çocuklarda, immün fonksiyon bozukluğudur.

A vitamini fazlalığı çok nadir görülür, ancak hastalığa yol açabildiği ve tehlikeli olduğu unutulmamalıdır. A vitamini takviyelerinin dikkatli ve kontrollü kullanımı önemlidir. A vitamini (retinol) ve vücuttaki A vitamininin fonksiyonlarının çoğunu yerine getiren yakından ilişkili asit formu (retinoik asit), hayvanların ve insanların vücudunda depolanır (McLaren ve Frigg, 2001). Retinol alımı 1000 µg/gün'den fazla olan yaşlılarda kemiklerin kırılma riski artmaktadır. 15.000 µg/gün den fazla retinol alımı, kaşıntıya, ciltte bozulmaya, halsizliğe ve iştah kaybına neden olabilmektedir. Beyin omuriliğine basınç nedeni ile bulantı, kusma, baş ağrısı ve nihayetinde nöbetler, koma, solunum yetmezliği ve ölüme neden olabilmektedir (Kohlmeier, 2015).

2.1.2. D Vitamini

D-Vit, kalsiyum dengesini sağlayan ve kemik mineralizasyonunda hayati rol oynayan yağda çözünen bir hormon öncülüdür. D-Vit'nin ergokalsiferol (D₂-Vit) ve kolekalsiferol (D₃-Vit) olmak üzere iki temel formu bulunmaktadır. Sadece sınırlı sayıda gıdada doğal olarak D vitamini bulunmaktadır. Vitamin D₃, yumurta, balık türleri (Kuzey Denizi somonu, ringa balığı ve uskumru) ve karaciğer gibi hayvansal gıdalarda bulunabildiği gibi ette de az miktarda D₃ vitamini bulunmaktadır. D₂ vitamini ise ultraviyole ışına maruz kalan bitkilerde ergosterolün (provitamin D₂'nin) dönüşmesi sonucu elde edilen vitamin D₂'den beslenme yolu ile alınabilir. Her iki vitamin de beslenme yoluyla emilebilirken bu vitaminin başlıca doğal kaynağı güneş ışığına maruz kalma sırasında deride 7-dehidrokolesterolden endojen olarak sentezlenmesidir. (Borradale ve Kimlin, 2009; Gámiz-Gracia ve diğ. 2000). Bu endojen sentez, cilt kalınlığı ve rengi, güneş ışığında kalma süresi ve mevsim gibi bazı faktörlere bağlıdır (Farrell ve Herrmann, 2013).



Şekil 2.2: D vitamininin formları.

Pro-vitamin D₃ (7-dehidrokolesterol), 290 ila 315 nm arasındaki dalga boylarındaki UV radyasyonunun etkisiyle karbon 9 ve 10 arasındaki bağın bölünmesine neden olur. Oluşan kararsız 9,10-seko-sterol "previtamin D₃" olarak bilinir. Previtamin D₃ daha sonra karbon 5 ve 6 arasındaki bağın etrafında dönerek termodinamik olarak daha stabil olan D₃ vitaminine (kolekalsiferol) izomerleşir. Gıda takviyelerinin aksine, UV radyasyonuna sürekli maruz kalmak D vitamini toksisitesine yol açmaz, çünkü oluşan aşırı D₃ vitamini lumisterol ve taşisterol'e dönüşmektedir (Albahrani ve Greaves, 2016; Farrell ve Herrmann, 2013).

D vitamininin gen düzenlemesindeki aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D'nin, kemik ve bağ dokularının gelişmesinde önemli rolü bulunmaktadır. Kalsiyumun bağırsaklardan emilmesini ve vücutta tutulmasını sağlar. D vitamininin yetersiz alınmasında kemik metabolizmasında bozulmaya bağlı kalsiyum eksikliğine neden olarak çocuklarda Raşitizm, yetişkinlerde ise osteomalazi ve kemik erimesine neden olur (Kohlmeier, 2015). D vitamini eksikliği birçok ülkede halk sağlığı problemidir. Bu eksikliğin yalnızca yılın çoğunda güneşli bir iklime sahip olmayan ülkelerde yaygın olduğu düşünülmekle birlikte, ileriki araştırma bulguları, bu eksikliğin dünya çapında olduğunu, bazı etnik kökenlerde ve bazı coğrafi bölgelerde ise daha yaygın olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (Albahrani ve Greaves, 2016).

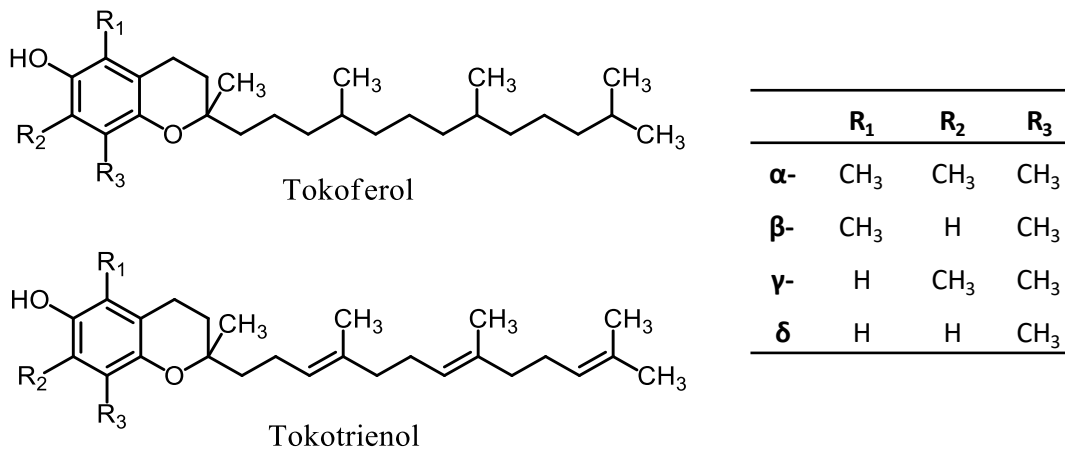
Gıdaların içerdiği D vitamini mikrogram veya IU cinsinden ifade edilir (1µg = 40 IU). Yetişkinler, en az 600 IU/gün (15 µg/gün), ileri yaşlarda da 800 IU/gün (20 µg/gün) almalıdır. Genç bir insanın, yüz ve kolunun 10-15 dakika yaz güneşine maruz kalmasıyla

(UV-B, 290-315 nm) bir gün için gereken D Vitamini ihtiyacı karşılanabilirken, yaşlı bir kişinin birkaç katı kadar daha fazla maruz kalması gerekmektedir (Kohlmeier, 2015).

D Vitamini toksisitesi hipervitaminoz D olarak da adlandırılır, uzun süre aşırı miktarda D vitamini alımı nadir ancak ciddi bir durumdur. D vitamini toksisitesine genellikle beslenme veya güneş ışığına maruz kalma ile değil, D vitamini takviyelerinin aşırı dozları neden olmaktadır. Aşırı D vitamini alımı hiperkalsemiye neden olur. Hiperkalsemi de böbrek ve damarlarda yumuşak doku kireçlenmesine yol açar (Marcinowska-Suchowierska ve Płudowski, 2016).

2.1.3. E Vitamini

Doğal olarak bulunan iki E vitamini grubu vardır: Bunlar tokoferoller ve tokotrienollerdir. Polar kromanol halkasına ve lipofilik poliprenil yan zincirine sahip bir grup organik moleküllerdir. Her biri, kromanol halkası üzerindeki metil gruplarının konumu ve sayısına bağlı olarak dört izomer (α , β , γ ve δ) içerir. α -tokoferol, doğadaki en bol ve en fazla biyolojik aktiviteye sahip türüdür (T: tokoferol, T₃: Tokotrienol olmak üzere E vitamini aktiviteleri $\alpha T > \beta T > \alpha T_3 > \gamma T > \beta T_3 > \delta T$ şeklinde sıralanır). İnsanlarda ve hayvanlarda birçok biyolojik aktivite ile bağlantılıdır (Albahrani ve Greaves, 2016; Mène-Saffrané, 2017).



Şekil 2.3: E-Vit'nin formları.

E vitamini, anti-oksidan, anti-proliferan ve anti-inflamatuar dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olması nedeniyle kanser önleyici özelliği olduğu belirtilmiştir. E Vitamini lipid peroksidasyonunun ve diğer radikal kaynaklı oksidatif olayların önlenmesinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Brigelius-Flohé ve Traber, 1999).

E vitamininin sağlık açısından önemi çoğunlukla antioksidan özellikleriyle ilişkili olmasına rağmen, son zamanlarda antioksidan olmayan aktivitelerle de ilişkilendirilmiştir. E Vitamini, eritrositlerin normal morfolojisi için önemlidir ve hücre tahribatına yol açan reaktif oksijen türlerinin (ROS) giderilmesi için gerekli olduğundan yaşlanma sürecinin yavaşlamasında rol oynadığı düşünülmektedir. Bundan başka trombosit agregasyonlarını inhibe ederek kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu bir rolü bulunmektedir. Ayrıca E vitamininin artrit, katarakt, nörolojik hastalıklar ve immünolojik hastalıkları önleyici bir rolü olduğu öne srlmştir.

Yetişkinlerin günde en az 15 mg E-Vit'ne ihtiyaı bulunmaktadır. Doymamış yağ asidi içeren buğday tohumu, ayçiçek yağları ve fındık iyi birer E-Vit kaynağıdır. Bunların dışında kabuklu çerezler, diğer bitkisel yağlar ile kuşkonmaz, avakado, ve domates gibi meyve ve sebzelerden ise daha az miktarda E vitamini alınabilmektedir.

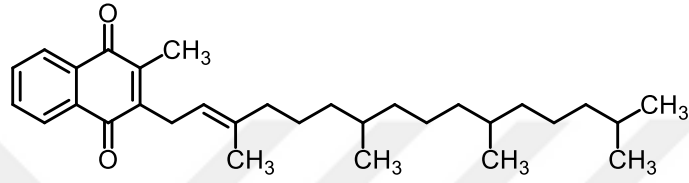
E-Vit eksikliği en yaygın olarak genetik veya kistik fibroz, kronik hepatit ve gastrointestinal bozukluklar gibi malabsorpsiyon bozukluklarından kaynaklanmaktadır. Yetersiz alımın ateroskleroz, Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının, kanser ve kataraktın ilerlemesini arttırdığını ve bağışıklık fonksiyonunu bozduğu bildirilmiştir.

Gıdalarda doğal olarak bulunan E vitamininin aşırı tüketiminin olumsuz etkileri bulunmamaktadır. Amerika ilaç Enstütüsü (IOM) (Institute of Medicine, 2000) tarafından tehlike tanımlaması, besin takviyelerinde ve farmakolojik ajanlarda katkı olarak kullanılan sentetik α -tokoferoller olan d- α -tokoferol asetat ve dl- α -tokoferol asetat alımına odaklanılmıştır. Mevcut verilerin gözden geçirilmesi zerine FAO / WHO 100 ila 200 mg sentetik dl- α -tokoferol miktarının takviye olarak tketelebildiğini bildirmiştir. Ancak genellikle çok yüksek dozlarda (rneğin, > 1000 mg/gün) takviyelerle alınması pro-oksidan hasara neden olabilmektedir. Ayrıca yüksek dozlarda (1000 mg'dan fazla) alımı kanın pıhtılaşmasını engelleyerek hemorajik inme riskini de artırabilmektedir. (FAO/WHO, 2002)

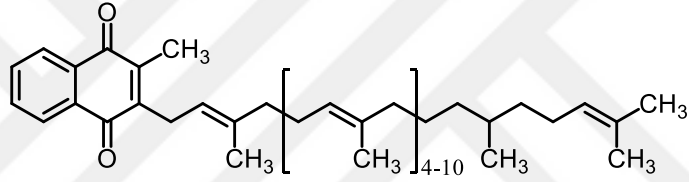
2.1.4. K Vitamini

Terim, Almanca "Koagulation" (kanın pıhtılaşması) kelimesinden gelmektedir. H. Dam 1929 yılında "alfalfa" isimli yapraklı bir sebzedeki kanın pıhtılaşmasından sorumlu olan maddeyi izole etmiş ve fillokinon (K_1) vitamini olarak adlandırmıştır (Dam, 1935). K vitamini hem doğal hem de sentetik formlarda bulunur. K Vitamini, antihemorajik özelliklere sahip 2-metil-

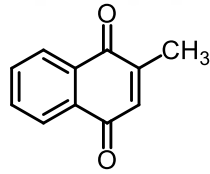
1,4-naftokinon halka sistemi ile karakterize edilen bir grup bileşiği belirtir. K Vitamini yapısal olarak benzeyen üç organik bileşikten oluşur. Bunların, bitkilerdeki doğal formu, fillokinondur (2-metil-3- [3, 7, 11, 15-tetrametil-2-heksadesenil]-1,4-naftalendion, fitonadion, 3-fitilmenadion), bakteriler tarafından sentezlenen yan zinciri 7-13 izoprenil ünitesinden oluşan menakinonlar K₂ vitamini olarak adlandırılır, sentetik formları ise menadion olarak adlandırılan K₃ ve menadiol sodyum difosfat olarak adlandırılan K₄ vitaminidir.(Kohlmeier, 2015; Ravisankar ve diğ. 2015; Shearer, 1995).



Fillokinon (K₁ Vitamini)



Menakinon (K₂ Vitamini)



Menadion (K₃ Vitamini)

Şekil 2.4: K vitamininin formları.

K vitamini vücutta önemli fonksiyonlara sahiptir ve bunların bazıları yeni keşfedilmiştir. Bu bileşikler, kanın pıhtılaşmasında yer alan çeşitli proteinlerin fonksiyonu ve karaciğerde protrombin sentezi için gerekli olan bir bileşiktir. K-Vit, kanın pıhtılaşmasını kolaylaştırarak aşırı kanamanın önlenmesinde rol oynamaktadır. K-Vit bağımlı proteinler ve diğer kalsiyum kompleksleştirici proteinler, yumuşak dokuların, özellikle damar duvarının kireçlenmesini baskılayarak doku mineralizasyonunun düzenlenmesinde rol alır. Ayrıca hücre bölünmesi ve farklılaşmasının düzenlenmesini destekler (Dinicolantonio ve diğ. 2015; Kohlmeier, 2015; Shearer, 1995).

Koyu yeşil sebzelerde büyük miktarda fillokinon (K1) bulunur. K-Vit bakımından zengin yiyecekler; pazı (8,3 µg/g), lahana (7 µg/g), yeşil kuşkonmaz (4 µg/g), ıspanak (3,8 µg/g), brokoli (2,7 µg/g) ve Brüksel lahanasıdır (1,5 µg/g). Soya yağı (1,5 µg/g), kanola yağı (1,1 µg/g) ve sızma zeytinyağı (0,8 µg/g) da önemli ölçüde katkıda bulunabilir. Japonya'nın bazı bölgelerinde yaygın olarak tüketilen fermente soya peyniri Natto, çok zengin bir menakinon kaynağıdır (9 µg/g). Bazı peynirler de az da olsa (örneğin, yaklaşık 0,3 µg/g ile Rokfor), menakinon sağlamaktadır.

K-Vit pek çok besin kaynağında yaygın şekilde bulunduğu ve ayrıca bağırsak bakterileri tarafından endojen olarak sentezlendiği için eksikliği oldukça nadirdir. Absorpsiyonu safra tuzlarının yeterliliğine bağlı olduğu için safra salgılanmasını bozabilecek herhangi bir karaciğer hastalığının bu vitamin eksikliğine neden olma olasılığı daha fazladır. K-Vit eksikliğinden kaynaklanan primer hastalık, kanın pıhtılaşma gücünün kaybı nedeniyle artan kanama riski ile karakteriz edilen hipoprotrombinemidir. K-Vit eksikliğinin en önemli belirtileri kanın pıhtılaşmasının çok yavaş olması ve dolayısıyla küçük yaralanmalarda bile uzun süre kanama olmasıdır. Antibiyotiklerin, sürekli olarak alımı bazı yetişkinlerde kanamaya neden olabilir. Yetersiz alımı damar kalsifikasyonuna ve osteoporoza neden olmaktadır. Ayrıca yeni doğanlarda bağırsak florası gelişmediğinden K-Vit sentezi yoktur buna bağlı olarak K-Vit eksikliği sonucu kanamalar görülebilir.

Memeli bakteriyel bağırsak florasında üretilen K₂ vitamini optimal koşullar altında kanamayı önlemek için yeterince K-Vit sağlar ancak bu miktarlarının tüm K vitaminine bağımlı proteinlerin tamamen karboksilasyonunu indüklemek için yeterli olmadığı düşünülmektedir (Dinicolantonio ve diğ. 2015). Buna ilave olarak tüketilen yeşil yapraklı sebzelerin tek bir porsiyonu gerekli olan K-Vit ihtiyacını fazlasıyla sağlamaktadır.

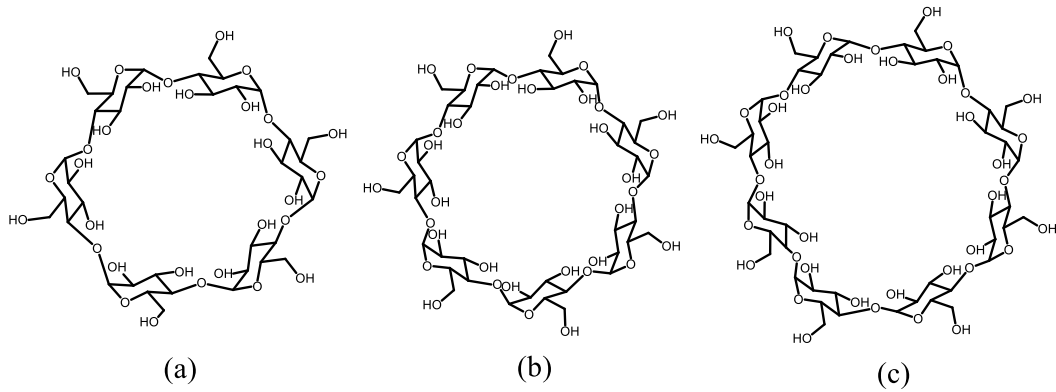
Bir yıl boyunca 45 mg/gün tüketimi sonrası sağlığa zararlı bir etkisi gözlenmemiştir. Doğal olarak hem fillokinon hem de menakinon doğada toksik değildir, ancak K vitamini ve menadionun sentetik formları toksiktir. K-Vit'nin aşırı miktarlarda alımı ise kırmızı kan hücrelerinin bozulmasına ve karaciğer hasarına neden olabilmektedir.

2.2. SIKLODEKSTRİNLER

Siklodekstrinler, molekül başına altı, yedi veya sekiz glikopiranozid biriminin glikozit bağıyla 1. ve 4. C atomlarına bağlanmasıyla oluşan siklik oligosakaritlerdir. Moleküldeki glikopiranozid biriminin sayısına göre altı birimden oluşan α -siklodekstrin, yedi birimden oluşan β -siklodekstrin, sekiz birimden oluşan γ -siklodekstrindir.

Genel olarak, siklodekstrinler hidroksil grupları içeren hidrofilik dış kuyruğa ve hidrofobik bir merkeze sahiptir. D-glikoz birimleri, nispeten hidrofobik boşluğa sahip konik bir yapı oluşturmaktadır. Hidrofobik özelliğe sahip bu kısım glikozid bağlarındaki oksijen atomlarının tek elektronlar ile birleşmesiyle oluşan elektron yoğunluğuna sahip merkezi bir kavite oluşturmaktadır.

Siklodekstrinlerin bu yapısal özellikleri yani polar ve hidrofilik bir dış yüzey ile hidrofobik bir boşluğa sahip olmaları dolayısıyla hidrofobik bileşiklere ev sahipliği yapabilmektedirler. Bunun sonucunda da CD'ler sulu, susuz ve karışım ortamlarında, uygun boyutlarda birçok organik ve inorganik iyon ve moleküller (0,5 ila 0,8 nm çaplı) ile inklüzyon kompleksleri oluşturabilmektedirler. Konak-konuk etkileşimi, iyon veya moleküllerin, kimyasal bağlar oluşmadan ve yapılarını değiştirmeden oligosakaritlerin hidrofobik boşluğunda toplanmasını sağlar. Inklüzyon komplekslerinin oluşumu için kovalent bağ oluşumu gerçekleşmez. Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerle yüksek enerjili bir konformasyondan su moleküllerinin yer değiştirmesi ile daha düşük enerjili bir forma dönüştürülmesine dayanmaktadır (Ferancová ve Labuda, 2001; Garrido ve diğ. 2016).



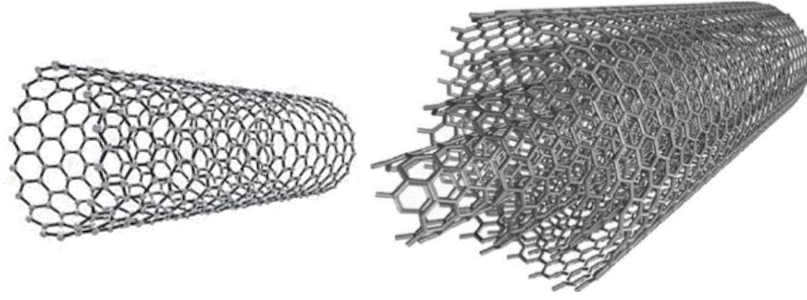
Şekil 2.5: α CD (a), β CD (b), γ CD (c).

CD'lerin inklüzyon kompleksi oluşturma özelliği dolayısıyla ilaç endüstrisinde, gıda teknolojisinde ve tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Özellikle elektrokimyada, çözeltilere eklenen veya elektrot yüzeyine bağlı CD'ler, stereoselektif organik elektrosentez ve elektrokatalitik reaksiyonlar için faydalı değişikliklere neden olabilmektedir. Ayrıca CD'lerin elektroanalitik uygulamalarında, inklüzyon kompleksi oluşumu ile elektrotta analitlerin seçici olarak ön derişiklendirilmesi sağlanabilmektedir. Siklodekstrin (CD)/CNT ile modifiye edilmiş elektrotlarla oluşturulan sensörlerin potansiyel okuma stabilitesini geliştirdiği, elektrotun uzun süreli stabiliteye sahip olduğu ayrıca inklüzyon kompleksleri oluşturarak da pik akımını arttırdığı görülmüştür. β CD'nin MWCNT'ün dispersiyon özelliğini de geliştirmektedir. Bu nedenle, β CD ve MWCNT gibi her iki modifiye edici maddenin sinerjik etkisi nedeniyle çeşitli organik bileşiklerin tayininde sıklıkla kullanılmıştır (He ve diğ. 2006; Kor ve Zarei, 2013; Rahemi ve diğ. 2012; Shen ve Wang, 2009; Z. Wang ve diğ. 2006).

2.3. KARBON NANOTÜP

Yeni bir temel karbon şekli olan karbon nanotüp (CNT), nanometre boyutlarında çapı ve mikrometre uzunluğuyla kapalı ortak merkezli silindir şeklinde sarılmış grafit levhalardan oluşmaktadır. CNT'lerin 1991'de Iijima tarafından keşfedilmesinden bu yana, yüksek elektriksel iletkenlik, kimyasal stabilite, ağırlığının az olması, yüksek ısı iletkenliği, metalikten yarı iletkenliğe kadar değişen yüksek termal iletkenlik ve yüksek mekanik dayanım gibi benzersiz özelliklerinden dolayı malzeme bilimi, fizik ve kimya alanlarında nanoelektronik ve fotovoltajik cihazlar, süper iletkenler, elektromekanik elemanlar, elektrokimyasal kapasitörler, nanoteller ve nanokompozit malzemeler gibi birçok alanda uygulaması bulunmaktadır (He ve diğerleri, 2006; Sahoo ve diğerleri, 2010; Salvatat ve diğerleri, 1999). Nanometre çaplı ve silindirik grafit tabakalarından oluşan CNT'ler tek duvarlı karbon nanotüpler (SWNT'ler) ve çok duvarlı karbon nanotüpler (MWNT'ler) olmak üzere iki ayrı yapı tipinde bulunmaktadır (Şekil 2.5). SWNT'ler tek grafit tabakasının yuvarlanması ile oluşan silindiri içerirken, MWNT, birkaç grafit tabakasının ortak merkezli olarak yuvarlanmasıyla oluşan silindirik yapıdır (Bianco ve diğ. 2005). Mikron boyutundaki grafit fiberlerle karşılaştırıldığında en önemli fark grafit liflerinde bulunmayan bir özellik olan yüksek esneklik ve yüksek mukavemete sahip olmasıdır (Salvatat ve diğerleri, 1999).



Şekil 2.6: SWCNT ve MWCNT'ün yapısı.

CNT'nin modifikasyonu için iki fonksiyonel yaklaşım yaygın olarak kullanılmaktadır. CNT, güçlü asitler kullanılarak oksitlenebilir, böylece karboksilik gruplar üretilirken uzunluklarının azalması sağlanır, bu da sulu çözeltilerde dağılımlarını artırır. Alternatif olarak, CNT dış duvarlarına ve uçlarına ilave reaksiyonlar ile fonksiyonel gruplar eklenebilir (Bianco ve diğ. 2005).

Kullanımı kolay, düşük maliyetli, taşınabilir, hassas ve basit hazırlanabilen elektroanalitik yöntemler büyük önem kazanmıştır. Öte yandan, modifiye edilmemiş elektrotlar ile zayıf seçicilik, yüksek aşırı gerilim, daha az hassasiyet ve güvenilirliğinin az oluşu ile karşı karşıya kalınmaktadır (Jeromiyas ve diğ. 2019). Bu sorunları aşmak ve analitlerin voltametrik cevabını geliştirmek için modifiye elektrotlar hazırlanmaktadır. Karbon nanotüplerin iyi elektronik özellikleri, elektrokimyasal reaksiyonlarda elektrot malzemesi olarak kullanıldığında elektron transfer reaksiyonunu hızlandırması ve büyük yüzey/hacim oranına sahip olması nedeniyle yeni elektrokimyasal sensörlerde elektrot yüzey modifikasyonunda ve elektrokatalitik malzemelerin tasarımında kullanılmaktadır (He ve diğ. 2006; Jeromiyas ve diğ. 2019; Silva ve diğ. 2019). CNT elektrokatalitik aktivitesinin, polimerler, enzimler veya makromoleküller gibi diğer bileşiklerin bilinen avantajları ile birleştirilmesi, elektroanalitik zorlukların çözümü için önemli bir yol olmuştur (Rahemi ve diğ. 2012, 2013).

2.4. LİTERATÜRDEKİ YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN TAYİNİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Yüksek hassasiyet ve doğru miktarın tayini nedeniyle çeşitli matrislerdeki yağda çözünen vitaminlerin tayin edilmesinde en yaygın olarak HPLC yöntemi kullanılmıştır.

Moreno ve diğ. (2000) yaptığı çalışmada multi-vitamin farmasötik formülasyonlarda suda çözünen vitaminlerin (tiamin hidroklorür, piridoksin hidroklorür, nikotinamid, riboflavin fosforik ester ve siyanocobalamin) ve yağda çözünen vitaminlerin (retinol palmitat kolekalsiferol, α -tokoferol asetat) belirlenmesi için ters-faz HPLC ile bir yöntem geliştirmişlerdir. Örnek uygulamasında, yağda çözünen vitaminler C₁₈ AR kartuşları ile katı faz ekstraksiyonu yöntemi ile sorbent üzerinde tutularak suda çözünen vitaminlerden ayrılmıştır. Daha sonra suda çözünen vitaminler, HPLC ile bir Nova-Pack C₁₈ analitik kolonu üzerinde mobil faz olarak CH₃OH-0,05 M CH₃ COONH₄ kullanarak analiz etmişlerdir. Yağda çözünen vitaminlerin kromatografik analizini, C₁₈ sorbentinden metanol ve kloroform ile yapılan ardışık elüsyonundan sonra gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz olarak izokratik modda 2 ml dak⁻¹ akış hızında MeOH-CH₃CN (95: 5, v / v) kullanmışlardır. Yapılan çalışmada D₃ Vitamininin lineer aralığı 0,16-1,30 mgL⁻¹ LOD ise 0.05 mgL⁻¹, E vitamininin 10.15- 81.20 mgL⁻¹, LOD değeri 3,09 mgL⁻¹, A vitamininin 4,94 mgL⁻¹, LOD değeri 5,00 mgL⁻¹ olarak bulunmuştur. (Moreno ve Salvadó, 2000).

Casal ve diğ. (2001) insanların beslenme yoluyla vitaminleri alması sonucunda yağ dokusunda bulunan yağda çözünen vitaminlerin doğru ve kısa analiz süresi içinde değerlendirilmesi için kromatografik bir yöntem açıklanmıştır. Yağ dokusu etanol ile deproteinize edilerek n-hekzan ile ekstre edilmiştir. Normal faz HPLC ile Lichrosorb Si60 kolonunda 1 ml/dakika akış hızında n-hekzan-2-propanol karışım çözeltisinde yapılmıştır. α -tokoferol tayini floresans detektörü ile retinol ve β -karoten tayinini ise PDA dedektörü kullanarak gerçekleştirilmiştir. Metot valide edilerek toplam 140 denekte insan yağ dokusuna uygulanmış, ortalama retinol, β -karoten ve α -tokoferol içeriklerini sırasıyla 0,43, 0,84, 240,3 mg/g olarak bulunmuştur.

Escrivá ve diğ. (2002) süt ve süt ürünlerinde (margarin, peynir, yoğurt) yağda çözünen vitaminlerin (retinol ve α -tokoferol) eş zamanlı tayini için kromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir. Örneklerin analizi öncesinde sabunlaştırma işlemleri 80°C'de %50 (w/v) KOH ile gerçekleştirilmiş ve vitaminlerin yükseltgenmesini önlemek için antioksidan olarak askorbik asit eklenmiştir. Sabunlaşma sonrası ekstraksiyonu dietil eter ile gerçekleştirmişlerdir. C₁₈ kolonunda mobil faz olarak metanol-su (94:6, v/v) karışımı ile ters faz sıvı kromatografisi ile analiz etmişlerdir. Yöntemin dedeksiyon limiti sırasıyla retinol ve α -tokoferol için 0,19 μ g /100 g ve 8,33 μ g/100 g), yöntemin kesinliği retinol ve α -tokoferol

için sırasıyla RSD %5,24 ve % 6.99, geri kazanım değerleri sırasıyla retinol ve α -tokoferol için %95,6 ve % 96,5 olarak bulunmuştur (Escrivá ve diğ. 2002).

Gimeno ve diğ. (2000) bitkisel yağlarda tokoferollerin (α , β , γ ve δ) doğrudan tayini için UV dedektörlü ters faz-HPLC kullanılarak bir yöntem geliştirmişlerdir. Tokoferollerin tayininde gerçek örnek uygulamasını ekstraksiyon işlemi yapmadan yağın (zeytinyağı veya soya fasulyesi yağı) uygun miktarını alarak heksan içinde seyreltmış ve etanol ile karıştırarak yapmışlardır. Kromatografik sistem, metanol-su karışımı bir mobil faz ile ODS-2 kolonundan oluşmaktadır. Tokoferoller 292 nm'de enjeksiyondan sonra kısa bir sürede (5 dakikadan daha az) tespit etmişlerdir. Yöntemin kesinliğini (% RSD) 52,69 ve ortalama geri kazanım değerini ise %98,14 olarak bulmuşlardır (Gimeno ve diğ. 2000).

Gomis ve diğ. (2000) sütteki yağda çözünen A, D₂, D₃, E ve K₁-Vit'leri, retinil asetat, retinil palmitat, tokoferol asetat, ergosterol ve 7-dehidrokolesterol'ü ters faz silika mikrokolon ile ayırtmış ve UV dedektörü ile belirlemişlerdir. Geleneksel sıvı kromatografisi yöntemi, yüksek verimlilik ve hassas bir analitik sistem sağlamak için uyarlamışlardır. Vitaminlerin dedeksiyon limitlerini, gradient elüsyonla retinol için 0,02 ng/ml ve E-Vit için 2 ng/ml olarak bulmuşlardır. Bütün vitaminleri 17 dakikadan daha az sürede tayin etmişlerdir. Önerilen yöntem, sütte yağda çözünen vitaminlerin tayinine uygulanmıştır. Süt örneği hekzan ile ekstrakte edilmiş ve metanol-su karışımı ile yıkandıktan sonra azot akımında çözücüsü uçurulmuş ardından metanol-su karışımının uygun miktarı ile çözülerek yöntem uygulanmıştır (Gomis ve diğ. 2000).

Iwase (2000), çalışmasında 50 çeşit bileşik içeren emülsifiye edilmiş besin takviyelerinde eser miktarlarda bulunan D₂ vitamininin (19 ng/g) tayini için katı faz ekstraksiyon yöntemi ve ardından 265 nm'de UV dedektörü kullanılarak HPLC ile tayin etmiştir. Sekiz çeşit kartuş ile karşılaştırıldıktan sonra emülsifiye edilmiş besin takviyeleri için Bond Elut C₁₈ kartuşunu seçmiştir. Katı faz ekstraksiyon kartuşuna örnek çözeltisi uygulamış ve kartuşta tutunan D₂-Vit'i, metanol ile elüe edilerek HPLC ile tayin etmişlerdir. D₂-Vit için kalibrasyon grafiği 0,1-3 ng (200 μ l) aralığında doğrusal olarak bulunmuştur. Standart katkı yöntemiyle D₂-Vit'nin geri kazanımını ise % 80 olarak bulunmuştur. (Iwase, 2000).

Rodrigo ve diğ. (2002) bebek mamalarında α -tokoferol asetat ve α -, δ - ve γ -tokoferollerin eşzamanlı olarak belirlenmesi için floresan detektörü ile n-hekzan-etil asetat (98:2, v/v) mobil

fazın kullanıldığı normal faz HPLC yöntemini önermişlerdir. Lineer aralığı α - tokoferol asetat ve α - tokoferol için 2–16 mg/l, γ - tokoferol 1–5 mg/l ve δ - tokoferol için 0.4–2 mg/ l olarak bulmuşlardır. LOD değerlerini ise α - tokoferol asetat, α - tokoferol, δ - tokoferol ve γ - tokoferol için sırasıyla 3,46, 1,60, 0.16 ve 0,06 ng/50 μ l olarak bulmuşlardır (Rodrigo ve diğ. 2002).

Yağda çözünen A, D₃, E ve K₁-Vit'leri elektrokimyasal aktiviteye sahip olduklarından tekli, ikili veya dördünün eşzamanlı olarak belirlenmesi için elektrokimyasal tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Literatürde yağda çözünen vitaminlerin tümünün eşzamanlı tayinine yönelik voltametrik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar çok az yapılmıştır.

Ziyatdinova ve diğ. (2010) camsı karbon elektrot ile $1,1 \times 10^{-4}$ M SDS, 0,1 M LiClO₄ içeren su-etanol (93:7) ortamında retinol tayini yapmışlardır. Belirtilen koşullarda retinol'ün 790 mV'da bir oksidasyon piki gözlemlenmiştir. Retinol geri dönüşümsüz olarak retinale yükseltgenmiştir. Farklı yüzey aktif maddelerin retinol'ün oksidasyonunun voltametrik özellikleri üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Kalibrasyon grafiği, 29,4-980 μ M konsantrasyon aralığında lineer ve dedeksiyon limiti ise 15 μ M olarak bulunmuştur. Yöntem ilaç, kozmetik ve gıda örneklerine uygulanmıştır (Ziyatdinova ve diğ. 2010).

Cincotto ve diğ. (2014) camsı karbon elektrot kullanılarak organik çözücü/su içinde D₂-Vit (ergokalsiferol) ve D₃-Vit (kolekalsiferol)'nin elektrokimyasal tayinini incelemişlerdir. Organik çözücü/ su karışım oranının, D vitaminlerinin camsı karbon elektrot yüzeyindeki elektro katalitik tepkisinde önemli bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. D₂ ve D₃-Vit için destek elektrolit olarak lityum perklorat ile % 40 etanol /% 60 su karışım çözeltisi kullanarak diferansiyel puls yöntemiyle tayin etmişlerdir. GC elektrot ile D₂ ve D₃ vitaminlerinin lineer aralıkları ve dedeksiyon limitlerini sırasıyla; $1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ M ve $5,0 \times 10^{-6}$ – $5,0 \times 10^{-5}$ M, 0,13 ve 0,118 μ M olarak bulmuşlardır. D-Vit tayinine A, E ve K-Vit'lerinin önemli bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Yöntem ilaç örneklerine uygulanmış ve geri kazanım değerlerini %99-%100 arasında bulmuşlardır (Cincotto ve diğ. 2014).

Filik ve diğ. (2016b) Nafyon/grafen nanokompozit modifiye GCE ile α - tokoferol'ün tayinini gerçekleştirmişlerdir. α -Tokoferol'ün tayini farklı çözücü ortamlarında yapılmıştır. Bu amaçla aseton/ asetat tamponu ve aseton/ iyonik likit çözeltileri kullanılmıştır. α -Tokoferol'ün her iki çözücü karışımında da lineer aralıkları 0,5-90 μ M ve dedeksiyon limitleri ise 0,06 μ M olarak bulmuşlardır. Aseton/ asetat sistemlerinde elde edilen oksidasyon pik akım şiddeti, aseton

/iyonik likit sistemine göre daha fazla bulmuşlardır. Yöntem farklı ilaç ve bitkisel yağ örneklerinde α -tokoferol miktarının belirlenmesinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Filik ve diğ. 2016).

Jaiswal ve diğ. (2001) tarafından karbon pasta elektrot ile döngülü voltametri kullanılarak 0,1 M amonyak içeren yüzey aktif (0,1M) +etanol (%50 (v/v))+su karışımında ve yüzey aktif (0,1 M)+asetonitril (%40 (v/v))+su karışımlarında α -tokoferol tayini incelenmiştir. Katyonik (setil trimetil amonyumbromür (STAB), setil pridinyum klorür (SPC)) yüzey aktif ile anyonik (sodyum dodesil sülfat(SDS)) ve noniyonik (triton X-100 (TX-100)) yapıdaki yüzey aktiflere göre daha iyi sonuçlar bulmuşlardır. Diferansiyel puls voltametri ile belirtilen çözücü karışımlarında ve farklı yüzey aktiflerle lineer aralıkları belirlenmiştir. Etanol+su ve asetonitril+su karışımlarının her ikisinde de farklı yüzey aktiflerle elde edilen lineer aralıkları aynı değerlerde bulmuşlardır. SPC, STAB, SDS, TX-100 için lineer aralıklar her iki çözücü karışımında da sırasıyla 1-200, 2-200, 4-200, 1,5-200 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulmuşlardır. Dedeksiyon limitleri ise etanol+su karışımı için SPC, STAB, SDS, TX-100 ortamında sırasıyla 1,1, 1,3, 2,0, 0,8, asetonitril+su karışımı için SPC, STAB, SDS, TX-100 ortamında sırasıyla 1,1, 1,5, 1,5, 0,6 olarak bulmuşlardır. 0,1M TX-100+%40 asetonitril+su karışımını kullanarak yöntemi çeşitli ilaç örneklerine başarılı bir şekilde uygulamışlardır (Jaiswal ve diğ. 2001).

Li ve diğ. (2006) 1,2-dikloroetan-etanol ortamında bitkisel yağlarda α -tokoferol'ün voltametik davranışını, polipirol modifiye Pt (pP/Pt) elektrot ile incelemişlerdir. DPV kullanılarak α -tokoferol pik akım değerleri 5-300 μM konsantrasyonu aralığında doğrusal olduğu, dedeksiyon limitinin 1,5 μM ve $5,38 \times 10^{-2} \text{ A L mol}^{-1}$ lik bir hassasiyete sahip olduğunu bulmuşlardır. Geliştirilen metot, altı bitkisel yağda tokoferol miktarının belirlenmesine uygulanmış ve sonuçların HPLC metodu ile uyumlu olduğunu bulmuşlardır (Li ve diğ. 2006).

Ly (2008) bu çalışmada, kare dalga sıyırma (SWSV) ve döngüsel voltametri yöntemini kullanarak E vitamininin (dl- α -tokoferol) voltametik tayinini yapmışlardır. Çalışma sensörünü, karbon nanotüp tozunun, DNA (çift sarmallı DNA) ve mineral yağ ile karıştırarak hazırlamışlardır. Bu elektrotla anodik pik akımları, 0,1 M fosfat elektrolit çözeltisinde -0.6 V potansiyel değerinde gözlemlenmişler. Optimize edilmiş sıyırma koşulları altında, 0,5 – 4.0 μgL^{-1} ve 40.0 – 160.0 μgL^{-1} konsantrasyonlarında doğrusal çalışma aralıkları elde etmişlerdir. Dedeksiyon limiti ise 0,056 μgL^{-1} ($1,30 \times 10^{-10} \text{ M}$) olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin,

gıda, ilaç ve diğer imalat sektörlerinde kalite kontrol analizine uygulanabilir olduğunu bulmuşlardır (Ly, 2008).

Michalkiewicz ve diğ. (2004) ilaç örneklerinde α -tokoferol asetatın (α -TOAc) kantitatif tayini için voltametrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Doğrusal tarama (LSV), kare dalga (SWV) ve diferansiyel puls voltametri (DPV) ile platin mikrodisk (MD) elektrot kullanarak CH_3COOH ve $0,1\text{M NaClO}_4$ destek elektrolit ortamında Ag/AgCl referans elektroduna karşı $1,30\text{V}$ potansiyel değerinde oksidasyon piki gözlemlenmiştir. Üç voltametrik yöntem için lineer aralıkları ve dedeksiyon limitleri sırasıyla $0,09\text{-}2,3\text{ mM}$ $9 \times 10^{-5}\text{ M}$ (LSV), $0,06\text{-}2,1\text{ mM}$, $6 \times 10^{-5}\text{ M}$ (SWV), $0,07\text{-}2,2\text{ mM}$, $7 \times 10^{-5}\text{ M}$ (DPV) olarak bulmuşlardır. α -TOAc içeren gerçek örneklerin analizi, doymamış yağ asitleri (gliserin esterleri ile birlikte formüle edilmiş) ve A vitamini (retinol veya β -karoten olarak) gibi ortak katkı maddeleri ve yardımcı maddelerle etkileşime girmediğini belirtmişlerdir (Michalkiewicz ve diğ. 2004).

Sýs ve diğ. (2018) gıda örneklerinde fillokinon (K_1 vitamininin) tayini için camı karbon elektrotla kare dalga sıyırma voltametri yöntemi geliştirmişlerdir. Önerilen yöntemde, $10\text{ mL } \%60$ Asetonitril:su ve K_1 vitamini içeren örnek 400 rpm de 12 dk adsorbe edildikten sonra anodik kare dalga sıyırma voltametri ile $0,1\text{ M HCl}$ 'li ortamda $-0,1\text{+}0,6\text{V}$ potansiyel aralığında ($-0,1\text{ V}$ biriktirme potansiyeli, 60 s biriktirme süresi, 50 Hz frekans ve 30 mV kare dalga genliğinde) elektrokimyasal olarak tayini yapılmıştır. Fillokinon için $1,0 \times 10^{-8}\text{-}1,0 \times 10^{-6}\text{ M}$ ve $5,0 \times 10^{-6}\text{-}1,0 \times 10^{-4}\text{ M}$ olmak üzere iki lineer aralık belirlemişlerdir. Dedeksiyon limitleri ise sırayla $8,9 \times 10^{-9}$ ve $5,1 \times 10^{-8}\text{ M}$ olarak bulmuşlardır. Yöntem zeytinyağı ve gıda takviyelerine uygulanmıştır (Sýs ve diğ. 2018).

Sýs ve diğ. (2016) çalışmalarında, adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametri (Ad-SDPV) ile lipofilik vitaminlerin eşzamanlı elektrokimyasal tayinini yapmışlardır. Lipofilik vitaminlerden retinol (A_1 Vit), kolekalsiferol (D_3 Vit), α -tokoferol (E Vit) ve fillokinonu (K_1 Vit) seçmişlerdir. Tüm elektrokimyasal ölçümleri, analitlerin lipofilik karakterinden dolayı adsorptif sıyırma voltametri ile iki aşamada gerçekleştirilmiş ilk adımda GC elektrot her bir vitamin ayrı ayrı $50,0\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ içeren sulu asetonitril çözeltisine ($\%50$, v/v) daldırılarak elektrot yüzeyinde lipofilik vitaminlerin 10 dakika süreyle 400 rpm 'de karıştırılarak birikimi yapılmış. İkinci adımda elektrot yüzeyinde biriktirilen lipofilik vitaminlerin $0,01\text{ mol L}^{-1}$ pH $4,5$ asetat tamponunda 5 mV basamak potansiyelinde, 50 mVs^{-1} tarama hızında CV ile tekrarlı beş döngü alınarak elektrokimyasal davranışlarını incelemişlerdir. Benzer şekilde CV ile

biriktirilen vitaminlere (100 μM vitamin içeren %25 ACN ortamında 10 dk 400 rpm'de) $E_{\text{dep}} - 0,6 \text{ V}$ 120 s, adım potansiyeli 5 mV potansiyel genliği 25 mV, aralık süresi (t) 0.1 s ve 50 mVs^{-1} tarama hızında (v) 0,01 mol L^{-1} pH 4,5 asetat tamponunda DPV'si uygulamışlardır. Biriktirme sonrası döngülü voltametri de A ve D_3 vitamininin ilk döngüde sırasıyla 0,708 V ve +1,032 V da bir oksidasyon piki verdiği bulunmuştur. K_1 vitamininin de ise $-0,325$ ve $-0,006 \text{ V}$ potansiyelinde olmak üzere iki tane geri dönüşümlü oksidasyon piki bulmuşlardır (Sýs ve diğ. 2016).

Ziyatdinova ve diğ. (2012) α -tokoferol ve retinolün voltametrik tayini için MWCNT modifiye grafit elektrot (MWNT-GE) hazırlamışlardır. α -tokoferol ve retinol'ün oksidasyonu 0,1 M HClO_4 içeren asetonitril ortamında yalın GE ve MWNT elektrot ile incelenmiş. MWNT-GE ile, α -tokoferol ve retinol için oksidasyon pik değerleri modifiye edilmemiş elektrotla kıyaslandığında pik potansiyelleri α -tokoferol için 0,2 V ve retinol için 0,04 V daha düşük potansiyelde gözlemlenmiş ayrıca pik akım değerleri de yalın elektroda göre önemli ölçüde artmıştır. Kalibrasyon grafikleri α -tokoferol için 0,065-2,00 mM ve retinol için 0,05-0,50 mM aralıkta doğrusal, dedeksiyon limitleri ise sırasıyla α -tokoferol ve retinol için 0,05 ve 0,04 mM olarak bulunmuştur (Ziyatdinova ve diğ. 2012).

Filik ve diğ. (2016a) poli(2,2'-(1,4-fenilendivinilen)-bis-8-hidroksikinaldin)/çok duvarlı karbon nanotüp modifiye GC elektrot kullanılarak α -tokoferol (E-Vit) ve retinolün (A-Vit) eşzamanlı elektrokimyasal tayini için yöntem geliştirilmiştir. Basit ve hızlı voltametrik yöntem, sulu ortamda analitlerin çözünürlüğünü sağlamak için TX-100 kullanılarak pH 5 $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaCH}_3\text{COO}$ tamponu ortamında gerçekleştirilmiştir. α -Tokoferol'ün, 80 μM retinol varlığında lineer aralığı 8–100 μM olarak belirlenmiş ve dedeksiyon limiti 0,1 μM olarak bulunmuştur. Retinol'ün, 40 μM α -tokoferol varlığında lineer aralığı 5 – 200 μM ve dedeksiyon limiti 0,8 μM olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem ilaç örneklerinde retinol ve α -tokoferol'ün belirlenmesinde kullanılmıştır (Filik ve diğ. 2016).

Filik ve diğ. (2017) poli(Alizarin kırmızısı S)/çok duvarlı karbon nanotüp (p(ARS) / MWCNT) modifiye camı karbon elektrot kullanarak K_1 -Vit ve D_3 -Vit'nin eş zamanlı tayinini 1,5 M amonyum asetat ve %0,05 SDS ile sulu ortamda gerçekleştirmişlerdir. K_1 -Vit'nin 80 μM D_3 Vitamini varlığında lineer aralığı 0,5-80 μM , dedeksiyon limiti 0,06 μM , D_3 -Vit'nin 10 μM K_1 -Vit varlığında lineer aralığı 8-160 μM , dedeksiyon limiti ise 5 μM

olarak belirlenmiştir. Yöntemin uygulanabilirliği ıspanak ve süt örneğinde K₁ Vitamini ve D₃ Vitamini tayini yapılarak doğrulanmıştır (Filik ve Avan, 2017).

Men ve diğ. (2017) AuPd bimetallik nanokristalleri camı karbon elektrot yüzeyine modifiye ederek D₂ ve D₃ vitaminin'in ayrı ayrı tayininde kullanmışlardır. LiClO₄'lı ortamda etanol/su (%40/%60) karışımında D₂ ve D₃-Vit'nin DPV ile elde edilen voltamogramlarından lineer aralıkları sırasıyla 1-10µM (LOD 0,05µM) ve 5-50µM (LOD 0,18µM) olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemi ilaç örneklerine uygulamışlardır (Men ve diğ. 2017).

Thangphatthanarungruang ve diğ. (2018) tarafından yapılan çalışmada, yüzey baskılı grafen / nafyon elektrot (SPGNE) kullanılarak A, D, E, K-Vit'lerinin eş zamanlı tayini için elektrokimyasal bir sensör önerilmiştir. Yağda çözünen vitaminlerin elektrokimyasal davranışları, kare dalga voltametri (SWV) kullanılarak % 60 etanol ve % 40 0,1 M sodyum perklorat karışımında incelenmiştir. Yağda çözünen vitaminlerin oksidasyon piklerinin farklı potansiyellerde ortaya çıktığını ve aynı anda tayininin mümkün olduğunu göstermişlerdir. Optimum koşullar altında, vitaminlerin konsantrasyonları ile oksidasyon pik akımları arasında lineerlik, A vitamini için 0,1- 5 µg/mL, D ve E vitaminleri için 0,08- 5 µg mL⁻¹ ve K vitamini için 0,2 – 1,6 µg/mL arasında ve dedeksiyon limitleri ise sırasıyla, 0,018; 0,013; 0,012 ve 0,004 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen sensörün, gıda takviyelerinde yağda çözünen vitaminlerin eş zamanlı tayininde kullanılabilir olduğu bulunmuştur (Thangphatthanarungruang ve diğ. 2018).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Denemelerde yapılan tüm elektrokimyasal ölçümlerde karşıt elektrodun Pt tel, referans elektrodun Ag/AgCl, çalışma elektrodunun camısı karbon elektrot ve modifiye (MWCNT ve MWCNT/ β CD) camısı karbon elektrot olduğu üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Çalışmalar Gamry marka Referans 600 potansiyostat/Galvanostat (Gamry, USA) ile gerçekleştirildi.

Çözeltilerin hazırlanması aşamasında kimyasal maddelerin tartımında Radwag AS-220/C/2 hassas analitik terazi, pH ölçümlerinde HANNA/HI-221 pH metre, kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Elmasonic ultrasonik banyo, ısıtma ve karıştırmalarda Wisd MSH-20A manyetik karıştırıcı ısıtıcı, destile su eldesinde GFL/2008 su sistemi kullanıldı.

FEI-QUANTA FEG/450 SEM cihazı kullanılarak taramalı elektron mikroskobu görüntüleri elde edildi.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

5×10^{-3} M A Vitamini (Retinol) (Sigma), 5×10^{-3} M K₁ Vitamini (fillokinon) (Alfa Aesar), 5×10^{-3} M D₃ Vitamini (kolekalsiferol) (Alfa Aesar) ve 5×10^{-3} M E Vitamini'nin (α -tokoferol) (Sigma) stok çözeltileri tartılan uygun miktarlarının etanol ile seyreltilmesiyle hazırlandı ve ışık alması engellenecek şekilde saklandı.

%0,1 ile %2 (w/v) konsantrasyon aralığında β -Siklodekstrin hidrat (Sigma) çözeltileri uygun miktarlarının tartılarak destile su ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

%2 (w/v)'lik stok Triton X-100 (Merck) çözeltisi 1 g'ının tartılarak sıcak destile suda çözülüp 50 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. %2 (w/v)'lik stok SDS (Merck) ve %2 (w/v)'lik stok STAB (sigma)'ın uygun miktarları destile su ile çözülerek hazırlandı.

0,1 M BR Tamponu hazırlamak için, borik asit (Merck), fosforik asit (Sigma-Aldrich) ve asetik asit (Sigma-Aldrich)'in uygun miktarları alınarak karıştırıldı ve destile suyla hacmi tamamlandı. 1 M NaOH ile ayarlayarak pH 2-8 arasında tampon çözeltiler hazırlandı.

%50 (w/v) KOH çözeltisi (Sigma-Aldrich) 50 g KOH'in tartılarak destile su ile 100 mL'ye seyreltilmesiyle hazırlandı.

%1,5 (w/v) Askorbik asit çözeltisi uygun miktarının tartılarak etanolde çözünmesiyle günlük olarak hazırlandı.

3.2.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp'ün Hazırlanması

MWCNT'lere (saflık>95% D×L 6.9× 5 µm, Aldrich), kullanılmadan önce asit ile ön temizleme işlemi yapılmaktadır. Bu da özellikle artık metal katalizör partiküllerinin nanotüplerden elimine edilerek MWCNT'lerin saflaştırılması için gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, asitle yapılan ön temizleme işlemi ile MWCNT'lerin yüzeyi değiştirilerek MWCNT ile redoks araçlarının arasındaki ara yüzeye bağlanması arttırılabilmektedir (Shobha Jeykumari, Ramaprabhu ve Sriman Narayanan, 2007). Bu amaçla kullanımdan önce MWCNT, ilk olarak 3:1 derişik H₂SO₄ ve HNO₃ (40 mL) karışımı ile 3 saat 40°C'de ultrasonik banyoda muamele edilerek temizlendi ve karboksilik asit grupları oluşturularak fonksiyonalize edildi.

Sonrasında 200 mL destile su içerisine alınarak süzöldü ve nötralleşene kadar destile su ile yıkandı. Elde edilen süzöntü 80°C'de 4 saat boyunca etüvde kurutularak kullanıldı (Ramanathan ve diğ. 2005).

3.2.3. Örneklerin Hazırlanması

Geliştirilen yöntem vitamin katkılı devam sütü, vitamin suyu ve ilaç örneklerinde yağda çözünen vitaminlerin tayinine uygulanmıştır. Hayvansal kaynaklı gıdalarda yağda çözünen vitaminler lipit tabakalarında bulunmaktadır. Bu amaçla istenmeyen lipidleri uzaklaştırmak için soğuk sabunlaşma işlemi yapılmıştır.

Sabunlaşma ve ekstraksiyon, vitamin analizinde önemli bir aşamadır. Vitaminlerin ışık, oksijen, ısı, alkaliler ve asitlere karşı kimyasal kararsızlığı, gıda numunelerinde farklı ve/veya düşük konsantrasyon seviyelerinde bulunabilmeleri ve matris karmaşıklığı gibi etkenler

ekstraksiyon aşamasında zorluklara neden olmaktadır. Tablo 3.1’de, analiz sırasında önemli kayıpları önlemek için kontrol altında tutulması gereken temel parametreler ve alınması gereken önlemler listelenmiştir (Fanali ve diğ. 2017).

Tablo 3.1: Yağda çözünen vitaminlerin stabiliteelerine etki eden faktörler.

Vitamin	Etkileyen parametreler ve stabiliteeleri	Alınması gereken önlemler
A	Işığa, oksijene ve asitlere karşı duyarlıdır.	Koyu renkli cam malzemelerde ve az ışıklı ortamlarda çalışmak.
D	Işığa, oksijene ve asitlere karşı duyarlıdır. Isıtıldığında izomerize olabilir. Alkali ortamda stabildir.	Santrifüj tüplerini alüminyum folyo ile sarmak. Ekstraksiyon aşamasında veya standartların hazırlanmasında kullanılan çözücülere uygun bir antioksidan eklenmesi (bu önlem K vitamini için geçerli değildir).
E	Işığa ve oksijene karşı duyarlıdır. Işık ve oksijenden korunduğunda alkali ortamda stabildir.	
K	UV ışığa, asit ve alkaliye karşı duyarlıdır. Isı ve oksijene karşı dayanıklıdır.	

Sabunlaştırma aşaması literatürde Gentili ve diğ. (2013) tarafından belirtildiği gibi yapılmıştır. 50 mL’lik bir tüp içerisine 6 mL süt örneği alınarak üzerine % 1,5 (w/v) askorbik asit içeren 18 mL etanol çözeltisi ve 1mL % 50 (w/v) KOH’in sulu çözeltisi ilave edilip N₂ gazı geçirilerek ağzı kapatıldı. Karanlıkta 25°C’de su banyosunda 15 saat sabunlaştırıldı. Sabunlaşma sonrasında 8,5 mL destile su ilave edilerek 18 mL % 0,1 (w/v) AA içeren hekzan ile ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemi iki kez tekrarlandı. Birleştirilen hekzan fazları 12 mL’lik porsiyonlar halinde destile su ile fenol ftalein indikatörlüğünde renk gözlenmeyene kadar yıkandı. Ardından hekzan fazı N₂ akımı altında uzaklaştırıldı ve 0,5 mL etanol ile seyreltilerek uygun miktarları voltametrik çalışma hücrelerine ilave edilerek ölçüm alındı. Dedeksiyon limitinin altında bulunan vitaminler için farklı konsantrasyonlarda katkılar yapıldıktan sonra sabunlaşma işlemi uygulandı.

Vitamin suyu örneğinden 300 mL alınarak 20 mL hekzan ile ekstrakte edildi. Hekzan evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra % 1,5 (w/v) askorbik asit içeren 18 mL etanol çözeltisi ve 1mL % 50 (w/v) KOH’in sulu çözeltisi ilave edilerek süt örneğinin hazırlanmasında anlatıldığı gibi soğuk sabunlaşma işlemi uygulandı.

A, D₃, E ve K₁ vitamini ilaç örneklerinin uygun miktarları karıştırıldıktan sonra % 1,5 (w/v) askorbik asit içeren 18 mL etanol çözeltisi ve 5 mL % 50 (w/v) KOH’in sulu çözeltisi ilave

edilerek süt örneğinin hazırlanmasında anlatıldığı gibi soğuk sabunlaşma işlemi uygulandı. En son elde edilen kalıntı 2 mL etanol ile seyreltilerek uygun hacimlerde alınan örnekler 10 mL lik çalışma hücrelerine ilave edilerek ölçüm alındı.

3.3. YÜZEY MODİFİKASYONU

3.3.1. β -Siklodekstrin Miktarının Optimizasyonu

10 mg fonksiyonize edilmiş MWCNT 5 mL %0,1, %0,2, %0,5, % 1 ve %2'lik β -siklodekstrin çözeltisinde ultrasonik banyoda 2 saat disperse edildi ve GCE yüzeyine 4 μ L damlatılarak 50 mV s⁻¹ tarama hızında %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 10⁻⁴ M A-Vit, 5 \times 10⁻⁵ M D₃-Vit, 2 \times 10⁻⁵ M E-Vit ve 2 \times 10⁻⁵ M K₁-Vit'in döngülü voltamogramları kaydedildi.

3.3.2. MWCNT Miktarının Optimizasyonu

β CD/MWCNT/GCE hazırlanmasında 2 mg/mL MWCNT, %1'lik β CD çözeltisinde disperse edilerek elektrot yüzeyine 2, 3, 4 ve 5 μ L olacak şekilde damlatıldı. Elektrot yüzeyi oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 50 mV s⁻¹ tarama hızında %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 10⁻⁴ M A-Vit, 5 \times 10⁻⁵ M D₃-Vit, 2 \times 10⁻⁵ M E-Vit ve 2 \times 10⁻⁵ M K₁-Vit'in döngülü voltamogramları -0,6 V ile + 1,1 V potansiyel aralığında kaydedildi.

3.3.3. β CD/MWCNT/GCE'nin Hazırlanması

Elektrot modifiye edilmeden önce yüzeyi 0,3 μ m ve 0,05 μ m büyüklüğünde Al₂O₃ partikülleri içeren alümina süspansiyonu ile 5 dakika temizlendi. Elektrot yüzeyindeki Al₂O₃ partiküllerini gidermek için destile su ile yıkandı. Elektrotlar ilk olarak etanol:propanol (1:1) karışımı içerisinde sonrasında da destile su ile ultrasonik banyoda 5 dakika sonike edildi. Kurutulan GC elektrot yüzeyine %1'lik β CD çözeltisinde disperse edilmiş 2 mg/mL MWCNT dispersiyonundan 4 μ L damlatılarak hazırlandı. Oda sıcaklığında kurutulduktan sonra voltametrik çalışmalarda kullanıldı.

3.4. ELEKTROT YÜZEYİNİN ELEKTROKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Modifiye elektrodun yüzey karakterizasyonu elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve döngülü voltametri kullanılarak yapılmıştır.

Döngülü voltametri tekniğinde yalın ve modifiye elektrotların davranışları 0,1 M KCl ve 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 'den oluşan redoks probu çözeltisinde 50 mV s^{-1} tarama hızında -400 ile 900 mV potansiyel aralığında incelenmiştir.

Ayrıca yalın ve her bir modifiye elektrodun (GCE, $\beta\text{CD}/\text{GCE}$, MWCNT/GCE ve $\beta\text{CD}/\text{MWCNT}/\text{GCE}$) 0,1M KCl içeren destek elektrolit ortamında 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ile $10 - 500 \text{ mVs}^{-1}$ tarama hızı aralığında döngülü voltamogramları yardımıyla modifiye elektrotların yüzey alanı hesaplanmıştır.

Elektrokimyasal emedans spektroskopisinde (EIS) yalın GCE ve $\beta\text{CD}/\text{GCE}$, MWCNT/GCE ile $\beta\text{CD}/\text{MWCNT}/\text{GCE}$ 'un iletkenlik ve elektron aktarım özellikleri 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ ve 0,1 M KCl içeren ortamda 5mV genlikte, 100000 Hz ile 0,01 Hz frekans aralığında incelendi.

3.5. A, D₃, E ve K₁-VİT'LERİNİN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞI

A, D₃, E ve K₁-Vit'lerinin elektrokimyasal davranışları GCE, $\beta\text{CD}/\text{GCE}$, MWCNT/GCE ve $\beta\text{CD}/\text{MWCNT}/\text{GCE}$ yüzeyinde döngülü voltametri ile incelendi. Yalın ve her bir modifiye GCE ile 50 mV s^{-1} tarama hızında -0,6 V ile +1,1 V potansiyel aralığında %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D₃-Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K₁-Vit ile incelendi.

3.6. YÜZEY AKTİF TÜRÜNÜN VE MİKTARININ BELİRLENMESİ

Yağda çözünen vitaminlerin organik çözücü kullanılmadan sulu ortamda tayinini gerçekleştirebilmek amacıyla anyonik, katyonik ve noniyonik yüzey aktif maddeler ile deneme yapıldı. Anyonik SDS, katyonik STAB, noniyonik Triton X-100 (TX-100) kullanıldı.

0,15 M NaCl içeren pH 5 Britton Robinson (BR) Tamponu ortamında 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D₃-Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K₁-Vit'in sulu ortamdaki çözünürlüğünü sağlayabilmek için %0,01; %0,02; %0,04; %0,06 ve %0,08 (w/v) olmak üzere farklı TX-100 konsantrasyonlarının $\beta\text{CD}/\text{MWCNT}/\text{GCE}$ yüzeyinde vitaminlerinin pik akım ve pik

potansiyel değerlerine etkisi 50 mV s^{-1} tarama hızında $-0,6 \text{ V}$ ile $+1,1 \text{ V}$ potansiyel aralığında döngülü voltametri ile incelendi.

Anyonik yüzey aktif SDS konsantrasyonunun yağda çözünen vitaminlerin $\beta\text{CD/MWCNT/GCE}$ yüzeyindeki pik akım değerlerine etkisi %0,01; %0,02; %0,04; %0,06 (w/v) konsantrasyonlarındaki SDS varlığında 50 mV s^{-1} tarama hızında $-0,6 \text{ V}$ ile $+1,1 \text{ V}$ potansiyel aralığında döngülü voltametri ile incelendi.

Farklı yüzey aktif türlerinin etkisi incelendikten sonra yüzey aktif karışımlarının (Triton X-100 ve SDS) etkisi de incelendi.

3.7. NaCl MİKTARININ ETKİSİ

İyonik şiddeti arttırmak amacıyla ortama NaCl eklenerek optimum konsantrasyon denemesi yapıldı. 50 mV s^{-1} tarama hızında 0,02 (w/v) SDS ve %0,01 (w/v) TX-100 içeren pH 5 BR tamponu ortamında $\beta\text{CD/MWCNT/GCE}$ yüzeyinde 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 M arasında NaCl konsantrasyonunun pik akımına etkisi CV ile incelendi.

3.8. OPTİMUM pH'IN BELİRLENMESİ

Her bir analit için optimum pH bulunarak dört vitamin karışımının eş zamanlı tayini için ortak uygun çalışma pH'ı belirlendi. Bu amaçla A-Vit'in (10^{-4} M) pH denemesi $+0,35\text{V}$ ile $+0,95\text{V}$ potansiyel aralığında, D₃-Vit'in ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) $+0,6 \text{ V}$ ile $+1,1 \text{ V}$ potansiyel aralığında, E-Vit'nin ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$) $-0,5\text{V}$ ile $+0,6 \text{ V}$ potansiyel aralığında, K₁-Vit'nin ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$) $-0,7\text{V}$ ile $+0,2 \text{ V}$ potansiyel aralığında tarama yapılarak 50 mV s^{-1} hızda $\beta\text{CD/MWCNT/GCE}$ yüzeyinde 0,02 (w/v) SDS, %0,01 (w/v) TX-100 ve 0,15M NaCl içeren 0,1 M pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; ve 8,0 BR tamponu ortamında CV ile yapıldı.

3.9. TARAMA HIZININ ETKİSİ

$\beta\text{CD/MWCNT/GCE}$ yüzeyinde tarama hızının etkisi $10 - 500 \text{ mV s}^{-1}$ arasında döngülü voltametri ile A-Vit için $+0,5 \text{ V}$ ile $+0,9 \text{ V}$, D₃-Vit için $+0,7 \text{ V}$ ile $+1,1 \text{ V}$, E-Vit için $+0,1 \text{ V}$ ile $+0,8 \text{ V}$, K₁-Vit için $-0,6 \text{ V}$ ile $+0,3 \text{ V}$ potansiyel aralıklarında incelendi.

3.10. KARE DALGA VOLTAMETRİSİ PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ

A, D₃, E ve K₁-Vit'lerinin pik akımları üzerine kare dalga voltametrisinin cihaz parametreleri optimize edildi. -0,6 V ile 1,1 V potansiyel aralığında β CD/MWCNT/GCE yüzeyinde 0,02 (w/v) SDS, %0,01 (w/v) TX-100 ve 0,15M NaCl içeren 0,1 M pH 5,0 BRT ortamında genliğin etkisi 60 mV'tan 200 mV'a kadar, kare dalga frekansının etkisi 2 ile 10 Hz arasında, step size 5 mV'dan 12 mV'a kadar incelenmiştir.

3.11. VİTAMİNLERİN TEK TEK VE EŞ ZAMANLI ANALİTİK PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ

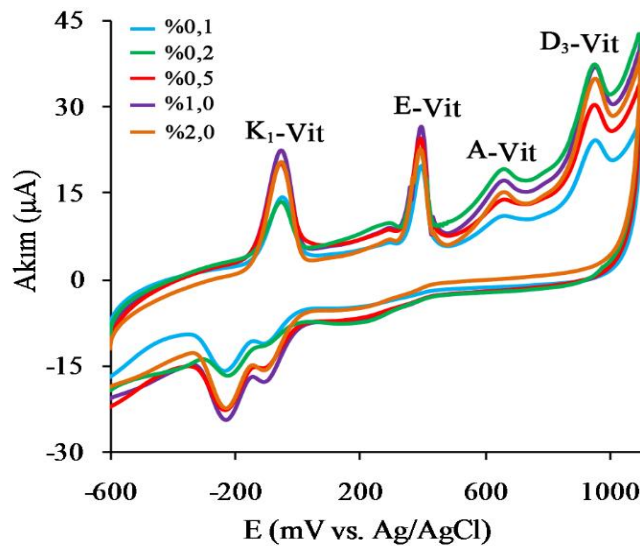
Vitaminlerin tek tek lineer aralıklarının belirlenmesinde β CD/MWCNT/GCE ile %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda A-Vit; 6, 20, 40, 60, 80, 100, 200 μ M, konsantrasyonlarında 0,4 ile 0,8 V potansiyel aralığında, D₃-Vit; 0,5; 4,0; 6,0; 10; 20; 40; 60; 80 μ M konsantrasyonlarında 0,6 ile 1,1 V potansiyel aralığında, E-Vit; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10, 20, 40, 60, 80,100 μ M konsantrasyonlarında 0,15 ile 0,5 V potansiyel aralığında, K₁-Vit; 0,1; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10, 20, 40 μ M konsantrasyonlarında -0,4 ile +0,1 V potansiyel aralığında olacak şekilde SWV (Frekans 3 Hz, basamak yüksekliği 10 mV, genlik 100 mV) ile voltamogramları kaydedildi.

Vitaminlerin lineer aralıklarının eş zamanlı belirlenmesinde birinin konsantrasyonu artırılırken diğer vitaminlerin konsantrasyonları sabit tutularak -0,6 ile +1,1 V potansiyel aralığında SWV ile ölçüm alınmıştır. D₃-Vit (20 μ M), E-Vit (20 μ M) ve K₁-Vit (6 μ M)'in konsantrasyonu sabit tutulup A-Vit'nin; 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ M olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki voltamogramları kaydedilerek A-Vit'nin lineer aralığı, A-Vit (80 μ M), E-Vit (20 μ M) ve K₁-Vit (6 μ M)'in konsantrasyonu sabit tutulup, D₃-Vit'inin; 0,8; 2; 4; 6; 10; 20; 40; 60 μ M olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki voltamogramları kaydedilerek D₃-Vit'nin lineer aralığı, A-Vit (80 μ M), D₃-Vit (20 μ M) ve K₁-Vit (6 μ M) 'in konsantrasyonu sabit tutulup E-Vit'inin; 0,5; 1; 5; 8; 10; 20; 40; 60 μ M olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki voltamogramları kaydedilerek E-Vit'nin lineer aralığı, A-Vit (80 μ M), D₃-Vit (20 μ M) ve E-Vit (20 μ M) 'in konsantrasyonu sabit tutulup K₁-Vit'nin; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 20 μ M olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki voltamogramları kaydedilerek K₁-Vit'nin lineer aralığı elektrokimyasal olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. β -SİKLODEKSTRİN MİKTARININ OPTİMİZASYONU

Bölüm 3.3.1’de belirtilen koşullar altında farklı miktarlardaki β -siklodekstrin içeren MWCNT dispersiyon çözeltilerinin analitlerin pik akımına etkisi incelenmiştir. MWCNT’ler, suda çözünebilir β -siklodekstrine (β CD) ester bağıyla kovalent olarak bağlanmasıyla modifiye edilmiştir (Wang ve diğ. 2012). Elde edilen β CD/MWCNT kompozitleri hem etanolde hem de su ortamında iyi bir dağılma özelliğine sahip olduğu ve çözeltinin birkaç hafta boyunca kararlı olduğu bulunmuştur (Liu ve diğ. 2008). %0,1 den %1’e kadar β CD miktarının artmasıyla birlikte vitaminlerin pik yüksekliklerinin arttığı görülmüştür. %2’de ise elektrot yüzeyindeki tabakanın kalınlaşması ile iletkenliğin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.1). MWCNT’ün dispersiyonu da en iyi şekilde %1’lik β CD çözeltilinde sağlandığından optimum β CD miktarı %1 olarak belirlenmiştir.

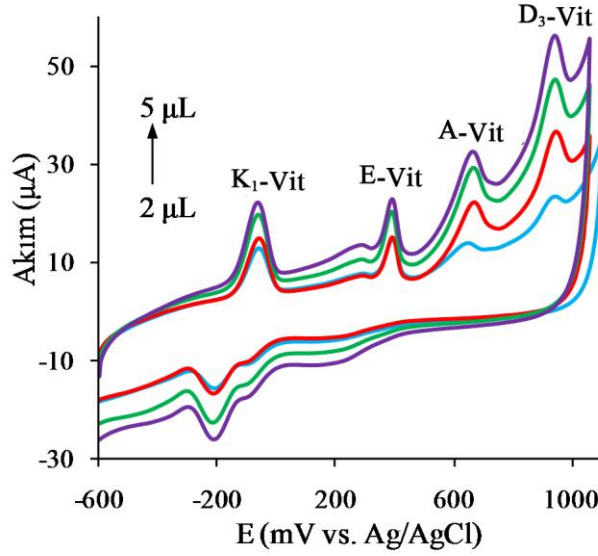


Şekil 4.1: %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda, v : 50 mV s^{-1} , 10^{-4} M A-Vit, $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ D₃-Vit, $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ E-Vit ve $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ K₁-Vit’in %0,1, %0,2, %0,5, %1 ve %2 β CD/MWCNT/GCE ile elde edilen döngü voltamogramları.

4.2. MWCNT MİKTARININ OPTİMİZASYONU

Bölüm 3.3.2.’deki koşullarda elektrot yüzeyinde artan hacimlerde MWCNT miktarı denenmiştir. Elde edilen voltamogramlardan artan β CD/MWCNT hacmiyle birlikte

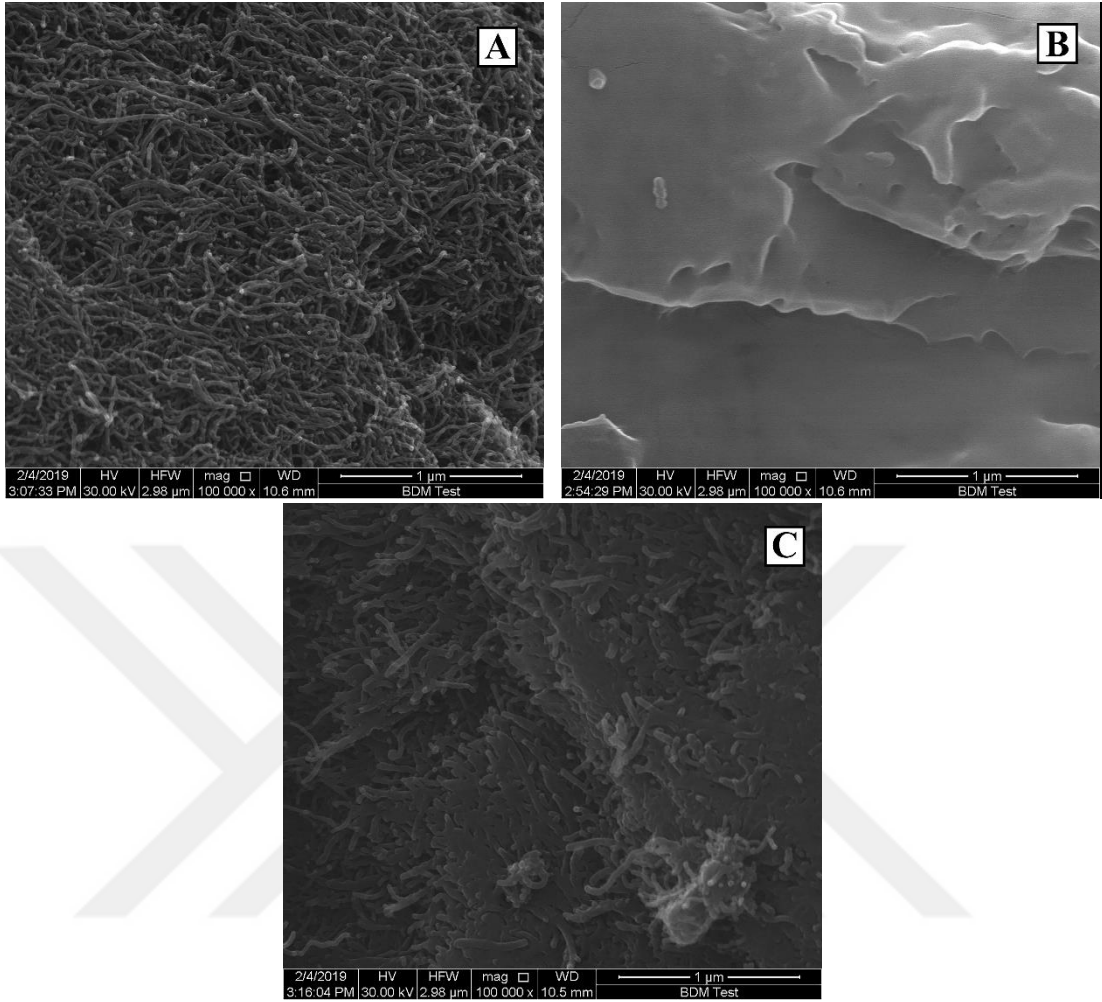
vitaminlerin pik akımlarının arttığı görülmüştür. Ancak 4 μL üzerinde damlatılan dispersiyon çözeltisi vitaminlerin pik akım değerlerinde önemli bir artış göstermediği ve background genişlemesinin fazla olmasıyla birlikte elde edilen voltamogramda piklerin görüntüsü bozulmaya başladığı görülmüştür (Şekil 4.2). Bu nedenle optimum miktar olarak %1'lik βCD içerisinde disperse edilmiş 2 mg/mL MWCNT'ten elektrot yüzeyine 4 μL olacak şekilde damlatılarak ileriki çalışmalarda kullanılmıştır.



Şekil 4.2: %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda, v : 50 mV s^{-1} , 10^{-4} M A-Vit, $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ D₃-Vit, $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ E-Vit ve $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ K₁-Vit'in 2, 3, 4 ve 5 μL 2 mg/mL %1 βCD /MWCNT/GCE ile elde edilen döngülü voltamogramları.

4.3. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU KARAKTERİZASYONU

Farklı modifiye elektrotların morfolojisini karakterize etmek ve karşılaştırmak için taramalı elektron mikroskopisi (SEM) kullanılmıştır. Şekil 4.3'de MWCNT (A), βCD (B) ve βCD /MWCNT (C)'ün SEM görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.3. A'da karbon nanotüplerin tipik tübüler yapısı, Şekil 4.3 (B)'de ise βCD 'nin pürüzsüz yapısı görülmektedir. βCD /MWCNT (Şekil 4.3 C) modifiye elektrodunda ise karbon nanotüplerin pürüzsüz bir matris içinde birbirine dolanmış görüntüsü verilmiştir. SEM görüntüleri MWCNT'ün βCD içerisinde homojen bir şekilde dağıldığını göstermiştir.

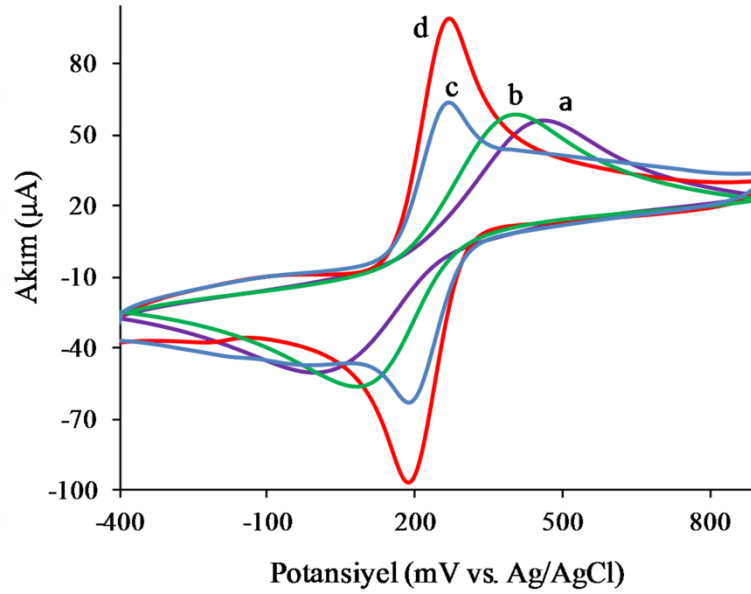


Şekil 4.3: MWCNT(A), βCD(B) ve βCD/MWCNT(C)'ün SEM görüntüleri.

4.4. ELEKTROT YÜZEYİNİN ELEKTROKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Hazırlanan modifiye elektrot ile yalın elektrot yüzeyi arasındaki farklılıkların belirlenmesinde hızlı ve kolay yöntemler olması nedeniyle elektrokimyasal yöntemlerden elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve CV'den yararlanılmıştır.

Bölüm 3.4'de belirtilen koşullarda redoks probu ile yalın GCE (a) βCD/GCE (b), MWCNT/GCE (c) ve βCD/MWCNT/GCE (d), elde edilen voltamogramlar Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4: 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ün 0,1 M KCl ortamında yalın GCE (a), β -CD/GCE (b) MWCNT/GCE (c) ve β CD/MWCNT/GCE (d) deki döngülü voltamogramları. v : 50 mV s^{-1} .

Tablo 4.1’de redoks probu ile elde edilen oksidasyon ve redüksiyon pik akım değerleri ile pik potansiyel değerleri özetlenmiştir. Tablo 4.1’de de görüldüğü gibi GCE için pik potansiyel ayrımı (ΔE) 463,53 mV iken β CD/MWCNT/GCE için pik potansiyel ayrımı 79,9 mV’a düşmüş ve pik akım değerleri de artmıştır. Bu farklılık bize modifiye elektrot yüzeyinde elektron transfer hızının arttığını göstermektedir. Ayrıca β CD/MWCNT/GCE i_p^k / i_p^a ’nın 1’e yakın olması da elektrot yüzeyindeki tersinirliğin ve elektron aktarım hızının daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.1: GCE, β CD/GCE, MWCNT/GCE ve β CD/MWCNT/GCE’nin redoks probu ile bulunan anodik/katodik pik akım değerleri ve pik potansiyel değerleri.

	Anodik		Katodik		I_p^k / I_p^a	ΔE (mV)
	I (μA)	E (mV)	I (μA)	E (mV)		
GCE	47,22	459,9	-39,43	-3,629	0,83	463,53
β CD/GCE	54,36	403,7	-51,04	84,08	0,93	319,62
MWCNT/GCE	63,28	268,2	-61,81	188,3	0,97	79,9
β CD/MWCNT/GCE	98,45	268,2	-97,44	188,3	0,99	79,9

Yalın elektrodun modifiye edilmesi sonucu yüzey alanındaki artış döngülü voltametri tekniği kullanılarak araştırılmıştır. GCE, β CD/GCE, MWCNT/GCE ve β CD/MWCNT/GCE’nin

0,1M KCl içeren destek elektrolit ortamında 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ile 10- 500 mVs^{-1} tarama hızı aralığında döngülü voltamogramları alınmıştır. Buradan elde edilen $I(\text{A})-v^{1/2}$ grafiği yardımıyla Randles-Sevcik eşitliğinden modifiye elektrotların yüzey alanı hesaplanmıştır.

$$I_p = 2,69 \times 10^5 \text{ A} \times D^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} C$$

I_p = pik akımı (A), A = elektroaktif yüzey alanı (cm^2), D =Diffüzyon katsayısı [$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözültisinin difüzyon katsayısı ($6,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)], n =elektron transfer sayısı, v =tarama hızı (V s^{-1}), C = konsantrasyon (mol cm^{-3}) $\{\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}\}$

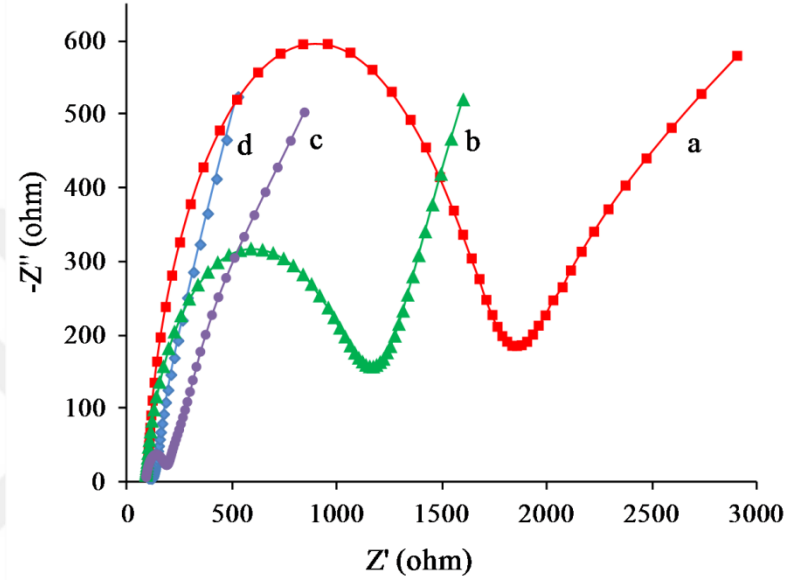
Tablo 4.2'de tarama hızı denemesi sonucunda GCE, $\beta\text{CD}/\text{GCE}$, MWCNT/GCE ve $\beta\text{CD}/\text{MWCNT}/\text{GCE}$ için hesaplanan yüzey alanları verilmiştir. $\beta\text{CD}/\text{MWCNT}/\text{GCE}$ için hesaplanan yüzey alanı yalın GCE ve diğer modifiye elektrotlara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, elektrodun modifiye edilmesiyle birlikte elektroaktif yüzey alanının arttığını göstermektedir. MWCNT 'lerin geniş yüzey alanına, daha fazla miktarda βCD 'nin kaplanması sensörün yüzey alanının daha da artmasına neden olmuştur.

Tablo 4.2: Elektrotların Randles-Sevcik eşitliğinden hesaplanan yüzey alanları.

Elektrot	Yüzey Alanı (cm^2)
GCE	0,0299±0,0034
$\beta\text{CD}/\text{GCE}$	0,0597±0,0021
MWCNT/GCE	0,0896±0,00096
$\beta\text{CD}/\text{MWCNT}/\text{GCE}$	0,2090±0,0012

Elektrot yüzeyinin karakterizasyonunda kullanılan bir diğer yöntem ise elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemidir. Bölüm 3.4'te belirtilen koşullarda her bir elektrodun empedans spektrumları sonucu Nyquist grafikleri elde edilmiştir. Nyquist grafikleri doğrusal ve yarım daire şeklinde olan iki kısımdan oluşmaktadır. Difüzyon kontrollü süreci düşük frekanslarda gerçekleşen doğrusal bölüm ifade ederken, elektron transferiyle sınırlı süreci ise yüksek frekanslarda meydana gelen yarım daire kısmı ifade etmektedir. Nyquist eğrilerinde, yarım dairenin çapının artması elektrot yüzeyindeki elektron aktarım hızının yavaş olduğunu göstermektedir. Şekil 4.5'de GCE (a), $\beta\text{CD}/\text{GCE}$ (b), MWCNT/GCE (c) ve $\beta\text{CD}/\text{MWCNT}/\text{GCE}$ (d), EIS sonucunda elde edilen Nyquist grafikleri görülmektedir. Şekil

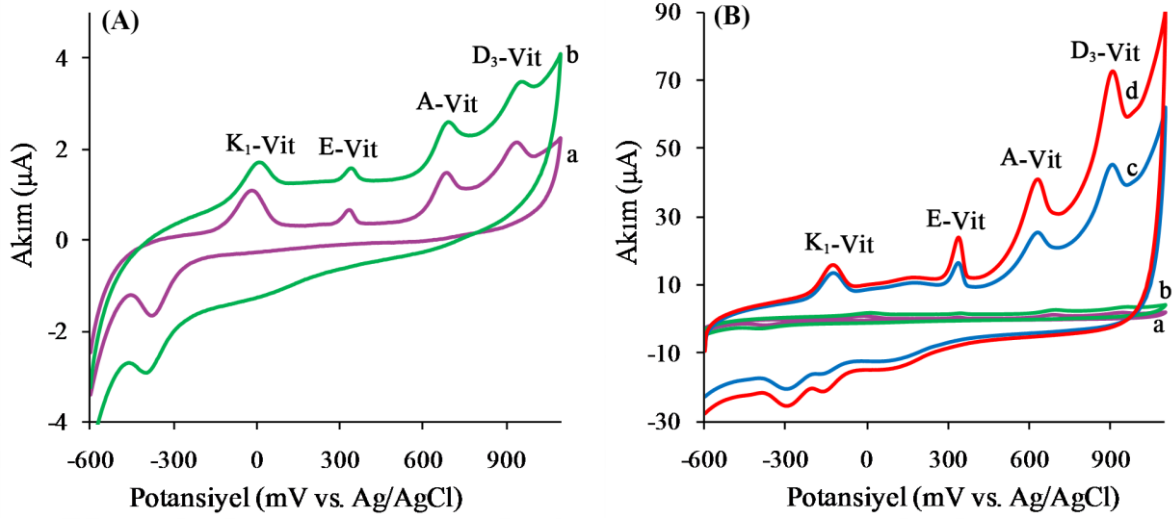
4.5 (a)'da yüksek frekanslarda iyi tanımlanmış bir yarım daire ve düşük frekanslarda doğrusal bölüm gözlenmiştir ($R_{ct}= 1838$ ohm). Yüzeğe β CD, MWCNT ve β CD/MWCNT modifiye edildiğinde R_{ct} değerlerinin düştüğü (sırasıyla $R_{ct}= 1201$ ohm, 188,7 ohm, 115,2 ohm) elektrot ve çözelti ara yüzeyinde elektron transferini arttıran iletken tabakaların oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.5: Yalın GCE (a), β CD/GCE (b) MWCNT/GCE (c) ve β CD/MWCNT/GCE (d) 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ (1:1) ve 0,1 mol L^{-1} KCl içeren çözelti ortamında elektrokimyasal empedans spektroskopisi, genlik 5mV; frekans aralığı:100000 Hz - 0.01 Hz.

4.5. A, D₃, E VE K₁-VİT'İN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞI

A, D₃, E ve K₁-Vit'lerinin döngülü voltametri ile elektrokimyasal davranışları incelendi. Şekil. 4.6'daki voltamogramda yalın GCE (a), β CD/GCE (b), MWCNT/GCE (c) ve β CD/MWCNT/GCE yüzeyinde her dört vitaminin oksidasyon piklerinin belirgin bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. Sonuçların literatürdeki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür (Sýs ve diğ. 2016; Thangphatthanarungruang ve diğ. 2018).



Şekil 4.6: 50mV s⁻¹ tarama hızında %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 10⁻⁴M A-Vit, 5× 10⁻⁵ M D₃-Vit, 2×10⁻⁵ M E-Vit ve 2×10⁻⁵ M K₁-Vit'in GCE (a), βCD/GCE (b), MWCNT/GCE (c), βCD/MWCNT/GCE (d) döngülü voltamogramları.

K₁-Vit için katodik ve anodik pik (redoks piki) gözlemlenmiştir (Şekil 4.6A ve Şekil 4.6B). Yalın GCE ve βCD/GCE aynı redoks pik akımı (pik akımı oranı I_{pa}/I_{pc} = 1) ve pik potansiyeli ayırımı (ΔE = 0,38 V) bulunmuştur. MWCNT/GCE ve βCD/MWCNT/GCE ile, K₁-Vit'in katodik ve anodik pikleri (akım oranı I_{pa} / I_{pc} = 1) sırasıyla -0,127 V ve -0,292 V da görünmüştür. Pik potansiyel ayırımalarının 0,165 V olması da elektrot sürecinin yarı reversibl olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte βCD/MWCNT/GCE ile elde edilen pik akımının MWCNT/GCE'ye göre iki kat artması elektrokatalitik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

A, D₃, E ve K₁-Vit'in oksidasyon pik potansiyelleri, pH 5'te Ag/AgCl referans elektroda karşı sırasıyla yalın GCE ile 0,68, 0,94, 0,33 ve -0,013 V olarak bulunurken βCD/MWCNT modifiye GCE kullanılarak 0,62, 0,90, 0,30 ve -0,12 V potansiyellerinde iyi bir ayırımla dört pik elde edilmiştir. GCE yüzeyine βCD/MWCNT nanokompoziti modifiye edildiğinde, Şekil 4.6 B (d) 'de pik akım değerleri, yalın GCE (a), βCD /GCE'den (b) (Şekil 4.6. A) ve MWCNT/GCE'den (c) (Şekil 4.6. B) daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen döngülü voltamogramlara göre A, D₃, E ve K₁ vitaminleri için belirlenen pik potansiyeli ve pik akım değerleri Tablo 4.3.'de özetlenmiştir. Kısacası βCD ilavesi pik akım değerlerini daha da arttırmıştır. Ayrıca βCD, MWCNT'ün GCE yüzeyinden ayrılmasını önlemek için bağlayıcı madde olarak da kullanılmıştır. Bu bulgular pik akım şiddetinin artmasının βCD/MWCNT nanokompozitlerinin yağda çözünen vitaminlerin oksidasyonu üzerindeki etkisine bağlı

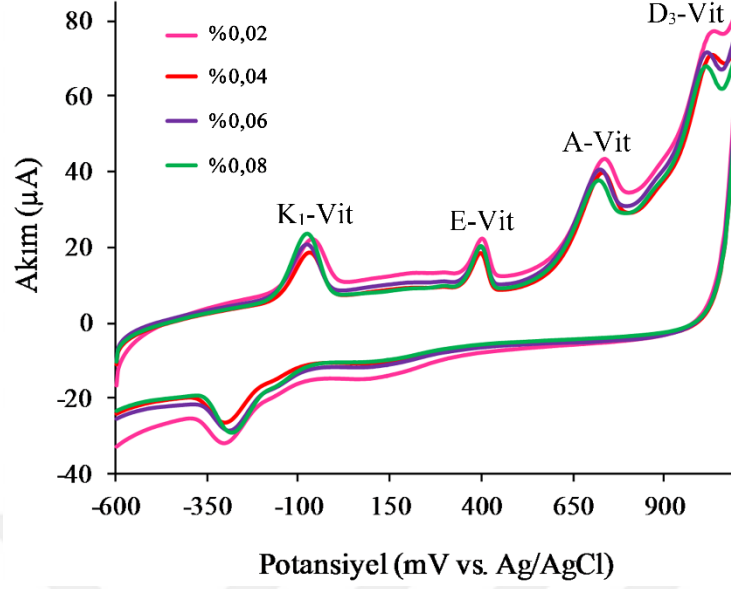
olduğunu doğrulamaktadır. Ek olarak, β CD/MWCNT/GCE pik akımı, yalnız GCE ile bulunandan yaklaşık 8-20 kat daha yüksek olması β CD/MWCNT elektrokatalitik etkisini göstermektedir. K_1 -E-Vit, E-A-Vit ve A- D_3 -Vit için oksidasyon pik potansiyelleri farkı sırasıyla yaklaşık 460 mV, 290 mV ve 376 mV tur. Bu da A, D_3 , E ve K_1 vitaminlerinin aynı anda tayinine imkan vermektedir.

Tablo 4.3: A, D_3 , E ve K_1 -Vit'lerinin yalnız ve modifiye GCE yüzeyinde döngülü voltametri ile belirlenen pik potansiyeli ve pik akım değerleri.

	A-Vit		D_3 -Vit		E-Vit		K_1 -Vit			
	I (μ A)	E (mV)	I (μ A)	E (mV)	I (μ A)	E (mV)	Anodik		Katodik	
							I (μ A)	E (mV)	I (μ A)	E (mV)
(a) GCE	0,77	683,8	0,52	944,1	0,38	334,1	0,84	-12,02	-0,72	-373,6
(b) β CD/GCE	0,79	683,8	0,59	944,1	0,39	333,1	0,77	-11,39	-0,72	-392,6
(c) MWCNT/GCE	10,08	629,6	13,43	903,5	8,21	334,8	4,79	-126,9	-4,87	-292,3
(d) β CD/MWCNT/GCE	19,05	624,2	24,62	900,8	14,56	304,1	8,36	-126,9	-8,27	-292,3

4.6. YÜZEY AKTİF TÜRÜNÜN VE MİKTARININ BELİRLENMESİ

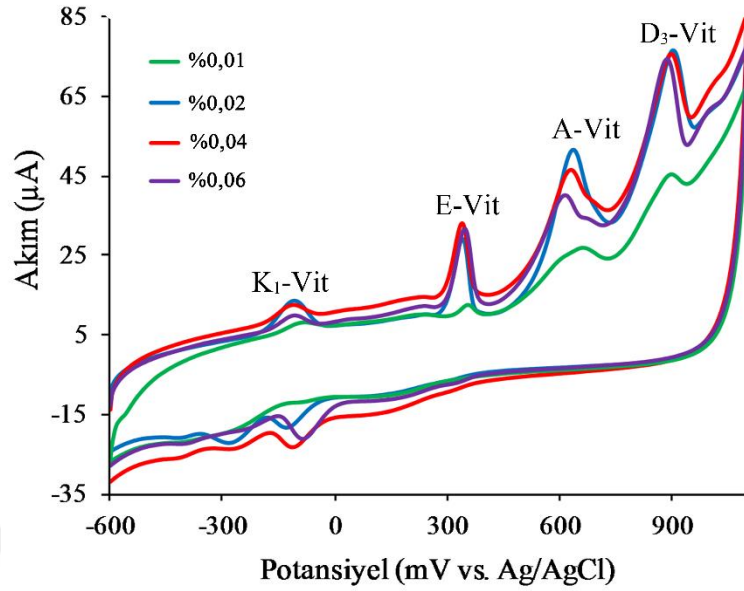
Bölüm 3.6.'de belirtilen koşullarda farklı TX-100 konsantrasyonları denendi. TX-100 konsantrasyonu %0,01(w/v) olduğunda K_1 -Vit'nin çöktüğü görülmüştür. %0,02, %0,04, %0,06 ve %0,08 (w/v) TX-100 konsantrasyonlarının pik akımı üzerine etkisi CV ile incelendi. K_1 -Vit ve D_3 -Vit'nin artan TX-100 konsantrasyonu ile birlikte pik akım değerleri de artmıştır. A-Vit ve E-Vit'nin ise TX-100 konsantrasyonunun %0,02'den % 0,04'e çıkmasıyla oksidasyon pik akımı değerleri de yükselmiştir. Artan yüzey aktif konsantrasyonlarında ise pik potansiyellerinde ve pik yüksekliklerinde önemli bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: β CD/MWCNT/GCE ile 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D_3 -Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K_1 -Vit'in farklı TX-100 (w/v) konsantrasyonlarındaki döngülü voltamogramları, v : 50 mV s^{-1} .

%0,01; %0,02; %0,04; %0,06 (w/v) konsantrasyonlarındaki SDS varlığında 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponu ortamına β CD/MWCNT/GCE yüzeyinde A, D_3 , E ve K_1 -Vit'lerinin döngülü voltamogramları incelendiğinde %0,01'den %0,02'ye SDS (w/v) konsantrasyonunun artması ile her dört vitaminin de pik akım değerleri önemli ölçüde artış göstermiştir. Artan SDS konsantrasyonlarında ise K_1 ve A-Vit'nin pik yüksekliklerinde düşüş görülürken D_3 ve E-Vit'nin pik yüksekliklerinde önemli bir değişim olmamıştır (Şekil 4.8). Sonuç olarak, %0,02 (w/v) optimum SDS konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

Düşük yüzey aktif konsantrasyonlarında, analit elektrot yüzeyine serbestçe taşınabilirken yüzey aktif konsantrasyonu arttığında analit, miselin hidrofobik çekirdeği içinde sıkışabilmekte ve böylece yüzey aktif elektrot yüzeyinde birikerek pik akımının azalmasına neden olabilmektedir.

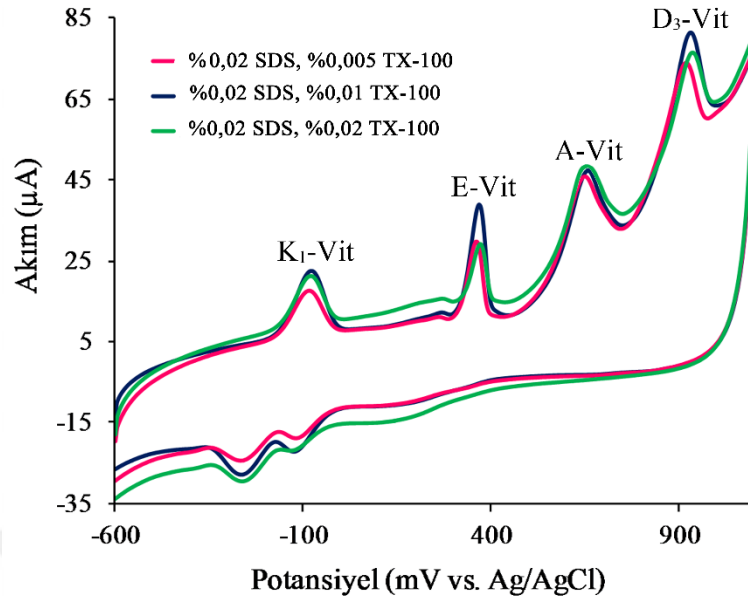


Şekil 4.8: β CD/MWCNT/GCE ile 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D_3 -Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K_1 -Vit'in farklı SDS (w/v) konsantrasyonlarındaki döngülü voltamogramları, v : 50 mV s^{-1} .

STAB ortamında çökme görülmedi ancak çalışılan potansiyel aralığında yüzey aktif madde elektroaktif ve elde edilen pik akım değerleri düşük olduğu için kullanılmadı.

Yüzey aktif olarak SDS'nin kullanıldığı durumda K_1 -Vit'nin çözünürlüğü düşük olmakta ve dolayısı ile CV'de bulunan pik akım değerleri de noniyonik TX-100'e göre daha zayıf olmaktadır. Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'deki voltamogramlarda da görüldüğü gibi optimum miktardaki SDS varlığında TX-100'e göre A, D_3 , ve E-Vit'lerinin oksidasyon pik potansiyel değerleri hem daha düşük potansiyelde elde edilmiş hem de pik akım değerlerinde belirgin artış olmuştur. Bu nedenlerden dolayı uygun yüzey aktif ortamını belirleyebilmek için hem TX-100 hem de SDS karışımı ile de deneme yapılmıştır.

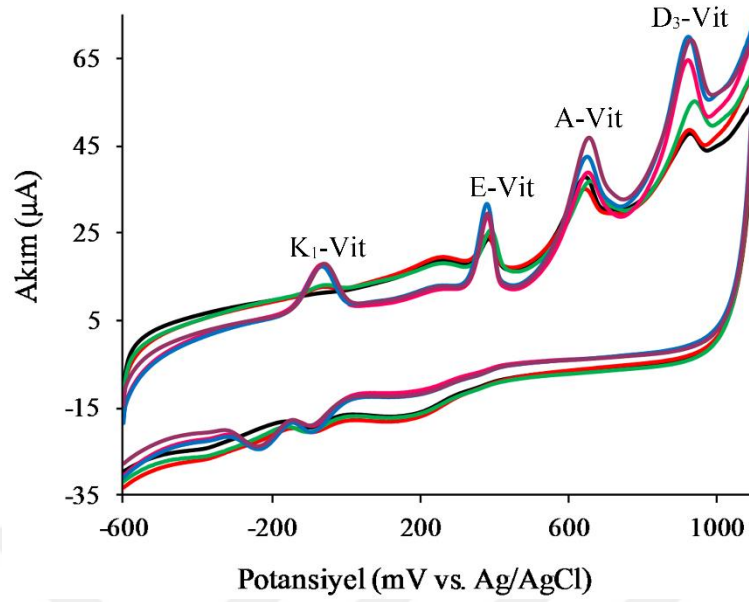
%0,02 SDS varlığında farklı konsantrasyonlardaki TX-100 miktarının etkisi 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponu ortamına β CD/MWCNT/GCE yüzeyinde incelendi. %0,005; %0,01 ve %0,02 (w/v) TX-100 konsantrasyonunda maksimum pik akım değerleri %0,01 (w/v) ile elde edilmiştir (Şekil 4.9). Artan konsantrasyonda ise hem oksidasyon pik yükseklikleri düşmekte hem de pik potansiyelleri daha yüksek değerlere kaymaktadır. Bu denemeler sonucunda optimum yüzey aktif ortamı %0,02 (w/v) SDS ve %0,01 (w/v) TX-100 olarak belirlenmiştir.



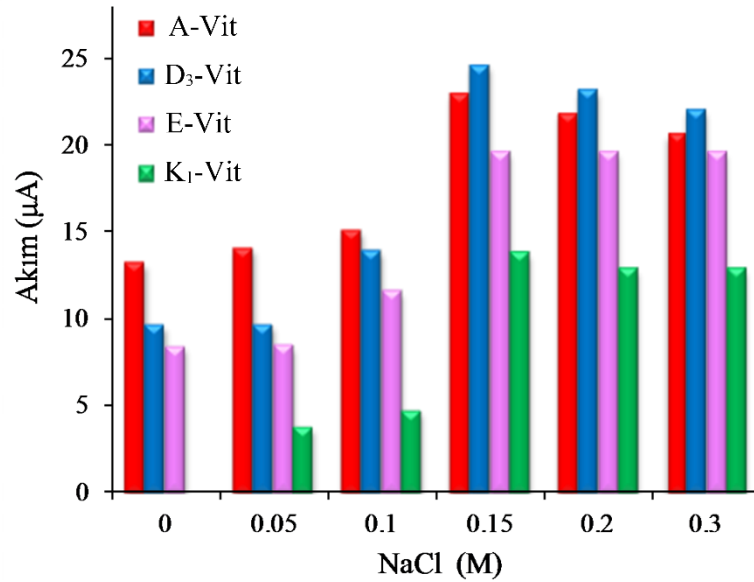
Şekil 4.9: β CD/MWCNT/GCE ile 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D₃-Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K₁-Vit'in % 0,02(w/v) SDS ve farklı TX-100 (w/v) konsantrasyonlarındaki döngülü voltamogramları, ν : 50 mV s⁻¹.

4.7. NaCl MİKTARININ ETKİSİ

Bölüm 3.7'de belirtilen koşullarda farklı NaCl konsantrasyonlarının vitaminlerin oksidasyon pik akımına etkisi incelendi. Ortamda NaCl bulunmadığı zaman K₁ vitaminine ait redoks piki görülmemiştir. Artan NaCl miktarı ile birlikte 0,15 M da dört vitamin için de maksimum pik akım değerlerine ulaşılmıştır. Artan NaCl miktarlarında ise K₁ ve E-Vit'in pik akım değerleri hemen hemen sabit kalırken D₃ ve A-Vit'in pik akım değerlerinde düşüş görülmüştür. Optimum NaCl konsantrasyonu 0,15 M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



Şekil 4.10: β CD/MWCNT/GCE ile pH 5 BR tamponunda %0,01 (w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D₃-Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K₁-Vit'in farklı NaCl konsantrasyonlarındaki döngülü voltamogramları, v : 50 mV s^{-1} .

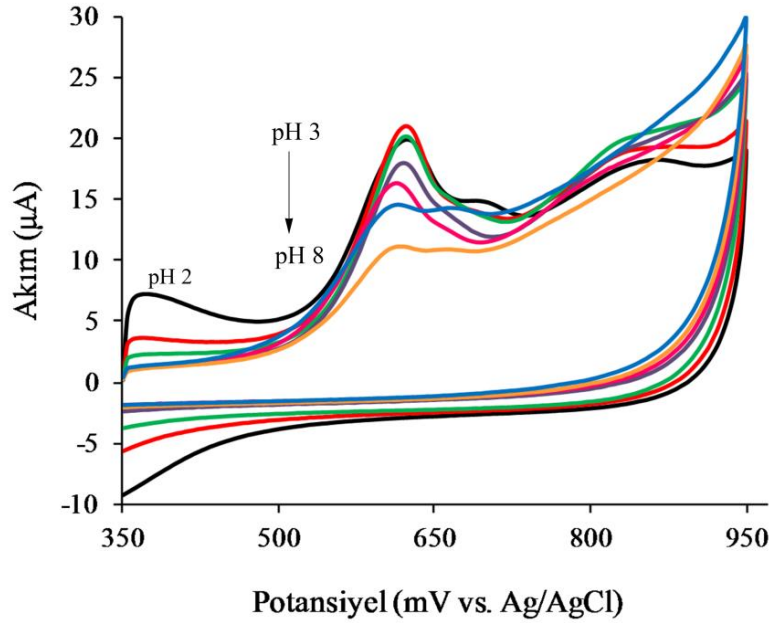


Şekil 4.11: β CD/MWCNT/GCE ile pH 5 BR tamponunda %0,01 (w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D- Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K₁-Vit'in farklı NaCl konsantrasyonlarındaki pik akım değerleri, v : 50 mV s^{-1} .

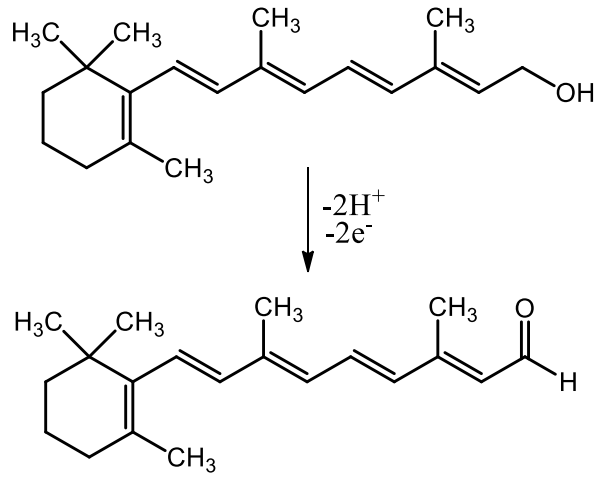
4.8. OPTİMUM pH'IN BELİRLENMESİ

β CD/MWCNT/GCE kullanılarak A, D₃, E ve K₁-Vit'lerinin her biri için pH denemesi yapılarak karışım için optimum pH değeri belirlenmiştir.

Bölüm 3.8'de belirtilen koşullarda A-Vit için yapılan pH denemesi sonunda şekilde de görüldüğü gibi A-Vit'nin pik akım değerleri pH 3'de maksimuma ulaşmış ve pH'ın artmasıyla pik yüksekliği de azalmıştır (Şekil 4.12). Pik potansiyellerinde ise artan pH ile birlikte küçük kaymalar olmuştur. pH'a karşı potansiyel değerleri grafiğe geçirildiğinde pH ile E (V) arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur. Doğru denklemi $E (V) = -0,0024 \text{ pH} + 0,6304$ ($R^2 = 0,9958$) şeklindedir. Retinol'ün $2e^-$ ve $2 H^+$ vererek retinaldehite yükselttiği reaksiyon mekanizması Şekil 4.13'de verilmiştir (Ziyatdinova ve diğerleri, 2010).

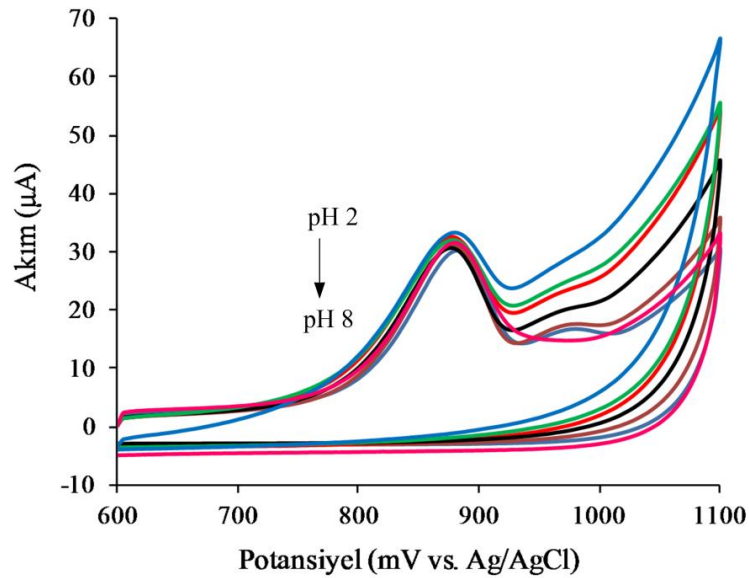


Şekil 4.12: β -CD/MWCNT/GCE ile %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 10^{-4} M A-Vit'in çeşitli pH'larda 0,1 M BRT ile elde edilen döngülü voltamogramları v : 50 mV s^{-1} .

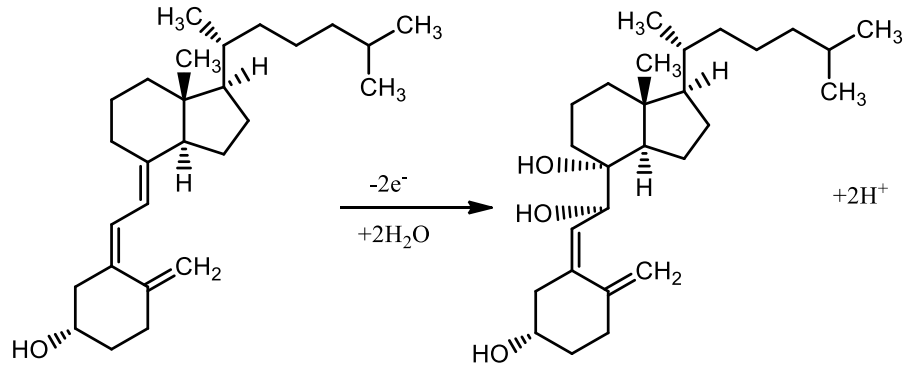


Şekil 4.13: A-Vit'in oksidasyonunun reaksiyon mekanizması.

D₃-Vit'ininde ise pH'a bağlı olarak pik akımları pH 5'e kadar yaklaşık aynı değerlerde daha yüksek pH'larda ise düşüş göstermiştir (Şekil 4.14). Pik potansiyel değerleri ise pH'a bağlı olarak değişmemektedir. D₃-Vit'in oksidasyon reaksiyonu Şekil 4.15'de verildiği gibi trien kısmında diol oluşumu ile gerçekleşmektedir (Webster, 2012).

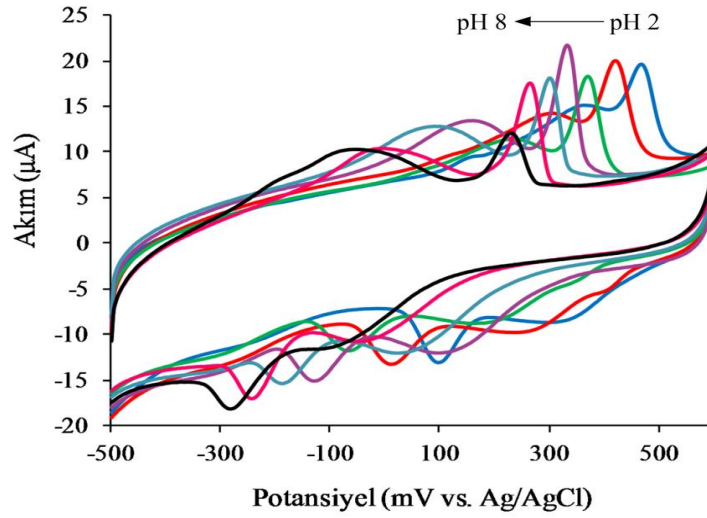


Şekil 4.14: β CD/MWCNT/GCE ile %0,01(w/v) TX-100, %0,02(w/v) SDS varlığında 5×10^{-5} M D₃-Vit'in çeşitli pH'larda 0,1 M BRT ile elde edilen döngülü voltamogramları, v : 50 mV s⁻¹.

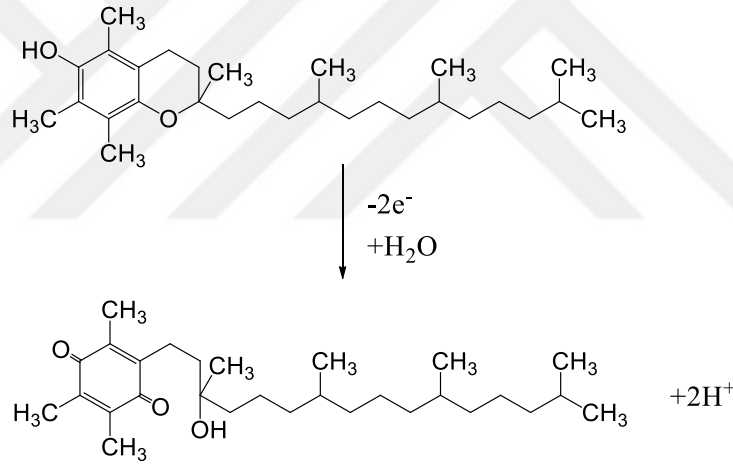


Şekil 4.15: D₃-Vit'in oksidasyonunun reaksiyon mekanizması.

E-Vit'nin belirtilen koşullarda gerçekleştirilen pH denemesinde pH'ın 2'den 5'e kadar artmasıyla birlikte pik akım değerleri de artmış ve pH 5'de maksimuma ulaşmıştır (Şekil 4.16). Artan pH'larda ise pik akım değerlerinin düştüğü görülmüştür. Protonların elektrot reaksiyonlarına dahil olması nedeniyle pik potansiyelleri artan pH ile birlikte daha düşük potansiyel değerlerine kaymıştır. pH'a karşı potansiyel değerleri grafiğe geçirildiğinde pH ile E (V) arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur. Doğru denklemi ise $E (V) = -0,0560 \text{ pH} + 0,6137$ ($R^2 = 0,9967$) şeklindedir. $-0,0560 \text{ V/pH}$ olarak bulunan denklemin eğim değeri Nernst denkleminin eğim değerine ($-0,059 \text{ V/pH}$) oldukça yakın bulunmuştur. Bu da bize gerçekleşen reaksiyonda eşit sayıda proton ve elektronun yer aldığını göstermektedir. E-Vit'in oksidasyonunda (Şekil 4.17) α -tokoferol $2 e^-$ ve $2H^+$ vererek α -tokoferol kinona dönüşmektedir (Webster, 2012).

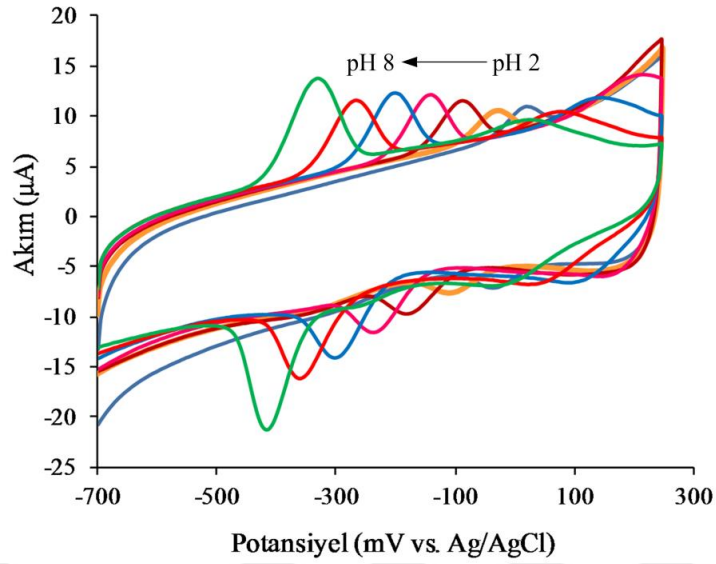


Şekil 4.16: β CD/MWCNT/GCE ile 50 mV s^{-1} tarama hızında %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 2×10^{-5} M E-Vit'in çeşitli pH'larda BRT ile elde edilen döngülü voltamogramları, v : 50 mV s^{-1} .

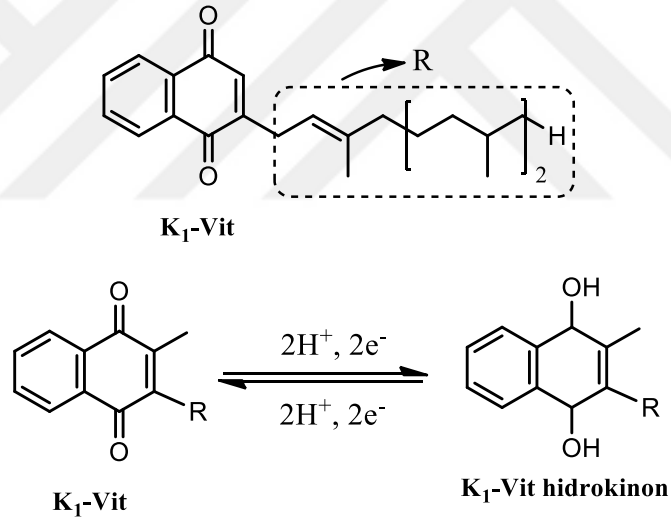


Şekil 4.17: E-Vit'nin oksidasyon reaksiyon mekanizması.

K_1 -Vit'nin pH 2'den pH 8'e kadar anodik ve katodik pik akımları artarak pH 8'de maksimum değere ulaşmıştır (Şekil 4.18). Pik potansiyelleri ise artan pH ile birlikte daha düşük potansiyel değerlerine kaymıştır. Döngülü voltametri ile elde edilen anodik ve katodik pik potansiyeli değerlerinin ortalaması alınarak hesaplanan ($E^{o'} = (E_{pa} + E_{pc})/2$) formal potansiyele karşı pH ilişkisi $E^{o'} (\text{V}) = -0,0607 \text{ pH} + 0,1138$ ($R^2 = 0,9999$) şeklinde bulunmuştur. $-0,0607 \text{ V/pH}$ olarak bulunan denklemin eğim değeri Nernst denkleminin eğim değerine ($-0,059 \text{ V/pH}$) oldukça yakın bulunmuştur. Bu da bize gerçekleşen reaksiyonda eşit sayıda proton ve elektronun yer aldığını göstermektedir. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi K_1 -Vit'i $2e^-$ ve $2H^+$ olarak kinon hidrokinona indirgenerek tersinir bir reaksiyon gerçekleşmektedir (Cannes ve diğ. 2002).

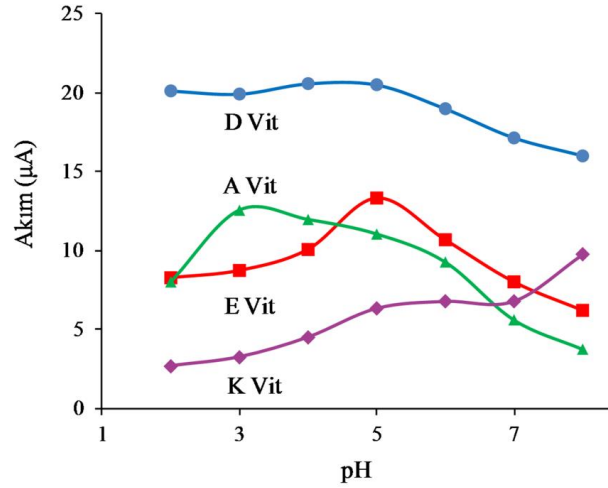


Şekil 4.18: β CD/MWCNT/GCE ile %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 2×10^{-5} M K_1 -Vit'in çeşitli pH'larda BRT ile elde edilen döngülü voltamogramları, v : 50 mV s^{-1} .



Şekil 4.19: K_1 -Vit'in redoks reaksiyon mekanizması.

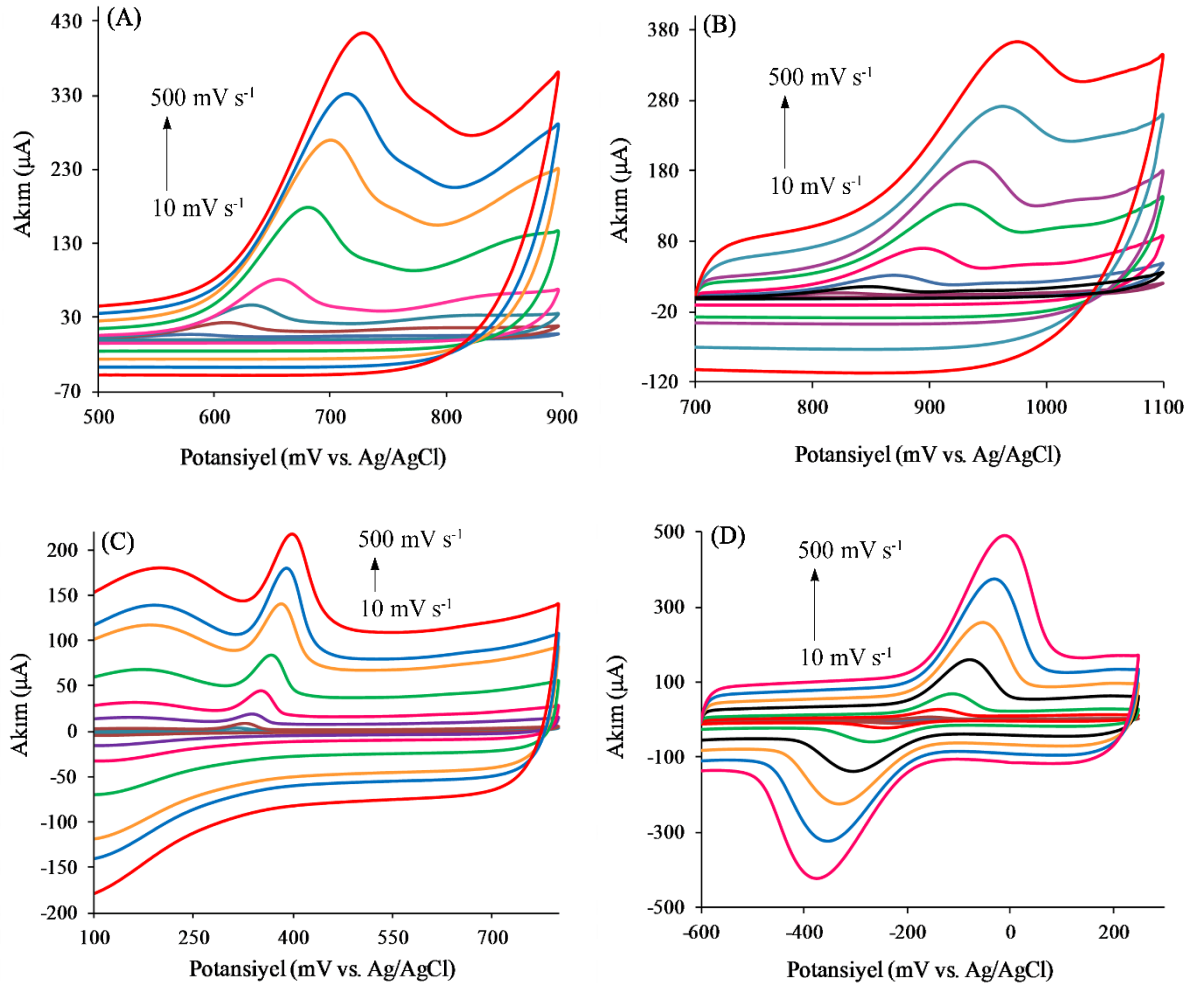
A, D₃, E ve K_1 - Vit'leri ile yapılan pH denemesi sonucunda pH- I_{pa} grafiğinde (Şekil 4.20) görüldüğü gibi dört vitaminin eşzamanlı tayinine imkan veren optimum pH 5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.20: β CD/MWCNT/GCE ile 0,15M NaCl, %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında 10^{-4} M A-Vit, 5×10^{-5} M D₃-Vit, 2×10^{-5} M E-Vit ve 2×10^{-5} M K₁-Vit'in farklı pH'larda 0,1 M BR tamponundaki pik akım değerleri, v : 50 mV s⁻¹.

4.9. TARAMA HIZININ ETKİSİ

Şekil 4.21'deki döngülü voltametri sonuçlarından elde edilen voltamogramda da görüldüğü gibi A-Vit (10^{-4} M), D₃-Vit (5×10^{-5} M), E-Vit (2×10^{-5} M)'nin artan tarama hızı ile birlikte anodik pik akımları da artmıştır. v -I arasında lineer bir ilişkinin olması β CD/MWCNT/GCE yüzeyinde gerçekleşen vitaminlerin oksidasyonunun adsorpsiyon kontrollü bir süreç olduğunu göstermektedir. A, D₃ ve E-Vit'in $v - I_{pa}$ arasındaki lineer regresyon denklemleri sırasıyla $I_{pa} = 0,48531 v \text{ (mV s}^{-1}) + 8,1883 \text{ (R=0,9945)}$, $I_{pa} = 0,2713 v \text{ (mV s}^{-1}) + 7,3657 \text{ (R=0,9943)}$, $I_{pa} = 0,1905 v \text{ (mV s}^{-1}) + 3,2074 \text{ (R=0,9962)}$ olarak bulunmuştur. K₁-Vit'inde de (2×10^{-5} M), tarama hızının artışıyla birlikte anodik ve katodik pik akımları da lineer olarak artmıştır. Bu da K₁-Vit'nin redoks reaksiyonunun yine adsorpsiyon kontrollü bir süreç olduğunu göstermektedir. $v - I_{pa}$ ve $v - I_{pc}$ arasındaki lineer regresyon denklemleri $I_{pa} = 0,7317 v \text{ (mV s}^{-1}) - 17,309 \text{ (R=0,9948)}$ ve $I_{pa} = 0,5986 v \text{ (mV s}^{-1}) + 14,573 \text{ (R=0,9948)}$ olarak bulunmuştur

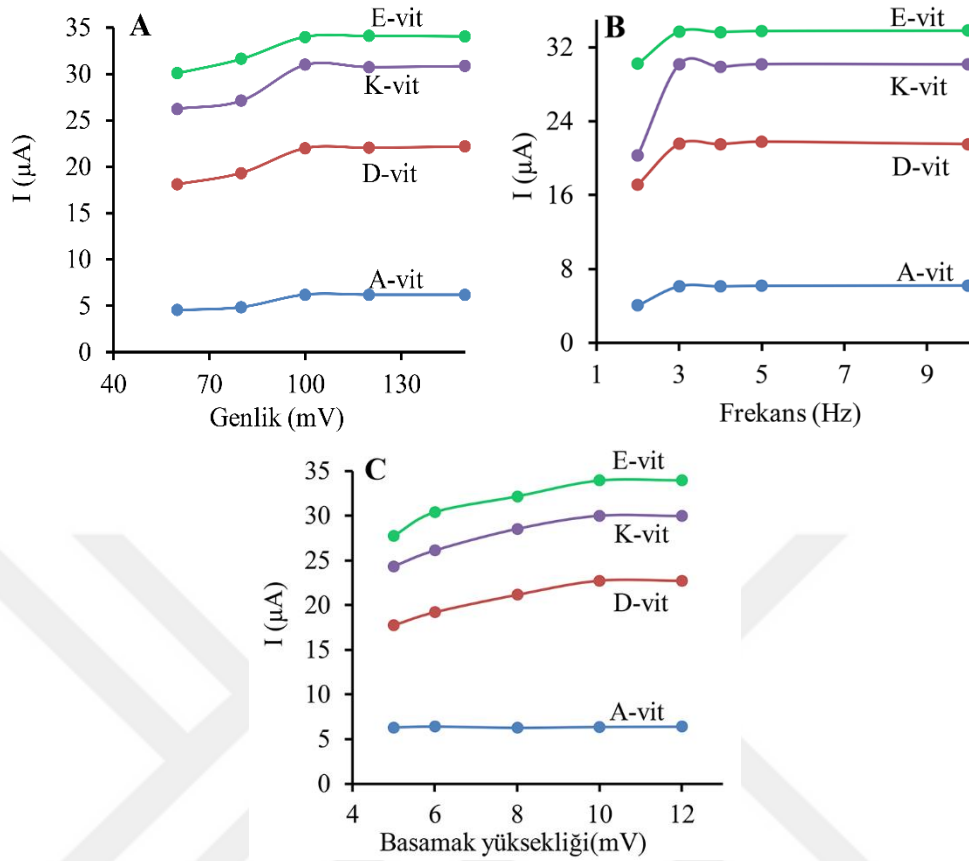


Şekil 4.21: β CD/MWCNT/GCE ile 10^{-4} M A-Vit (A), 5×10^{-5} M D₃-Vit (B), 2×10^{-5} M E-Vit'nin (C) ve 2×10^{-5} M K₁-Vit'nin 0,1 M pH 5 BR tampon çözeltisi içerisinde %0,01 (w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS varlığında farklı tarama hızlarındaki voltamogramları (10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mV s^{-1}).

4.10. KARE DALGA VOLTAMETRİSİ PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ

Voltametik tarama parametreleri, en yüksek pik ayrımı ve background'dan ayırarak maksimum hassasiyet elde etmek için optimize edildi.

SWV'de basamak yüksekliği, kare dalga genliği ve kare dalga frekansı gibi çeşitli enstrümental parametrelerin pik akımı üzerine etkisi bulunmaktadır. Bu enstrümental parametrelerin pik akımı üzerine etkileri incelenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: Kare dalga parametrelerinin genlik (A), frekans (B), basamak yüksekliği (C)'nin vitaminlerin pik akımına etkisi.

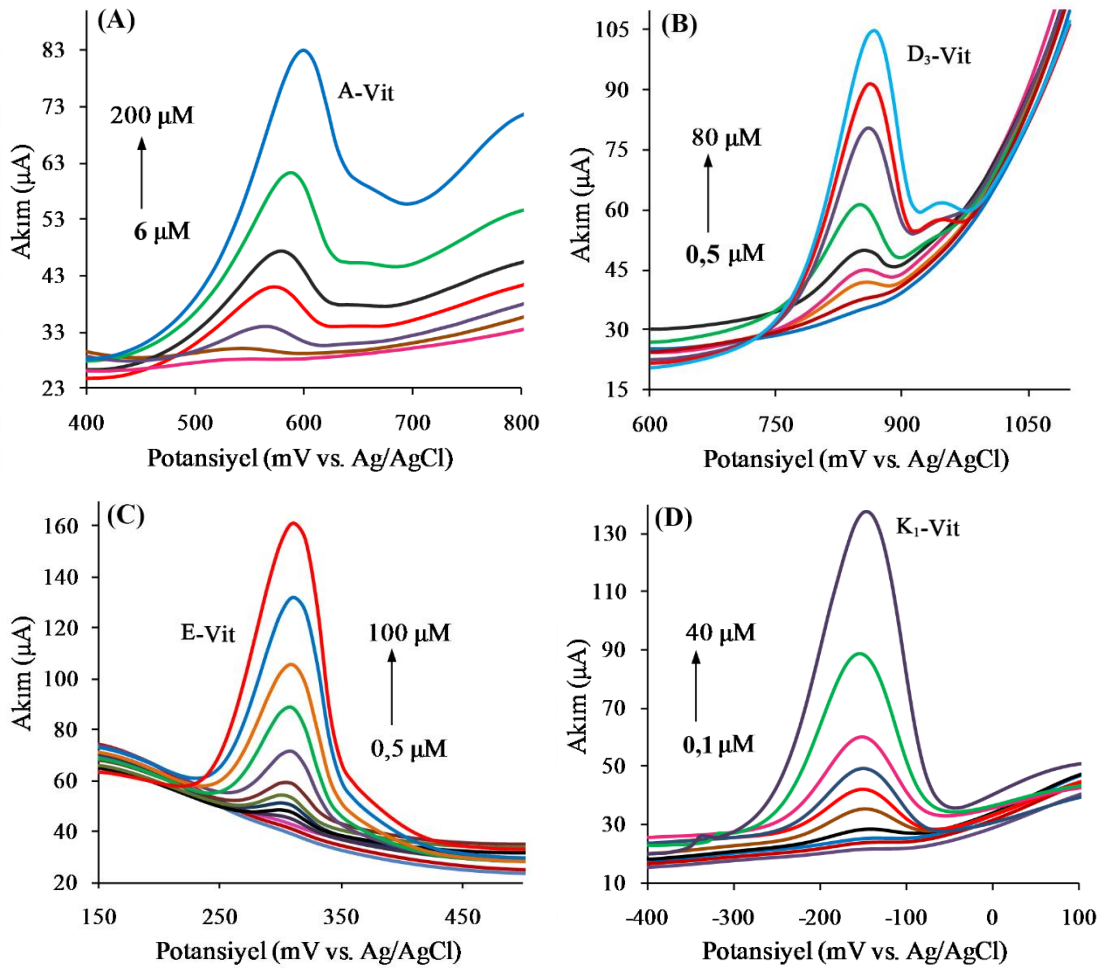
Pik akımları üzerine genliğin etkisi 60 mV'tan 150 mV arasında araştırılmıştır. Kare dalga genliğinin 60 mV'dan 100 mV'a kadar artmasıyla vitaminlerin pik akımları da artmıştır. Sonrasında ise pik yüksekliklerinin sabit kaldığı görülmüştür. Sonuçlara bakılarak optimum genlik 100 mV olarak belirlenmiştir.

Vitaminlerin pik akımına kare dalga frekansının etkisi 2 ile 10 Hz arasında incelenmiştir. Frekansın artmasıyla 3 Hz'e kadar pik yükseklikleri artarken üzerindeki frekans değerlerinde pik yüksekliklerinde küçük artışlar görülmekte ve pik geniş artık akımla örtülmektedir. Bu nedenle optimum frekans 3 Hz olarak seçilmiştir. Basamak yüksekliği 5 ile 12 mV arasında denenmiştir. Basamak yüksekliğinin 5 mV'dan 10 mV'a kadar artmasıyla D₃, E ve K₁-Vit'lerinin pik akımlarında bir artış görülürken A vitamininin pik akım değerlerinde önemli bir artış görülmemiştir. Artan değerlerde ise dört vitamin için de pik akım değerleri yaklaşık olarak sabit kalmıştır. Bu nedenle, 10 mV optimum basamak yüksekliği olarak belirlenmiştir.

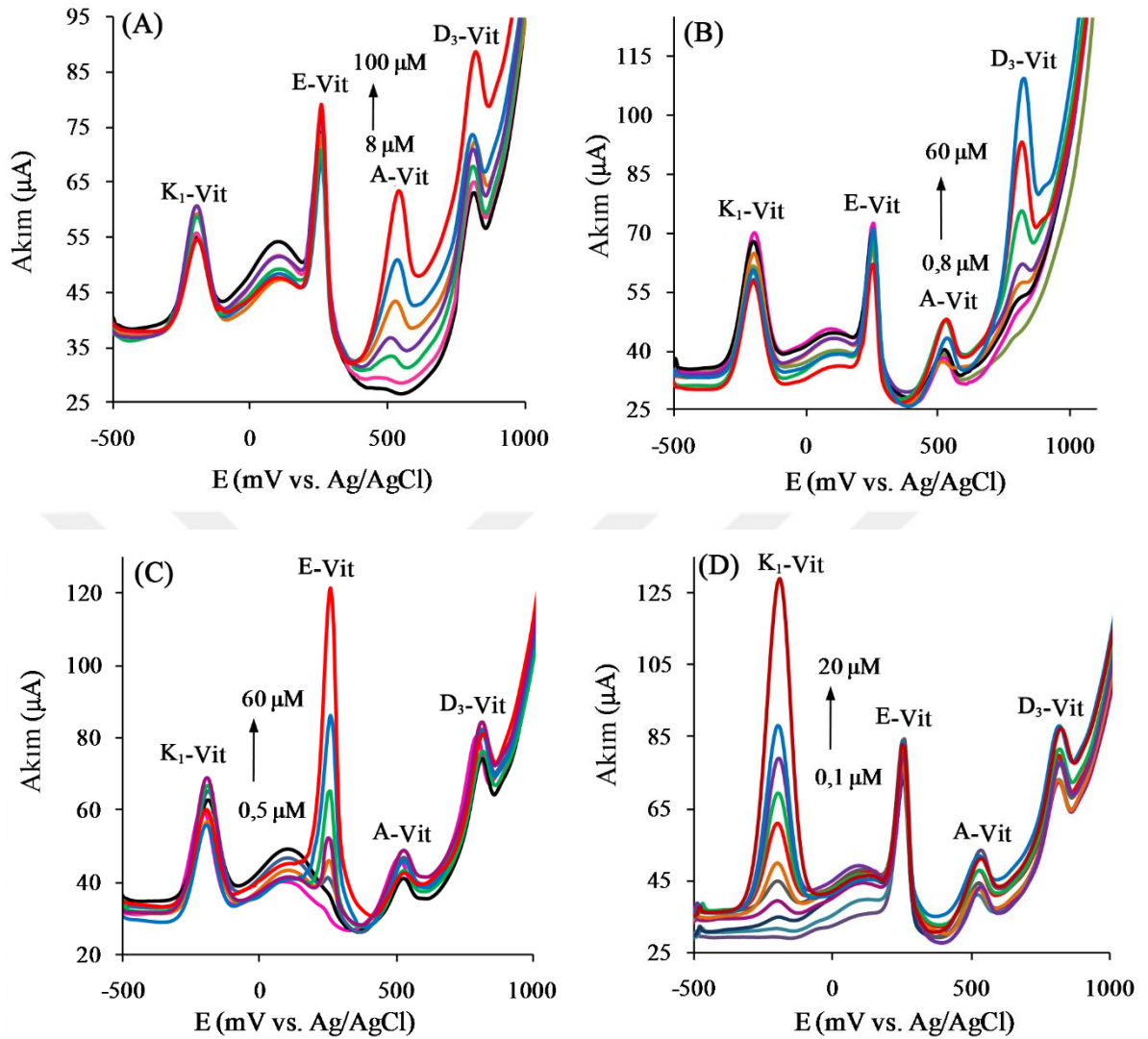
Deneysel sonuçlara göre, optimum parametreler: frekans 3,0 Hz, puls genliği 150 mV ve basamak yüksekliği 10 mV olarak bulunmuştur.

4.11. ANALİTİK PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ

Kare dalga voltametri, hızlı tarama hızlarında gerçekleştirilen geniş genlikli bir tekniktir. Seçicilik ve duyarlılığın artırılması için yaygın olarak kullanılan bir elektroanalitik tekniktir. Öncelikle A, D₃, E ve K₁-Vit'leri için bölüm 3.11'de belirtilen koşullarda ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. A, D₃, E ve K₁-Vit'lerinin artan konsantrasyon ile pik akımlarındaki artış Şekil 4.23'de SW voltamogramlarında gösterilmiştir.



Şekil 4.23: β CD/MWCNT/GCE ile %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS ve 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda A-Vit; 6, 20, 40, 60, 80, 100, 200 μ M (A), D₃-Vit; 0,5; 4,0; 6,0; 10; 20; 40; 60; 80 μ M (B), E-Vit; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ M (C), K₁-Vit; 0,1; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10, 20, 40 μ M (D) konsantrasyonlarında SWV ile elde edilen voltamogramları.



Şekil 4.24: β CD/MWCNT/GCE ile %0,01(w/v) TX-100, %0,02 (w/v) SDS ve 0,15 M NaCl içeren pH 5 BR tamponunda 20 μ M D₃-Vit, 20 μ M E-Vit, 6 μ M K₁-Vit ve A-Vit; 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ M (A), 80 μ M A-Vit, 20 μ M E-Vit, 6 μ M-K₁ Vit ve D₃-Vit; 0,8; 2; 4; 6; 10; 20; 40; 60 μ M (B), 80 μ M A Vit, 20 μ M D₃-Vit, 6 μ M K₁-Vit ve E-Vit; 0,5;1; 5; 8; 10; 20; 40; 60 μ M (C), 80 μ M A-Vit, 20 μ M D₃-Vit, 20 μ M E-Vit ve K₁-Vit; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 20 μ M (D) SWV voltamogramları.

Yukarıda belirlenen optimize SWV koşulları kullanılarak elde edilen voltamogramlarda pik potansiyel değerleri A, D₃, E ve K₁-Vit'leri için sırasıyla; 526,7 mV, 814,3 mV, 255 mV, -192,2 mV olarak bulunmuştur. Bu değerlere bakıldığında K₁ ve E vitaminleri arasında 447 mV, E ve A vitaminleri arasında 272 mV, A ve D₃ vitaminleri arasında 288 mV pik potansiyel farkı olduğu ve buradan da karışım halinde bulunan yağda çözünen vitaminlerin tayininde yeterli pik ayırım derecesine sahip olduğu görülmektedir. Bölüm 3.11'de belirtilen koşullarda eş zamanlı olarak gerçekleştirilen lineerlik çalışmasına ait voltamogramlar Şekil 4.24'de verilmiştir.

Tablo 4.4’de β CD/MWCNT/GCE ile A, D₃, E ve K₁-Vit’lerinin tek tek ve eş zamanlı SWV yöntemi kullanılmasıyla elde edilen kalibrasyon denklemleri, LOD değerleri (LOD=3s/m olarak tanımlanan dedeksiyon limiti (s:blankın standart sapması ve m: kalibrasyon doğrusunun eğimi) ve lineer aralıkları verilmiştir. Bu sonuçlar, A, D₃, E ve K₁-Vit’lerin önerilen sensörde dörtlü karışımlarında seçici ve hassas bir şekilde belirlenebileceğini göstermektedir.

Tablo 4.4: A, D₃, E ve K₁-Vit’lerinin eş zamanlı SWV yöntemi kullanılarak β CD/MWCNT/GCE ile elde edilen analitik parametreleri.

Vitamin	Kalibrasyon denklemi	Lineer aralık (μ M)	LOD (μ M)
Tek Tek Tayin			
A-Vit	$I (\mu A) = 0,2181 C (\mu M) - 2,4846 (R^2 = 0,9969)$	6-200	3,41
D ₃ -Vit	$I (\mu A) = 0,8752 C (\mu M) + 0,8867 (R^2 = 0,9948)$	0,5-80	0,3
E-Vit	$I (\mu A) = 1,0511 C (\mu M) + 1,0678 (R^2 = 0,9956)$	0,5-100	0,3
K ₁ -Vit	$I (\mu A) = 2,8453 C (\mu M) + 0,6775 (R^2 = 0,9952)$	0,1-40	0,07
Eş zamanlı Tayin			
A-Vit	$I = 0,1627 C (\mu M) - 1,3836 (R^2 = 0,9983)$	8,0-100	2,5
D ₃ -Vit	$I = 0,8359 C (\mu M) + 1,8766 (R^2 = 0,9994)$	0,8-60	0,67
E-Vit	$I = 1,4005 C (\mu M) + 2,2605 (R^2 = 0,9984)$	0,5-60	0,48
K ₁ -Vit	$I = 4,7834 C (\mu M) + 1,5595 (R^2 = 0,9974)$	0,1-20	0,09

4.12. TEKRARLANABİLİRLİK VE STABİLİTE

Tekrarlanabilirliği belirlemek için β CD/MWCNT ile modifiye edilmiş üç ayrı elektrot hazırlanarak vitaminlerin farklı iki konsantrasyonlardaki karışımlarının pik akım değerleriyle hesaplanan bağıl standart sapması (%RSD) Tablo 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4.5: Gün içi ve günler arası %RSD değerleri

	Vitamin Karışımları			
	40 μ M A, 6 μ M D ₃ , 10 μ M E, 2 μ M K ₁ -Vit		20 μ M A, 4 μ M D ₃ , 8 μ M E, 1 μ M K ₁ -Vit	
	Güniçi (%RSD)	Günlerarası (%RSD)	Güniçi (%RSD)	Günlerarası (%RSD)
A-Vit	2,8	3,5	3,9	4,1
D ₃ -Vit	3,0	3,1	3,2	3,2
E-Vit	2,0	2,02	1,1	1,6
K ₁ -Vit	2,1	1,3	2,4	2,4

Bu da elektrodun tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu göstermiştir. Ayrıca, hazırlanan modifiye elektrodun 10 gün boyunca + 4°C'de saklanmasıyla vitaminlerin voltametrik pik akım değerlerinde, yeni hazırlanmış elektroda kıyasla pik akımlarında ~% 10'luk (n = 5) bir azalma görüldü. Bu sonuçlar, üretilen elektrotun, hedef vitaminlerin eş zamanlı tayini için yeterli stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir.

4.13. ÖRNEK UYGULAMASI

Geliştirilen yöntem ilaç örneklerine, vitamin katkılı devam sütü ve vitamin suyu örneklerine uygulanmıştır.

Hayvansal kaynaklı gıdalarda yağda çözünen vitaminler ve karotenoidler, esas olarak trigliseritlerden, sterollerden ve fosfolipidlerden oluşan lipit fraksiyonunda bulunmaktadır. Bitkisel kökenli gıdalarda ise, karotenoidler ve yağda çözünen vitaminler kloroplastların tilakoid membranlarına bağlıdır. Bu amaçla istenmeyen lipidleri ve klorofilleri uzaklaştırmak için etkili bir yol olan sabunlaşma işlemi yapılmıştır. Sıcak sabunlaşma yağda çözünen vitaminlerin gıdalardan ekstraksiyonu için hala en etkili araç olarak kullanılmaktadır.

Sıcak sabunlaşma, karotenoidlerin, A, D ve E-Vit'lerinin ayrı ayrı ve aynı anda ekstraksiyonunda kullanılabilir, ancak yüksek sıcaklıkta alkali ortamda hızla bozunabilen K vitamini ve homologları için tavsiye edilmemektedir. Ayrıca, E vitamini ve retinol kısmen parçalanabilirken, karotenler ve D vitamini ise termal izomerizasyona maruz kalabilmektedir. Bu bakımdan, K-Vit dahil diğer lipofilik vitaminlerin de aynı anda ekstraksiyonunu gerçekleştirebilecek özelliğe sahip olan düşük sıcaklık ve alkali konsantrasyon koşulları altında gerçekleştirilen sabunlaşma işlemi uygulanmıştır. Soğuk sabunlaşma, oda sıcaklığında, karanlıkta ve daha uzun sürede (30 dakika yerine 15 saat) gerçekleştirilmektedir. Sabunlaştırma aşaması literatürde (Gentili ve diğ. 2013) belirtildiği gibi kabaca yiyeceklerin yağ bileşimi esas alınarak hesaplanan stokiyometrik olarak eşit veya daha az miktarda KOH kullanılarak yapılmıştır.

Ön sabunlaştırma aşamasında ayrıca vitaminlerin farklı formları alkol türevlerine dönüştürülebilmektedir (örneğin, retinil asetat, retinil palmitat'ın hepsini retinole dönüştürmek için uygulanmaktadır) (Fanali ve diğ. 2017).

Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanan ilaç, vitamin katkılı devam sütü ve vitamin suyu örneklerinin analiz sonuçları Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.6: Süt, vitamin suyu ve ilaç karışımı örneklerinde vitaminlerin eş zamanlı olarak belirlenmesi.

Örnek	Vitamin	Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)	Belirtilen (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	
Devam sütü	A	-	<LOD	0.66	-	
		19.10	19.21±0.15		100	
		28.65	28.96±0.12		101	
	D ₃	-	<LOD	0.02	-	
		5.13	5.07±0.02		99	
		10.26	10.29±0.03		100	
	E	-	11.06±0.07	11.11	-	
		8.61	19.64±0.06		99	
		17.23	28.84±0.03		102	
	Vitamin suyu	K ₁	-	<LOD	0.05	-
			1.50	1.55±0.03		103
			3.00	3.04±0.01		101
A		-	1.58±0.04	1.60	-	
		1.91	3.47±0.03		99	
		2.86	4.42±0.07		99	
D ₃	-	<LOD	0.01	-		
	5.13	5.19±0.02		101		
	10.26	10.36±0.13		101		
İlaç (karışım)*	E	-	23.8±0.3	24.00	-	
		8.61	32.48±0.06		98	
		17.23	41.45±0.91		101	
	K ₁	-	-	-	-	
		1.50	1.47±0.01		98	
		3.00	2.97±0.12		99	

*mg/mL

Tablo 4.5’de görüldüğü gibi devam sütünün E vitamini ve vitamin suyunun A ve E-Vit içeriği firmanın belirtmiş olduğu değerlerle uyumlu olduğu bulunmuştur. Örneklerle her bir vitamin için tabloda belirtilen miktarlarda katkı yapıldığında ise %98 ile %103 arasında geri kazanımla elde edilmiştir. İlaç örneklerinin analiz sonucunda ise %95 güven aralığında ($\bar{x} \pm$

$(t_{0.95} s/N^{1/2}) ; N=3$ (\bar{x} = ortalama, s = standart sapma)) verilen sonuçlardan da görüldüğü gibi ilaçlarda belirtilen değerlerle uyumlu olduğu görülmüştür.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lipofilik vitaminler, beslenme yoluyla alınması gereken insan metabolizmasının düzgün işleyişi için gerekli olan polar olmayan organik bileşiklerdir. Bu nedenle, vücutta uygun miktarda yağda çözünen vitaminlerin bulunması çok önemlidir. Günümüzde, birçok insan, beslenmeyi desteklemek için ticari olarak temin edilebilen vitamin takviyeli gıdalar, multivitamin kapsülleri ve tabletlerini almaktadırlar. Birçok ülkede gıda ürünleri ve gıda takviyelerindeki vitaminlerin ve mikrobeyinlerin beyan edilen konsantrasyonları yasal olarak belirlenmiştir. Yağda çözünen vitaminlerin seviyeleri doz aşımına bağlı sağlık riskleri nedeni ile daha yakından incelenmelidir. Bu nedenle, gıda, ilaç, kozmetik ve gıda teknolojisinde vitaminlerin tespiti ve ölçümü büyük önem taşımaktadır. Lipofilik vitaminlerin analizi, lipofilik karakterlerinden dolayı oldukça karmaşık ve zaman alıcıdır. Temel dezavantajları ise analizlerde organik çözücülerin kullanılmasıdır. Bu çalışmada yağda çözünen vitaminlerin tayini sulu yüzey aktif ortamında hızlı, kullanımı kolay, düşük maliyetli, taşınabilir, hassas ve basit hazırlanabilen elektroanalitik yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Lipofilik vitaminlerin elektrokimyasal tayininde GCE, β CD/MWCNT ile modifiye edilerek kullanılmıştır. Elektrodun yüzey modifiyesinin karakterizasyonu elektrokimyasal yöntemle ve SEM yöntemi ile yapılmıştır. SEM yöntemiyle elde edilen görüntülerden MWCNT'ün β CD içerisinde homojen bir şekilde dağıldığı bulunmuştur. Elektrokimyasal EIS yöntemi ve CV kullanılarak bulunan sonuçlardan β CD/MWCNT modifiye elektrodun yalın elektroda göre yüzey alanını ve elektron transfer hızını arttırdığı bulunmuştur.

A, D₃, E ve K₁-Vit'lerinin elektrokimyasal davranışları yalın ve modifiye elektrotlar kullanılarak CV ile incelenmiştir. β CD/MWCNT modifiye GCE ile A, D₃, E ve K₁-Vit'leri için sırasıyla 0,62, 0,90, 0,30 ve -0,12 V potansiyellerinde dört oksidasyon piki elde edilmiştir. K₁-Vit'i için 0,37 V potansiyelde redüksiyon piki de elde edilmiştir. Yalın elektrotla karşılaştırıldığında β CD/MWCNT modifiye GCE'nin yağda çözünen vitaminlerin tayininde elektrokatalitik özelliğe sahip olduğu bulunmuştur.

Çalışmada vitaminlerin sulu ortamda çökmesini engellemek için uygun yüzey aktif türü ve miktarı %0,01(w/v) TX-100, %0,02(w/v) SDS olarak belirlenmiştir. Destek elektrolit olarak 0,1 M BR tamponu ve iyonik şiddeti arttırmak için 0,15 M NaCl kullanılmıştır.

Her vitamin için tarama hızı denemeleri yapılmıştır. A, D, E-Vit'leri için $v - I_{pa}$ arasındaki ve K-Vit'i için $v - I_{pa}$ ve $v - I_{pc}$ arasında çizilen grafikten lineer bir ilişki bulunmuştur. Bu sonuç elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermiştir.

A, D₃, E ve K₁-Vit'leri ile yapılan pH denemesi sonucunda elde edilen pH- I_{pa} grafiğinden dört vitaminin eşzamanlı tayinine imkan veren optimum pH 5 olarak belirlenmiştir.

Vitaminlerin analitik parametrelerinin belirlenmesinde SWV kullanılmıştır. Bu amaçla vitaminlerin hem tek tek hem de eş zamanlı olarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Tek tek tayinde bulunan kalibrasyon denklemleri ve lineer aralıları A, D₃, E ve K₁-Vit'leri için sırasıyla; $I (\mu A) = 0,2181C (\mu M) - 2,4846$ ($R^2 = 0,9969$) (6-200 μM), $I (\mu A) = 0,8752 C(\mu M) + 0,8867$ ($R^2 = 0,9948$) (0,5-80 μM), $I (\mu A) = 1,0511 C (\mu M) + 1,0678$ ($R^2 = 0,9956$) (0,5-100 μM), $I (\mu A) = 2,8453 C (\mu M) + 0,6775$ ($R^2 = 0,9952$) (0,1-40 μM) olarak bulunmuştur. A, D₃, E ve K₁-Vit'leri için sırasıyla LOD değerleri 3,41; 0,30; 0,30; 0,07 μM olarak bulunmuştur.

Eş zamanlı tayinde vitaminlerden birinin konsantrasyonu değiştirilirken diğerlerinin konsantrasyonu sabit tutularak bulunan kalibrasyon denklemleri ve lineer aralıları A, D₃, E ve K₁-Vit'leri için sırasıyla; $I = 0,1627 C(\mu M) - 1,3836$ ($R^2 = 0,9983$) (8-100 μM), $I = 0,8359 C(\mu M) + 1,8766$ ($R^2 = 0,9994$) (0,8-60 μM), $I = 1,4005 C(\mu M) + 2,2605$ ($R^2 = 0,9984$) (0,5-60 μM), $I = 4,7834 C(\mu M) + 1,5595$ ($R^2 = 0,9974$) (0,1-20 μM) olarak bulunmuştur. LOD değerleri ise A, D₃, E ve K₁-Vit'leri için sırasıyla 2,5, 0,67, 0,48,0,09 μM olarak bulunmuştur.

Hazırlanan elektrodun iyi bir tekrarlanabilirliğe ve stabiliteye sahip olduğu, lipofilik vitaminlerin eş zamanlı olarak tayininde yüksek duyarlılıkla ve düşük LOD ile tayin edilebildiği görülmüştür.

Tablo 5.1'de geliştirilen β CD/MWCNT/GCE'nin literatürdeki A, D₃, E ve K₁-Vit'lerinin tayininde kullanılan çeşitli modifiye elektrodlarla karşılaştırılması verilmiştir.

Tablo 5.1: Geliştirilen yöntemin literatürdeki A, D₃, E ve K₁-Vit'lerinin tayininde kullanılan elektrokimyasal yöntemlerle karşılaştırılması.

Elektrot	Vitamin	Ortam	Lineer aralık (µM)	LOD (µM)	Yöntem	Kaynak
GCE	A	SDS, LiClO ₄ ,su-etanol (93:7)	29,4-980	15	CV	Ziyatdinova ve diğ. (2010)
GCE	D ₂ D ₃	LiClO ₄ , % 40 EtOH, /% 60 su	1,0 – 10 5,0 –50	0,13 0,118	DPV	Cincotto ve diğ. (2014)
NF/GR/GCE	E	Aseton/ asetat aseton/ IL	0,5-90 0,5-90	0,06 0,06	SWV	Filik ve diğ. (2016)
CPE	E	NH ₃ , yüzey aktif +EtOH (%50 (v/v)+su	2,32-464 (CPC) 4,6-464 (CTAB) 9,3-464 (SDS) 3,48-464 (TX-100)	2,55 3,02 4,64 1,86	DPV	Jaiswal ve diğ. (2001)
		yüzey aktif (0,1 M)+ACN (%40 (v/v)+su	2,32-464 (CPC) 4,6-464 (CTAB) 9,3-464 (SDS) 3,48-464 (TX-100)	2,55 3,48 3,48 1,39		
pP/Pt	E	EtOH-CH ₂ Cl ₂ , LiClO ₄ , H ₂ SO ₄	5-300	1,5	DPV	Li ve diğ. (2006)
PE(CNT/dsDNA)	E	NH ₄ H ₂ PO ₄	0,0016-0,0093 0,093 – 0,371	0,00013	A-SWSV	Ly ve diğ. (2008)
Pt-MD	E	CH ₃ COOH, NaClO ₄	90-2300 60-2100 70-2200	90 60 70	LSV SWV DPV	Michalkiewicz ve diğ. (2004)
GCE	K ₁	%60 ACN:su	0,01 –1.0 5,0 – 100	0,0089	A-SWSV)	Sýs ve diğ. (2018)
GC	A D E K	ACN (%50, v/v)- biriktirme HAC tamponu sıyırma	-	-	Ad-SDPV	Sýs ve diğ. (2016)
MWNT-GE	A E	HClO ₄ , ACN	50-500 65-2000	40 50	LSV	Ziyatdinova ve diğ. (2012)
p(PBHQ)/GCE	A E	TX-100, Asetat tamponu	5 – 200 8-100	0,8 0,1	SWV	Filik ve diğ. (2016)
p(ARS)/MWCNT	K ₁ D ₃	NH ₄ Ac, %0,05 SDS	0,5-80 8-160	0,06 5,0	SWV	Filik ve diğ. (2017)
AuPd/GCE	D ₂ D ₃	LiClO ₄ , EtOH/su (%40:%60)	1-10 5-50	0,05 0,18	DPV	Men ve diğ. (2017)
SPGNE	A D E K	EtOH:NaClO ₄ (%60:%40)	0,35–17,45 0,2–13 0,18–11,6 0,4–3,5	0,06 0,03 0,03 0,003	SWV	Thangphatthan arungruang ve diğ. (2018)
βCD/MWCNT/GCE	A D E K	TX-100, SDS, NaCl, pH 5 BR tamponu	8-100 0,8-60 0,5-60 0,1-20	2,5 0,67 0,48 0,09	SWV	Bu çalışma

Tablo 5.1’de de görüldüğü gibi yağda çözünen vitaminlerin tayini genellikle tek veya ikili olarak yapılmıştır. Cincotto ve diğ. (2014), Men ve diğ. (2017), Sýs ve diğ. (2016), Ziyatdinova ve diğ. (2012),’nin yaptığı çalışmalarda ise birden fazla vitamin incelenmiş ancak vitaminlerin tayini eş zamanlı olarak değil ayrı ayrı yapılmıştır. Literatürde dört vitaminin eş zamanlı tayiniyle ilgili tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Thangphatthanarungruang ve diğ. (2018) yaptığı çalışmada A, D₃, E ve K₁-Vit’lerinin tayini eş zamanlı olarak yüzey baskılı grafen nafyon modifiye elektrot kullanarak gerçekleştirilmiştir. Ancak bu çalışmada %40 NaClO₄ içeren %60 EtOH ortamında yapılmıştır. Geliştirdiğimiz yöntemde ise A, D₃, E ve K₁-Vit’lerinin eş zamanlı tayinleri çözücü kullanılmadan yüzey aktif içeren sulu ortamda gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin uygulanabilirliğini göstermek amacıyla ilaç karışımlarına, vitamin katkılı devam sütüne ve vitamin suyu örneklerinde vitamin tayinine soğuk sabunlaşma işleminin ardından uygulanmıştır ve elde edilen sonuçların içeriğinde belirtilen miktarlarla uyumlu olduğu bulunmuştur. Ayrıca standart katkı yöntemiyle elde edilen %98-%103 geri kazanım değerleriyle de doğrulanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, hazırlanan β CD/MWCNT/GCE ile A, D₃, E ve K₁-Vit’lerinin TX-100 ve SDS yüzey aktif içeren sulu ortamda eşzamanlı elektrokimyasal tayinini için iyi bir elektrokatalitik özellik gösterdiği bulunmuştur. Geliştirilen sensör, literatürde bildirilen diğer yöntemlere (spektrofotometri, ters faz-HPLC vb.) kıyasla kullanımı kolay, düşük maliyetli, taşınabilir, hassas ve kolay hazırlanabilen bir elektrokimyasal yöntemle eş zamanlı tayine imkan sağlamaktadır. Geliştirilen sensörün, gıda, ilaç ve diğer imalat sektörlerinde rutin kalite kontrol analizinde A, D₃, E ve K₁-Vit’lerinin miktarının tayini için uygulanabilir bir alternatif olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Albahrani, A.A. ve Greaves, R.F. (2016). Fat-Soluble Vitamins: Clinical Indications and Current Challenges for Chromatographic Measurement. *The Clinical biochemist. Reviews*, 37(1), 27–47.
- Amin, A.S. (2001). Colorimetric determination of tocopheryl acetate (vitamin E) in pure form and in multi-vitamin capsules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 51(3), 267–272.
- Atuma, S. S., Lindquist, J. ve Lundström, K. (1974). The electrochemical determination of vitamin A. Part I. Voltammetric determination of vitamin A in pharmaceutical preparations. *The Analyst*, 99(1183), 683.
- Bianco, A., Kostarelos, K. ve Prato, M. (2005). Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(6), 674–679.
- Borradale, D. ve Kimlin, M. (2009). Vitamin D in health and disease: an insight into traditional functions and new roles for the ‘sunshine vitamin’. *Nutrition Research Reviews*, 22(02), 118–136.
- Brigelius-Flohé, R. ve Traber, M.G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(10), 1145–55.
- Cannes, C., Kanoufi, F. ve Bard, A.J. (2002). Cyclic voltammetric and scanning electrochemical microscopic study of menadione permeability through a self-assembled monolayer on a gold electrode. *Langmuir*, 18(21), 8134–8141.
- Casal, S., Macedo, B. ve Oliveira, M.B.P. (2001). Simultaneous determination of retinol, β -carotene and α -tocopherol in adipose tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 763(1–2), 1–8.
- Cincotto, F.H., Canevari, T.C. ve Machado, S.A.S. (2014). Highly sensitive electrochemical sensor for determination of vitamin D in mixtures of water-ethanol. *Electroanalysis*, 26(12), 2783–2788.
- Combs, G.F. (2012). *The Vitamins* (4th. ed.). London: Academic Press.
- Dam, H. (1935). The antihemorrhagic vitamin of the chick. *The Biochemical journal*, 29(6), 1273–85.
- Delgado-Zamarreño, M.M., González-Maza, I., Sánchez-Pérez, A. ve Carabias-Martínez, R. (2002). Separation and simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble vitamins by electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 953(1–2), 257–262.

- deMan, J. M. (1999). Vitamins (ss. 355–388). Springer, Boston, MA.
- Dinicolantonio, J. J., Bhutani, J. ve O'keefe, J. H. (2015). The health benefits of vitamin K. *Open Heart*, 2, 300.
- Escrivá, A., Esteve, M.J., Farré, R. ve Frígola, A. (2002). Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 947(2), 313–318.
- Fanali, C., D'Orazio, G., Fanali, S. ve Gentili, A. (2017). Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 87, 82–97.
- FAO/WHO. (2002). *Human Vitamin and Mineral Requirements*. Bangkok, Thailand.
- Farrell, C.-J. ve Herrmann, M. (2013). Determination of vitamin D and its metabolites. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(5), 675–688.
- Ferancová, A. ve Labuda, J. (2001). Cyclodextrins as electrode modifiers. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 370(1), 1–10.
- Filik, H. ve Avan, A.A. (2017). Simultaneous electrochemical determination of vitamin K1 and vitamin D3 by using poly (alizarin red S)/multi-walled carbon nanotubes modified glassy electrode. *Current Analytical Chemistry*, 13(5).
- Filik, H., Avan, A.A. ve Aydar, S. (2016). Simultaneous electrochemical determination of α -tocopherol and retinol in micellar media by a poly(2,2'-(1,4 phenylenedivinylene)-bis-8-hydroxyquinoline)-multiwalled carbon nanotube modified electrode. *Analytical Letters*, 49(8), 1240–1257.
- Filik, H., Avan, A.A., Aydar, S. ve Çakar, Ş. (2016). Determination of tocopherol using reduced graphene oxide-nafion hybrid-modified electrode in pharmaceutical capsules and vegetable oil samples. *Food Analytical Methods*, 9(6), 1745–1753.
- Food and Nutrition Board. (1989). *Recommended Dietary Allowances, 10th Edition*. Food and Nutrition Board, Commission on life Sciences, National Research Council.
- Gámiz-Gracia, L., Jiménez-Carmona, M.M. ve Luque de Castro, M.D. (2000). Determination of vitamins D₂ and D₃ in pharmaceuticals by supercritical-fluid extraction and HPLC separation with UV detection. *Chromatographia*, 51(7–8), 428–432.
- Garrido, J.M.P.J., Rahemi, V., Borges, F., Brett, C.M.A. ve Garrido, E.M.P.J. (2016). Carbon nanotube β -cyclodextrin modified electrode as enhanced sensing platform for the determination of fungicide pyrimethanil. *Food Control*, 60, 7–11.
- Gentili, A., Caretti, F., Bellante, S., Ventura, S., Canepari, S. ve Curini, R. (2013). comprehensive profiling of carotenoids and fat-soluble vitamins in milk from different animal species by LC-DAD-MS/MS hyphenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1628–1639.
- Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., de la Torre, M.C. ve López-Sabater,

- M.C. (2000). Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881(1–2), 251–254.
- Gomis, D.B., Fernández, M.P. ve Gutiérrez Alvarez, M.D. (2000). Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 891(1), 109–114.
- He, J.-L., Yang, Y., Yang, X., Liu, Y.-L., Liu, Z.-H., Shen, G.-L. ve Yu, R.-Q. (2006). β -Cyclodextrin incorporated carbon nanotube-modified electrode as an electrochemical sensor for rutin. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(1), 94–100.
- Institute of Medicine. (2000). *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. Washington, D.C.: National Academies Press.
- Iwase, H. (2000). Determination of vitamin D₂ in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction and column-switching high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, 881(1–2), 189–196.
- Jaiswal, P.V, Ijeri, V.S. ve Srivastava, A.K. (2001). Voltammetric behavior of α -tocopherol and its determination using surfactant+ethanol+water and surfactant+acetonitrile+water mixed solvent systems. *Analytica Chimica Acta*, 441(2), 201–206.
- Jeromiyas, N., Elaiyappillai, E., Kumar, A.S., Huang, S.-T. ve Mani, V. (2019). Bismuth nanoparticles decorated graphenated carbon nanotubes modified screen-printed electrode for mercury detection. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 95, 466–474.
- Karaźniewicz-Łada, M. ve Główka, A. (2016). A review of chromatographic methods for the determination of water- and fat-soluble vitamins in biological fluids. *Journal of Separation Science*, 39(1), 132–148.
- Kohlmeier, M. (2015). Fat-Soluble Vitamins and Nonnutrients. *Nutrient Metabolism* içinde (ss. 479–565). Elsevier.
- Kor, K. ve Zarei, K. (2013). β -Cyclodextrin incorporated carbon nanotube paste electrode as electrochemical sensor for nifedipine. *Electroanalysis*, 25(6), 1497–1504.
- Li, S.-G., Xue, W.-T. ve Zhang, H. (2006). Voltammetric behavior and determination of tocopherol in vegetable oils at a polypyrrole modified electrode. *Electroanalysis*, 18(23), 2337–2342.
- Liu, K., Fu, H., Xie, Y., Zhang, L., Pan, K. ve Zhou, W. (2008). Assembly of β -cyclodextrins acting as molecular bricks onto multiwall carbon nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(4), 951–957.
- Lovander, M.D., Lyon, J.D., Parr, D.L., Wang, J., Parke, B. ve Leddy, J. (2018). Critical Review—Electrochemical properties of 13 Vitamins: A critical review and assessment. *Journal of The Electrochemical Society*, 165(2), G18–G49.
- Ly, S.Y. (2008). Voltammetric analysis of DL- α -tocopherol with a paste electrode. *Journal of*

the Science of Food and Agriculture, 88(7), 1272–1276.

- Marcinowska-Suchowierska, E. ve Płudowski, P. (2016). Vitamin D toxicity. *Postępy Nauk Medycznych*, 29(10), 756–759.
- Marshall, C.W. (1983). *Vitamins and minerals help or harm?* (S. Barrett, Ed.). Philadelphia: George F. Stickley Company.
- McLaren, D. ve Frigg, M. (2001). *Sight and Life Guidebook on Vitamin A in Health and Disease*.
- Men, K., Chen, Y., Liu, J. ve Wei, D. (2017). Electrochemical detection of vitamin D2 and D3 based on a Au-Pd modified glassy carbon electrode. *Int. J. Electrochem. Sci*, 12, 9555–9564. doi:10.20964/2017.10.15
- Mène-Saffrané, L. (2017). Vitamin E biosynthesis and its regulation in plants. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(1).
- Michalkiewicz, S., Pryciak, M., Malyszko, J. ve Oszczudlowski, J. (2004). Voltammetric determination of α -tocopheryl acetate in pharmaceutical dosage forms. *Electroanalysis*, 16(11), 961–965.
- Mikheeva, E.V. ve Anisimova, L.S. (2007). Voltammetric determination of vitamin E (α -Tocopherol acetate) in multicomponent vitaminized mixtures. *Journal of Analytical Chemistry*, 62(4), 373–376.
- Momenbeik, F. ve Bagheri, N. (2015). Optimization of fat-soluble vitamins separations by reversed-phase liquid chromatography with the use of aliphatic alcohols as mobile phase additives. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(14), 1355–1360.
- Moreno, P. ve Salvadó, V. (2000). Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 870(1–2), 207–215.
- Nelson, D. L. ve Cox, M. M. (2013). *Lehninger principles of biochemistry* (6th ed.). New York: W.H. Freeman and Company.
- Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Tomás, V. ve Martín, J. (1999). Flow-injection fluorimetric determination of vitamin K₁ based on a photochemical reaction. *Talanta*, 50(1), 49–56.
- Rahemi, V., Garrido, J.M.P.J., Borges, F., Brett, C.M.A. ve Garrido, E.M.P.J. (2013). Electrochemical determination of the herbicide bentazone using a carbon nanotube β -cyclodextrin modified electrode. *Electroanalysis*, 25(10), 2360–2366.
- Rahemi, V., Vandamme, J.J., Garrido, J.M.P.J., Borges, F., Brett, C.M.A. ve Garrido, E.M.P.J. (2012). Enhanced host–guest electrochemical recognition of herbicide MCPA using a β -cyclodextrin carbon nanotube sensor. *Talanta*, 99, 288–293.

- Ramanathan, T., Fisher, F.T., Ruoff, R.S. ve Brinson, L.C. (2005). Amino-functionalized carbon nanotubes for binding to polymers and biological systems. *Chemistry of Materials*, 17(6), 1290–1295.
- Ravisankar, P., Reddy, A.A., Nagalakshmi, B., Koushik, O.S., Vijaya Kumar, B. ve Anvith, P. S. (2015). The comprehensive review on fat soluble vitamins. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 5(11), 12–28.
- Robledo, S.N., Zachetti, V. G.L., Zon, M.A. ve Fernández, H. (2013). Quantitative determination of tocopherols in edible vegetable oils using electrochemical ultrasensors combined with chemometric tools. *Talanta*, 116, 964–971.
- Rodrigo, N., Alegría, A., Barberá, R. ve Farré, R. (2002). High-performance liquid chromatographic determination of tocopherols in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, 947(1), 97–102.
- Sahoo, N.G., Rana, S., Cho, J.W., Li, L. ve Chan, S.H. (2010). Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes. *Progress in Polymer Science*, 35(7), 837–867.
- Salvetat, J.-P., Bonard, J.-M., Thomson, N.H., Kulik, A.J., Forró, L., Benoit, W. ve Zuppiroli, L. (1999). Mechanical properties of carbon nanotubes. *Appl. Phys. A*, 69, 255–260.
- Shearer, M. J. (1995). Vitamin K. *The Lancet*, 345(8944), 229–234.
- Shen, Q. ve Wang, X. (2009). Simultaneous determination of adenine, guanine and thymine based on β -cyclodextrin/MWNTs modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 632(1–2), 149–153.
- Shobha Jeykumari, D.R., Ramaprabhu, S. ve Sriman Narayanan, S. (2007). A thionine functionalized multiwalled carbon nanotube modified electrode for the determination of hydrogen peroxide. *Carbon*, 45(6), 1340–1353.
- Silva, R. de O., da Silva, É.A., Fiorucci, A.R. ve Ferreira, V.S. (2019). Electrochemically activated multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed electrode for voltammetric determination of sulfentrazone. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 835, 220–226.
- Song, W. O., Beecher, G.R. ve Eitenmiller, R.R. (2000). *Modern analytical methodologies in fat- and water- soluble vitamins*. New York, United States: John Wiley & Sons Inc. h
- Sýs, M., Jashari, G., Švecová, B., Arbneshi, T. ve Metelka, R. (2018). Determination of vitamin K1 using square wave adsorptive stripping voltammetry at solid glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 821, 10–15.
- Sýs, M., Švecová, B., Švancara, I. ve Metelka, R. (2017). Determination of vitamin E in margarines and edible oils using square wave anodic stripping voltammetry with a glassy carbon paste electrode. *Food Chemistry*, 229, 621–627.
- Sýs, M., Žabcíková, S., Cervenka, L. ve Vytras, K. (2016). Adsorptive stripping voltammetry in lipophilic vitamins determination. *Potravinárstvo*, 10(1), 260–264.

- Tan, Y.S., Urbančok, D. ve Webster, R.D. (2014). Contrasting voltammetric behavior of different forms of vitamin A in aprotic organic solvents. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(29), 8591–8600.
- Thangphatthanarungruang, J., Ngamaroonchote, A., Laocharoensuk, R., Chotsuwan, C. ve Siangproh, W. (2018). A novel electrochemical sensor for the simultaneous determination of fat-soluble vitamins using a screen-printed graphene/nafion electrode. *Key Engineering Materials*, 777, 597–601.
- Tütem, E., Apak, R., Günaydı, E. ve Sözgen, K. (1997). Spectrophotometric determination of vitamin E (α -tocopherol) using copper(II)-neocuproine reagent. *Talanta*, 44(2), 249–255.
- Waldenstedt, L. (2006). Nutritional factors of importance for optimal leg health in broilers: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 126(3–4), 291–307.
- Wang, X., Song, X.-J., Xuan, H. ve Yang, F. (2012). Preparation of β -cyclodextrin-modified multi-walled CNTs and its application in capturing β -naphthol from wastewater. *Micro & Nano Letters*, 7(9), 892–895.
- Wang, Z., Xiao, S. ve Chen, Y. (2006). β -Cyclodextrin incorporated carbon nanotubes-modified electrodes for simultaneous determination of adenine and guanine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 589(2), 237–242.
- Webster, R. D. (2012). Voltammetry of the liposoluble vitamins (A, D, E and K) in organic solvents. *The Chemical Record*, 12(1), 188–200.
- Zhang, Y., Zhou, W.-E., Yan, J.-Q., Liu, M., Zhou, Y., Shen, X., Ma, Y.-L, Feng, X.-S, Yang, J., Li, G.-H. (2018). A review of the extraction and determination methods of thirteen essential vitamins to the human body: An update from 2010. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(6).
- Ziyatdinova, G., Giniyatova, E. ve Budnikov, H. (2010). Cyclic voltammetry of retinol in surfactant media and its application for the analysis of real samples. *Electroanalysis*, 22(22), 2708–2713.
- Ziyatdinova, G., Morozov, M. ve Budnikov, H. (2012). MWNT-modified electrodes for voltammetric determination of lipophilic vitamins. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 16(7), 2441-2447.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Asiye Aslıhan AVAN
Doğum Yeri	Fatih
Doğum Tarihi	27.05.1985
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	asiye.avan@istanbul.edu.tr
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik Fakültesi
Bölümü	Kimya
Mezuniyet Yılı	22.06.2007

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya
Programı	Analitik Kimya Programı
Mezuniyet Yılı	09.10.2014

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Analitik Kimya Programı

Makale ve Bildiriler	
<p>Filik H., Avan A.A., Yetimoglu E.K. 2019. Multiwalled carbon nanotubes beta-cyclodextrin modified electrode for electrochemical determination of bisphenol S in water sample., <i>Russian Journal of Electrochemistry</i>, 55(2), 70-77.</p>	
<p>Kilicyaldir B., Avan A.A., Güçlü K., Özyürek M., Filik H. (2019). Electrochemical determination of rivastigmine hydrogen tartrate at beta-cyclodextrin/multi-walled carbon nanotubes modified electrode. <i>Current Pharmaceutical Analysis</i>, 15(3), 211-216.</p>	
<p>Filik H., Avan A.A. (2019). Dextran modified magnetic nanoparticles based solid phase extraction coupled with linear sweep voltammetry for the speciation of</p>	

- Cr(VI) and Cr (III) in tea, coffee, and mineral water samples. *Food Chemistry*, 292, 151-159.
- Avan A.A., Filik H. (2019). Visible light detection of dopamine enhanced by cloud point extraction. *Current Pharmaceutical Analysis*, 15(5), 528-534.
- Filik H., Avan A.A. (2018). Conducting polymer modified screen-printed carbon electrode coupled with magnetic solid phase microextraction for determination of caffeine", *Food Chemistry*, 242, 301-307.
- Avan A.A., Filik H. (2018). Electrochemical determination of dopamine using a graphene-screen-printed carbon electrode with magnetic solid-phase microextraction. *Analytical Letters*, 51(16), 2626-2642.
- Avan A.A., Filik H. (2018). CoFe₂O₄-MWCNTs Modified screen printed carbon electrode coupled with magnetic CoFe₂O₄-MWCNTs based solid phase microextraction for the detection of bisphenol A. *Current Nanoscience*, 14(3), 199-208.
- Filik H., Avan A.A., Aydar S. (2017) Electrochemical determination of nicotine poly (Alizarin red S) modified graphene screen-printed carbon electrode. *Current Nanoscience*, 13(1), 92-99.
- Filik H., Avan A.A. (2017). Simultaneous electrochemical determination of vitamin K1 and vitamin D3 by using poly (Alizarin Red S)/multi-walled carbon Nanotubes modified glassy electrode. *Current Analytical Chemistry*, 13(5), 350-360.
- Filik H., Avan A.A., Mumin Y. (2017). Simultaneous electrochemical determination of caffeine and vanillin by using poly(alizarin red S) modified glassy carbon electrode. *Food Analytical Methods*, 10(1), 31-40.
- Filik H., Avan A.A. (2017). Electrochemical determination of bisphenol A based on poly(chromotropic acid) modified glassy carbon electrode. *Current Analytical Chemistry*, 13(6), 464-473.
- Filik H., Avan A.A. (2017). Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction combined with magnetic-based dispersive micro-solid-phase extraction for determination of trace cobalt in water samples by FAAS", *Current Analytical Chemistry*, 13(6), 456-463.
- Filik H., Avan A.A., Aydar S. (2016). Simultaneous electrochemical determination of alpha-tocopherol and retinol in micellar media by a poly(2,2'-(1,4 phenylenedivinylene)-bis-8-hydroxyquinaldine)-multiwalled carbon nanotube modified electrode. *Analytical Letters*, 49(8), 1240-1257.
- Mumin Y., Filik H., Aydar S., Avan A.A. (2016) Electrochemical determination of brucine in urine with a poly(alizarin red S)-modified glassy carbon electrode", *Analytical Letters*, 49(17), 2716-2727.
- Filik H., Avan A.A., Aydar S., Ozyurt D., Demirata B. (2016). Determination of

- tetracycline on the surface of a high-performance graphene modified screen-printed carbon electrode in milk and honey samples. *Current Nanoscience*, 12(4), 527-533.
- Filik H., Avan A.A., Aydar S. (2016). Electrochemical determination of vitamin B-12 in food samples by poly(2,2'-(1,4-phenylenedivinylene) bis-8 hydroxyquinaldine)/multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. *Food Analytical Methods*, 9(8), 2251-2260.
- Filik H., Avan A.A., Aydar S., Cakar S. (2016). Determination of tocopherol using reduced graphene oxide-nafion hybrid-modified electrode in pharmaceutical capsules and vegetable oil samples. *Food Analytical Methods*, 9(6), 1745-1753.
- Filik H., Avan A.A., Aydar S. (2016). Voltammetric sensing of uremic toxin indoxyl sulfate using high performance disposable screen-printed graphene electrode. *Current Pharmaceutical Analysis*, 12(1), 36-42, 2016.
- Filik H., Avan A.A., Aydar S. (2016). Simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan with azure A-interlinked multi-walled carbon nanotube/gold nanoparticles composite modified electrode. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(3), 471-480.
- Filik H., Avan A.A., Aydar S. (2015). Nafion/multi-wall carbon nanotubes composite modified glassy carbon electrode for sensitive determination of bilirubin. *Current Nanoscience*, 11(6), 784-791.
- Filik H., Avan A.A., Aydar S., Apak M.R. (2015). Poly (rhodamine B) and MWCNTs composite film for the separation and simultaneous voltammetric quantification of tryptophan, paracetamol, uric acid, dopamine and ascorbic Acid. *Current Analytical Chemistry*, 11(2), 87-95.
- Avan A.A., Aydar S., Filik H. (2015). Voltammetric sensing of bilirubin based on nafion/electrochemically reduced graphene oxide composite modified glassy carbon electrode. *Current Analytical Chemistry*, 11(2), 96-103.
- Filik H., Aydar S., Avan A.A. (2015). Poly(2,2'-(1,4-phenylenedivinylene) Bis-8-hydroxyquinaldine) modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of paracetamol and p-aminophenol. *Analytical Letters*, 48(16), 2581-2596.
- Filik H., Avan A.A., Aydar S. (2014). Square-wave adsorptive stripping voltammetric determination of serotonin at glassy carbon electrode modified with safranin O", *International Journal of Electrochemical Science*, 9(6), 2922-2933.
- Filik H., Avan A.A., Aydar S., Arpaci R.B. (2014). Simultaneous electrochemical preconcentration and determination of dopamine and uric acid by square-wave adsorptive stripping voltammetry using a poly(safranin O)-modified glassy carbon electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 9(6), 2775-2789.

Filik H., Avan A.A., Aydar S., Cetintas G (2014). Determination of acetaminophen in the presence of ascorbic acid using a glassy carbon electrode modified with poly(caffeic acid). *International Journal of Electrochemical Science*, 9(1), 148-160.

Filik H., Cetintas G., Avan A.A., Aydar S., Koç S.N., Boz İ. (2013). Square-wave stripping voltammetric determination of caffeic acid on electrochemically reduced graphene oxide-Nafion composite film. *Talanta*, 116, 245-250.

Filik H., Cetintas G., Avan A.A., Koç S.N., Boz İ. (2013). Electrochemical sensing of acetaminophen on electrochemically reduced graphene oxide-nafion composite film modified electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(4), 5724-5737.

