

**T.C.  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
KİMYA BİLİM DALI**

**VOLTAMMETRİK YÖNTEMLE D-3 VİTAMİNİ (CHOLECALCIFEROL)  
TAYİNİ**

**Şerife KAHYA**

**Danışman  
Prof. Dr. Ali ÇELİK**



**MANİSA-2019**

**Şerife  
KAHYA**

**VOLTAMMETRİK YÖNTEMLE D-3 VİTAMİNİ (CHOLECALCIFEROL) TAYİNİ**

**2019**

## TEZ ONAYI

**Şerife KAHYA** tarafından hazırlanan  
Modifiye Camsı Karbon Elektrot Kullanılarak D3 Vitamininin (kolekalsiferol)  
Voltammetrik Tayini adlı tez çalışması 04.03.2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri  
önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim  
Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

**Danışman**                      **Prof. Dr. Ali ÇELİK** .....  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

**Jüri Üyesi**                      **Prof. Dr. Kenan DOST** .....  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

**Jüri Üyesi**                      **Doç. Dr. Nur AKSUNER** .....  
Ege Üniversitesi

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Şerife KAHYA**



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER .....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	II
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	III
TABLO DİZİNİ .....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. D Vitaminin Önemi .....	4
2.2. D Vitamini Sentezi .....	5
2.3. D Vitamininin Metabolizması .....	7
2.4. D Vitaminin Vücuttaki Düzeyleri ve Hastalıklarla Korelasyonu.....	8
2.5. D Vitamini Kaynakları .....	9
2.6. D Vitamini Tayin Yöntemleri .....	9
2.6.1. Ligand-Binding Yöntemler .....	11
2.6.1.1. RIA .....	11
2.6.1.2. Elektrokemilüminesans .....	11
2.6.2. Kromatografik Yöntemler.....	12
2.6.2.1. HPLC .....	12
2.6.2.2. LC-MS/MS.....	12
2.6.3. Elektroanalitik Yöntemler.....	13
2.6.3.1. Voltammetri .....	13
2.6.3.1.1. Dönüşümlü Voltammetri (CV) .....	19
2.6.3.1.2. Doğrusal Taramalı Voltammetri (LSV).....	20
2.6.3.1.3. Puls Teknikleri .....	21
2.6.3.1.4. Kare Dalga Voltammetrisi (SWV).....	21
2.6.3.1.5. Sıyırma Voltammetrisi .....	22
2.6.3.2. Voltammetrik Yöntem ile D Vitamini Çalışmaları.....	22
3. DENEYSEL KISIM.....	24
3.1. Çalışma Materyali .....	24
3.1.1. Kimyasallar.....	24
3.1.2. Cihazlar ve Yöntemler.....	25
3.1.3. Çözeltilerin Hazırlanması .....	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	26
4.1. Deney ve Sonuçlar .....	26
4.1.1. Destek Elektrolit Çözeltisinin Optimizasyonu .....	26
4.1.1.1. pH Denemeleri.....	26
4.1.1.2. İyonik Şiddet Denemeleri .....	27
4.1.2. Kolekalsiferolün Yalın Camsı Karbon Elektrot ve Modifiye Elektrotlardaki Elektrokimyasal Davranışı .....	29
4.1.2.1. Kolekalsiferolün Yalın Camsı Karbon Elektrottaki Elektrokimyasal Davranışı .....	29
4.1.2.2. Kolekalsiferolün MWCNT/GCE Üzerindeki Elektrokimyasal Davranışı .....	30
4.1.2.3. Kolekalsiferolün Au/MWCNT/GCE Üzerindeki Elektrokimyasal Davranışı .....	33

4.1.2.4. Kolekalsiferolün Pt/MWCNT/GCE Üzerindeki Elektrokimyasal Davranışı .....	33
4.2. Validasyon Çalışmaları .....	33
4.2.1. Doğrusallık .....	33
4.2.2. Tespit (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ) .....	34
4.2.3. Tekrarlanabilirlik .....	35
4.2.4. Oral Solüsyon da MWCNT/GCE Elektrot ile Kolekalsiferol Tayini .....	35
4.2.5. Oral Solüsyon da HPLC-DAD ile Kolekalsiferol Tayini.....	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	37
KAYNAKLAR .....	39
ÖZGEÇMİŞ .....	40



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{A}$	: Mikroamper
$^{125}\text{I}$	: Iyot 125
$^3\text{H}$	: Tritiyum
ACN	: Asetonitril
$\text{Al}_2\text{O}_3$	: Alüminyum oksit, alümina
Au	: Altın
CV	: Döngüsel Voltammetri
$\text{CH}_3\text{COOH}$	: Asetik asit
DMF	: Dimetil formamid
doy.	: Doygun
DMSO	: Dimetil sülfoksit
$\text{E}_{\text{ox}}$	: Oksidasyon pik potansiyeli
GC	: Gaz kromatografi
HCl	: Hidroklorik asit
HMDE	: Asılı civa damla elektrot
$\text{HNO}_3$	: Nitrik asit
$\text{H}_2\text{SO}_4$	: Sülfürik asit
$\text{H}_3\text{PO}_4$	: o-fosforik asit
$\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	: Dihidrojen heksakloroplatinat (IV) hidrat
$\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	: Hidrojen tetrakloroaurat (III) hidrat
IU	: International Unit
LC-MS/MS	: Kütle dedektörlü sıvı kromatografi cihazı
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Tayin limiti
LSV	: Doğrusal Taramalı Voltammetri
M	: Molar
MFE	: Civa film elektrot
$M_A$	: Molekül ağırlığı, g/mol
mM	: Mili molar
mV	: Mili volt
MWCNT	: Çok duvarlı karbon nanotüp

NaOH	: Sodyum hidroksit
N <sub>2</sub>	: Azot gazı
ng	: Nanogram
Pt	: Platin
PTFE	: Politetrafloroetilen, teflon
R <sup>2</sup>	: Korelasyon katsayısı
RIA	: Radyo immün test
RSD	: Bağlı standart sapma
s	: Saniye
SCE	: Doygun kalomel elektrot
SHE	: Standart hidrojen elektrot
SWV	: Kare dalga voltammetrisi
s	: Standart sapma
UV B	: 280-320 nm dalga boyunda ultraviyole B ışınları
V	: Volt
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı
HPLC-UV	: UV dedektörlü Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı
HPLC-DAD	: Diyot dizinli dedektörlü Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Vitamin D2 & Vitamin D3	Sayfa: 3
Şekil 2: Kalsiyum Metabolizması	Sayfa: 5
Şekil 3: D vitamini Sentezi	Sayfa: 6
Şekil 4: D Vitamini Sentezi Yolağı	Sayfa: 7
Şekil 5: D Vitamini Tayin Yöntemlerinin Sınıflandırılması	Sayfa: 10
Şekil 6: Potansiyostat Cihazının Şematik Gösterimi	Sayfa: 13
Şekil 7: Voltammetrik Teknikler İçin Potansiyel Uyarı Sinyalleri	Sayfa: 14
Şekil 8: Üçlü Elektrot Sistemine Örnek	Sayfa: 16
Şekil 9: (A) Dönüşümlü Voltammetride Elektroda Uygulanan Gerilim	Sayfa: 19
Şekil 9: (B) Elde Edilen Akım–Gerilim Eğrisi	Sayfa: 19
Şekil 10: (A) Taramalı Voltammetride Elektroda Uygulanan Gerilim	Sayfa: 20
Şekil 10: (B) Elde Edilen Akım–Gerilim Eğrisi	Sayfa: 20
Şekil 11: Kare Dalga Uyarı Sinyali Ve Polarogramı	Sayfa: 22
Şekil 12: Kolekalsiferol molekülünün yükseltgenmesine ait şema	Sayfa: 23
Şekil 13: (A) Deneysel çalışmalarda kullanılan Autolab PGSTAT128N voltammetri cihazı	Sayfa: 25
Şekil 13: (B) Deneysel çalışmalarda kullanılan Agilent 1260 Infinity G13118 Quat HPLC-DAD cihazı	Sayfa: 25
Şekil 14 : (A) $10^{-4}$ M kolekalsiferol standardının yalnız GCE ile çeşitli destek elektrolit çözeltilerindeki yükseltgenme pik akımları.	Sayfa: 28
Şekil 14: (B) $10^{-4}$ M kolekalsiferol standardının yalnız GCE ile $H_2SO_4$ çözeltisinin çeşitli konsantrasyonlarındaki döngüsel voltammogramları.	Sayfa: 28
Şekil 15: (A) $10^{-4}$ M kolekalsiferolün yalnız GCE ile çeşitli tarama hızlarında döngüsel voltammogramları.	Sayfa: 30

Şekil 15: (B) Yalın GCE üzerinde kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımı ile tarama hızının karekökünün ilişkisi.	Sayfa: 30
Şekil 16: (A) $10^{-4}$ M kolekalsiferolün MWCNT/GCE ile çeşitli tarama hızlarında döngüsel voltammogramları.	Sayfa: 31
Şekil 16: (B) MWCNT/GCE üzerinde kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımı ile tarama hızının karekökünün ilişkisi.	Sayfa: 32
Şekil 17: $10^{-4}$ M kolekalsiferolün yalın GCE ve MWCNT/GCE ile karşılaştırmalı döngüsel voltammogramları.	Sayfa: 32
Şekil 18: (A) MWCNT/GCE ile kolekalsiferol ölçümü için oluşturulan kalibrasyon eğrisine ait standart çözelti voltammogramları.	Sayfa: 34
Şekil 18: (B) MWCNT/GCE ile kolekalsiferol ölçümü için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.	Sayfa: 34
Şekil 19: Oral Solüsyon numunesi ve üzerine eklenen 0,25 mM ile 1 mM kolekalsiferole ilişkin voltammogramlar (tarama hızı 50 mV/s).	Sayfa: 36

## **TABLO DİZİNİ**

Tablo 1: Çeşitli pH aralığında hazırlanan destek elektrolit Çözeltilerinde kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımları	Sayfa: 26
Tablo 2: İyonik şiddet denemeleri için çalışma özeti	Sayfa: 27
Tablo 3: Doğrusallık çalışma sonuçları	Sayfa: 33
Tablo 4: Düşük seviye ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) ve yüksek seviye ( $1,0 \times 10^{-4}$ M) kolekalsiferol için kesinlik çalışma sonuçları	Sayfa: 34



## TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her aőamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren bilgi ve tecrübesi ile lisansüstü öğrenim hayatımın tüm zorlu aőamalarında maddi manevi her yönden yardımcı olan, tecrübeleri ile beni aydınlatan ve desteğini hiç eksik etmeyen, kendisini tanımaktan büyük onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali ÇELİK'e, deneylerimin DEFAM Laboratuvarında yapılmasına imkan sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa ESKİCİ' ye ve deneylerim sırasında her türlü imkan ve desteği veren, tecrübeleri ile beni aydınlatan değerli arkadaşım Arő. Gör. Dr. Mustafa CİTTAN' a, öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan aileme yürekten teşekkür ederim.

Şerife KAHYA  
Manisa, 2019

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### VOLTAMMETRİK YÖNTEMLE D-3 VİTAMİNİ ( CHOLECALCIFEROL) TAYİNİ

Şerife KÂHYA

Manisa Celal Bayar Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali ÇELİK

Bu çalışmada, kolekalsiferolün çok duvarlı karbon nanotüp modifiye camısı karbon elektrot üzerindeki elektrokimyasal davranışı, döngüsel voltammetri yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Hazırlanan modifiye elektrot yüzeyinde kolekalsiferolün voltammetrik tayini, doğrusal taramalı voltammetri yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.  $5 \times 10^{-5}$ - $1 \times 10^{-3}$  M konsantrasyon aralığında 0,9914 korelasyon katsayısı ile iyi bir doğrusallık elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla  $1,7 \times 10^{-5}$  ve  $5,1 \times 10^{-5}$  M olarak hesaplanmıştır. Önerilen elektrodun cevabı kolekalsiferolün belirlenmesi için yeterince tekrarlanabilirdir. Önerilen modifiye elektrot, 300.000 I.U kolekalsiferol/mL içeren ticari bir oral solüsyonda kolekalsiferol tayini için başarıyla uygulanmıştır. Oral solüsyondan kolekalsiferolü ekstrakte etmek için metanol kullanılarak gerçekleştirilen basit bir sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği izlenmiştir. Önerilen yöntem ile elde edilen sonuçlar, ticari oral solüsyonun kolekalsiferol içeriği ile uyum içerisindedir.

Anahtar Kelimeler: Voltammetri, kolekalsiferol, camısı karbon elektrot, çok duvarlı karbon nanotüp

2019, 55 sayfa

## **ABSTRACT**

**M.Sc. Thesis**

### **DETERMINATION OF VITAMIN D-3 (CHOLECALCIFEROL) BY USING VOLTAMMETRIC METHOD**

**Şerife KAHYA**

**Manisa Celal Bayar University  
Faculty of Science and Literature  
Department of Analytical Chemistry**

**Supervisor: Prof. Dr. Ali ÇELİK**

Herein, electrochemical behavior of cholecalciferol on a multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode was evaluated by using cyclic voltammetry. Voltammetric determination of cholecalciferol on the prepared modified electrode was carried out using linear sweep voltammetry. A good linearity was obtained with a correlation coefficient of 0,9914 between  $5 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$  M. The LOD and LOQ values were calculated as  $1,7 \times 10^{-5}$  and  $5,1 \times 10^{-5}$  M, respectively. The response of the proposed electrode was sufficiently repeatable for determining cholecalciferol. Finally, the proposed modified electrode was successfully applied to the determination of cholecalciferol in a commercial oral solution that contains 300.000 I.U cholecalciferol/mL. A simple liquid-liquid extraction technique by using methanol was followed to extract cholecalciferol from the oral liquid. The results obtained with the proposed method were in agreement with cholecalciferol content of the commercial oral solution.

Keywords: Voltammetry, cholecalciferol, glassy carbon electrode, multi walled carbon nanotube

**2019, 55 pages**

## 1. GİRİŞ

D vitamini, vücuttaki kalsiyum ve fosfor seviyelerinin düzenlenmesinde yer alan yağda çözünen vitaminler grubundan bir vitamindir. D vitamini, aynı zamanda kalsiyum ve fosfat emilimi ve metabolizmasındaki rolü ile kemik ve kas sağlığı açısından da çok önemli bir prohormondur [1]. D vitamini besin kaynaklarında neredeyse bulunmamaktadır. Bitkisel gıdalarda (örneğin sebzeler, meyveler veya tahıllar) bulunmazken, balık karaciğeri yağları ve balmumu yaprağı (*Solanum glaucophyllum*) gibi istisnalar dışında et ve diğer hayvansal gıda kaynaklarında düşük miktarda bulunmaktadır. İnsan vücudu D vitaminini sentezlemek için güneş ışığından ultraviyole B (UV B) radyasyonunu kullanır.

D vitamininin tayini için farklı temel ilkeye dayanan yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; kromatografik ayırmaya dayalı olarak yapılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ve sıvı kromatografi –kütle dedektörünün kullanıldığı LC-MS/MS yöntemleridir.

Literatürde D vitamininin elektrokimyasal özellikleri ve tayinine ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Özellikle dönüşümlü voltametri kullanılarak yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir.

Bu çalışmada, kolekalsiferolün MWCNT ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot (GCE) üzerindeki elektrokimyasal davranışı, döngüsel voltametri (CV) kullanılarak değerlendirilecek ve hazırlanan elektrot üzerinde kolekalsiferolün nicel tayini için optimum şartların belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışmayla belirlenen şartlar altında voltametri yöntemi kullanılarak piyasada takviye ilaç olarak kullanılan ticari solüsyonlarda D3- vitamini tayini hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

İlk vitaminin keşfedildiği 1910 yılından 1940'a kadar, McCollum ve Davis'in gerçekleştirdikleri ilk çalışmalar; D vitamininin tanımlanması, kemik oluşumunda ve kalsiyum düşüklüğüne bağlı kaslarda gelişen istemsiz kasılmaların önlenmesindeki rolüne ilişkin araştırmalara önemli katkı sağlamıştır [2].

İnsan vücudu D vitaminini sentezlemek için güneş ışığından ultraviyole B radyasyonunu kullanır. D vitamininin iki formu bulunmaktadır. Bunlar; Vitamin D3 (kolekalsiferol) ve Vitamin D2 (ergocalciferol)'dir.

D2 vitamini yapısı, 1931 yılında Askew ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmış [3] ve D3 vitamini yapısı Windaus ve arkadaşları tarafından sentetik yollarla belirlenmiştir [4].

D vitamini, normal olarak deride previtamin D üretmek amacıyla bir kolesterol türevine (7-dehidrokolesterol) etkiyen fotolitik süreç aracılığıyla üretilmektedir. Bu previtamin D ise daha sonra yavaşça D3 vitaminine izomerize edilmektedir. D3 vitamini, ciltte üretilen D vitamininin doğal formudur ve D2 vitamini, doğal koşullar altında planktonda belirli düzeye kadar gerçekleşen ergosterol ışınımından türetilmekte ve küf mantarından (ergot, yaklaşık % 2 ergosterol içerir) D2 vitamini üretmek için kullanılmaktadır. Diğer önemli bir husus, yaşam boyu D vitamininin gerekli olmasıdır. D vitamini kemik oluşumu için gerekli olması yanı sıra birçok farklı fizyolojik sistemde de önemli rol oynamaktadır. D vitamini, bazı vücutta çeşitli bozulmalara yol açan hastalıkların tedavisinde kullanılabilir ve ayrıca bir antikanser ajan olarak rol oynayabilir [5].

Bununla birlikte, 20. yüzyılın ikinci yarısından elde edilen bulgular, D vitamininin vitamin yerine bir prohormon olduğunu göstermiştir. D vitamini besin kaynaklarında neredeyse bulunmamaktadır. Bitkisel gıdalarda (örneğin sebzeler, meyveler veya tahıllar) bulunmazken, balık karaciğeri yağları ve balmumu yaprağı (*Solanum glaucophyllum*) gibi istisnalar dışında et ve diğer hayvansal gıda kaynaklarında düşük miktarda bulunmaktadır. İskeletin mineralleşmesine ve kandaki kalsiyum ve fosfor konsantrasyonlarının artmasına ek olarak, D vitamini paratiroid büyümesini ve paratiroid hormon üretimini düzenlediği bilinmektedir. Ayrıca pankreasın adacık hücrelerinde rol oynar, bağışıklık sistemi üzerinde önemli bir etkiye

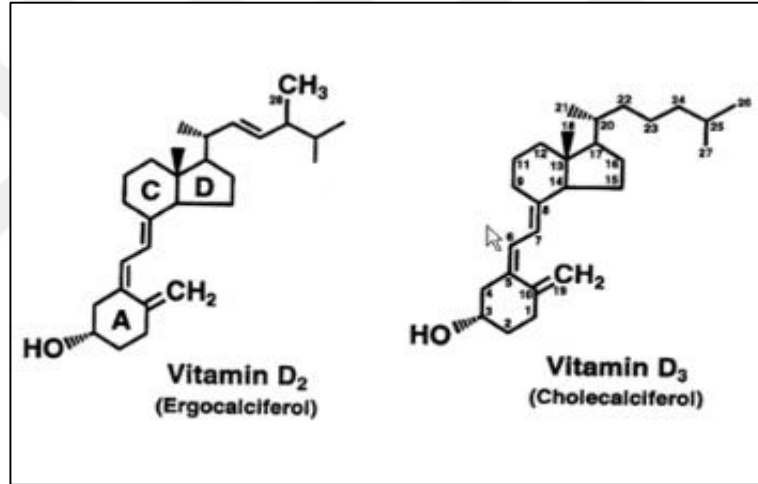


sahiptir ve bazı otoimmün hastalıkların ve kanserlerin baskılanmasına katkı sağlayabilir. D vitamini diyetinden maksimum fayda elde etmek ve belirtilen hastalıklara ilişkin riskleri azaltmak amacıyla tavsiye edilen D vitamini alım dozu yüksek olmalıdır [6].

D vitamininin iki formu bulunmaktadır (Şekil 1) [1]. Bunlar;

1. Vitamin D3 (kolekalsiferol),
2. Vitamin D2 (ergocalciferol)'dir [7].

Vitamin D3 formu hayvansal kaynaklı gıdalar tükettiğimizde ve güneş tarafından UV B radyasyonuna maruz kaldığımızda deri tarafından üretilir. Vitamin D2 bitkiler tarafından sentezlenir, takviyelerde bulunan formudur [1].



Şekil 1: Vitamin D<sub>2</sub> & Vitamin D<sub>3</sub>

Vitamin D vücutta 25-OH Vitamin D şeklinde depolanır. Vücuttaki D vitamini seviyesinin ölçümü için klinik olarak 25-OH Vitamin D kullanılır [1]. Vitamin D hormonunun hücre farklılaşması ve hücre büyümesi üzerindeki metabolizması kardiyovasküler sistem, merkezi sinir sistemi, endokrin sistemi ve bağışıklık sistemlerini etkilemektedir [8, 9].

## 2.1. D Vitaminin Önemi

D vitamininin aktif formu olan  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vücutta hormon gibi işlev gören bir maddedir.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  birçok hormon gibi kolesterolden sentezlenmektedir. Hormonlar vücutta 2 şekilde yol almaktadır:

1. Hücre zarından hücre içine girdikten sonra hücre içi sıvıda yüzerek hücrenin beyni olan hücre çekirdeğine ulaşırlar.
2. Hücre zarında “reseptör” denen bir algılayıcı moleküle bağlanır ve bu molekül yoluyla hücre beynine mesaj yollarlar.

D vitamini ikinci yolu tercih eder, birçok dokunun hücre zarlarında onu algılayan reseptörler yer almaktadır. D vitamini bu reseptörler aracılığıyla hücre beyne gerekli uyarıları göndermektedir. Beyinden gelen yanıtı göre gerekli genetik değişiklikler yapılarak, hedeflenen işlevler gerçekleştirilmektedir. D vitamini için bu işlev kimi zaman pankreas hücrelerinin insülin salınımını artırmak, kimi zaman da kansere karşı bağışıklık sisteminde hücrelerin aktivasyonunu sağlamaktır.

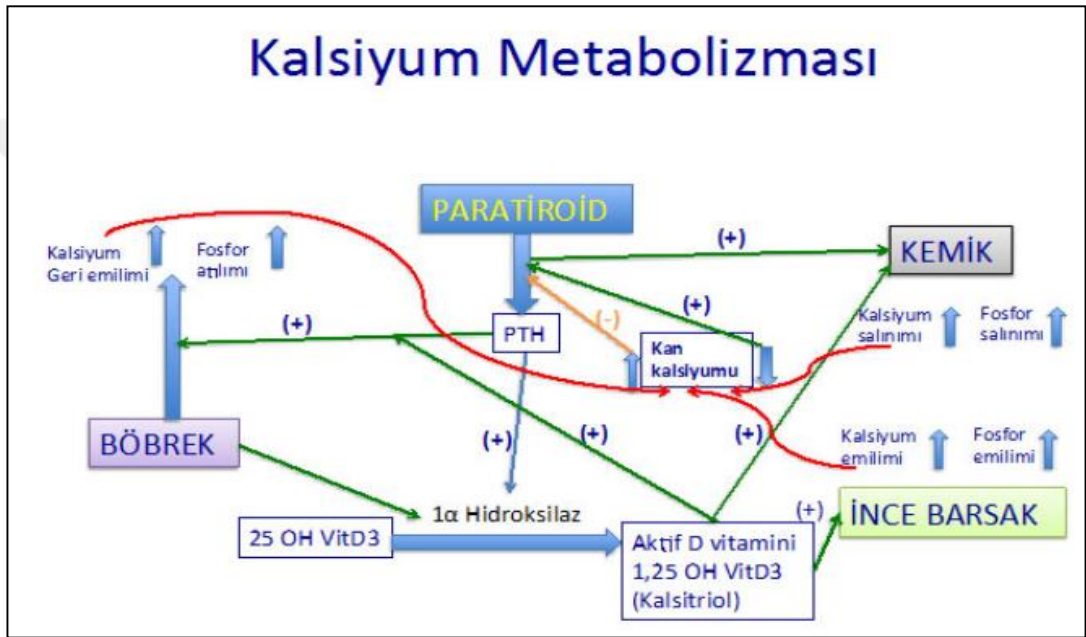
D vitamini, kimyasal bir mesajcı gibi davranarak gittiği hücrelerdeki iyon kanallarını açarak genetik düzeyde değişiklik yapan sinyaller taşır. Bu bağlamda etkilediği hücreler Şekil 2’ de görülmektedir. Bu hücreler;

- Bağışıklık sistemi hücreleri
- Mide
- Prostat
- Akciğer
- Kemik
- Paratiroid bezi
- Pankreasın insülin salgılayan hücreleridir.

Aktif D vitamini vücutta, dolaylı olarak 2000’den fazla geni etkilemektedir. Bu genler, vücuttaki toplam genlerin % 6’sını oluşturmaktadır. D vitamini, kemik metabolizması ve kalsiyum ve fosfor dengesinde (kalsiyum homeostazi) bilinen temel (kalsemik) etkilerinin yanı sıra kılcal damar hücreleri, damar düz kası, kalp kasının da dahil olduğu birçok dokuda, D vitamin reseptörünün varlığının gösterilmesiyle hücre ölümü (apoptoz), kan hücreleriyle alakalı ödemler (inflamasyon), hücre çoğalması gibi

kalsiyumla ilgili olmayan (non-kalsemik) fonksiyonlarda da etkisinin olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca yapılan son çalışmalarda hipertansiyon, kalp-damar (kardiovasküler) hastalıkları, insülin direnci ve çeşitli kanser türleri ile D vitamini eksikliği arasında ilişki gösterilmiştir [10, 11, 12].

D vitamininin kalsiyum dengesindeki rolü kalsiyumun bağırsaktan kemiklere taşınmasını sağlamaktır. Bu nedenle menopozda D vitamini seviyesi dolaylı olarak azaldığından, bireylerin kalsiyumca zengin gıdalar olsa dahi emilim sağlanmaması nedeniyle kemiklerde zayıflama olmaktadır.



Şekil 2: Kalsiyum Metabolizması

Kas hücreleri gibi insüline tepki veren hücrelerde kalsiyum mineralinin hücre içi ve dışı dengesi son derece önemlidir. Hücre içi kalsiyum seviyesinin çok hassas bir şekilde belirli düzeyde tutulması gerekmekte ve bu görevi D vitamini üstlenmektedir [13].

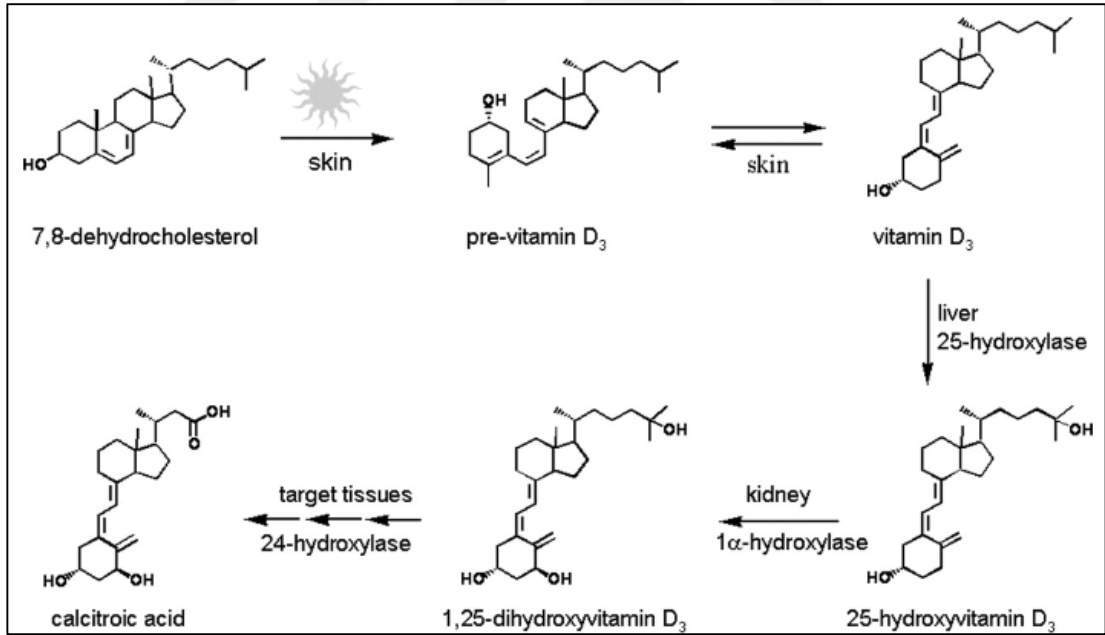
## 2.2. D Vitamini Sentezi

D vitamini sentezi Şekil 3' te yolağı da Şekil 4' te görüldüğü gibi kolesterolün oksidasyonu ile başlamaktadır. Kolesterol okside olarak 7-dehidrokolesterole dönüşür ve deriye iletilir. Bu molekül cilt üst derisinin hücrelerinin ve bağı dokusunun hücre zarlarında depolanmaktadır. Güneşten UV B radyasyon ışınları (UV B, 280-320 nm) ile öncü D vitaminine dönüşür [1].

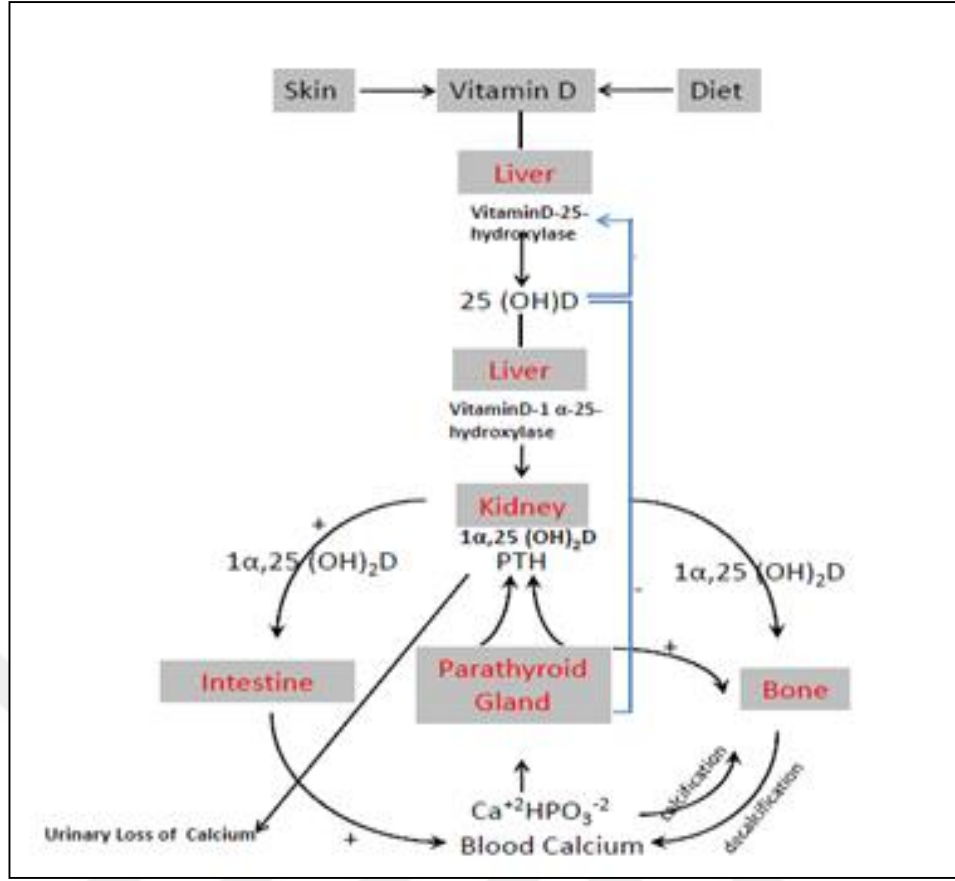
Deride oluşan veya dışarıdan alınan vitamin D, böbrekler ve karaciğerde seri enzimatik dönüşümler ile biyolojik aktif formuna dönüşür. D vitamini karaciğer ve böbreklere D vitamini bağlayıcı proteini ile taşınır [1].

Bağlayıcı proteine bağlanan Vitamin D karaciğerde karaciğer sitokrom enzimine transfer edilir. Burada 25-hidroksilaz enzimi tarafından vitaminin 25-OH Vitamin D [25-(OH)D] (Calcidiol) olarak adlandırılan büyük dolaşım formuna (25 numaralı karbona bir hidroksil eklenir) dönüşür. 25-hidroksilaz enzimi 25 konumundaki vitamin D2 ve vitamin D3' e eşit hidroksil bağlayabilmektedir. İnaktif 25-OH Vitamin D metabolitinin kan dolaşımında bağlayıcı proteine bağlanarak sirkülasyonu gerçekleşir. D vitamininin böbrek kanallarında hidroksile edilerek hormonal biyoaktif formu elde edilir.

Böbreklerde mitokondrial sitokrom enzimi 25-hidroksivitamin D-1  $\alpha$ -hidroksilaz tarafından 25-OH Vitamin D' den 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D] (Calcitriol)' e (1  $\alpha$  pozisyonundaki karbona hidroksil eklenir) dönüşür [1].



Şekil 3: D Vitamini Sentezi



Şekil 4: D Vitamini Sentezi Yolağı [1].

### 2.3. D Vitamininin Metabolizması

D vitamini metabolizmasının üç temel aşaması bulunmaktadır. Bunlar; 25-hidroksilasyon (25 numaralı karbona hidroksi bağlanması), 1α-hidroksilasyon (1α konumlu karbona hidroksi bağlanması) 24-hidroksilasyon (24 numaralı karbona hidroksi bağlanması). Bu aşamalar sitokrom karma işlevli oksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimler endoplazmik retikulumda ya da mitokondride bulunabilmektedir [14].

Serumda bulunan D vitamini ve metabolitleri, bol miktarda D vitamini bağlayıcı proteine (serum konsantrasyonları 4-8 mM) bağlanmaktadır. Diğer bir ifadeyle, serumda serbest D vitamini bileşiklerinin yalnızca çok küçük bir kısmı bulunmaktadır ve bunlar mitokondride bulunan enzimin substratlarıdır. [15].

#### 2.4. D Vitaminin Vücuttaki Düzeyleri ve Hastalıklarla Korelasyonu

Bireylerde D vitamini düzeylerinin belirlenmesinde sıklıkla dolaşımdaki 25-OH Vitamin D ölçümünden yararlanılmaktadır. Aktif form 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>' nin yerine bu formun kullanılmasının nedeni, dolaşımdaki yarılanma ömrünün 2-3 hafta kadar olması ve dolaşımda 1000 kat daha düşük düzeyde bulunan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ye göre ölçümünün daha güvenilir olmasıdır. Normal serum D vitamini düzeyi ile ilgili olarak net bir görüş birliği olmamakla birlikte dolaşımdaki serumda;

- $\geq 30$  ng/mL olması normal
- $< 20$  ng/mL olması D vitamini yetmezliği,
- 21-29 ng/mL arasında olması D vitamini eksikliği olarak tanımlanmaktadır [16].

D vitamini alımında günlük maksimum düzey 50 µg (2000 IU) olarak belirlenmiş, bu sınırın aşılması durumunda hipervitaminosis olarak tanımlanan toksik etki meydana gelebileceği ifade edilmiştir. Bu etki sonucunda kanda kalsiyum ve fosfor artacağı, böbreklerde kalsiyum ve fosfor tuzları birikeceği, kemik ve dişlerde kireç azalması görüleceği öngörülmektedir. Ayrıca toksik etkinin bazı çocuklarda ölüme bile yol açabildiği belirtilmektedir [17].

Literatürde D vitamini ve kanser ilişkisine dikkat çeken en eski çalışmalar 1951 ve 1955 yıllarına ait olup, çalışma konuları deri kanserinin yüksek doz D vitamini ile tedavi edilmesidir.

Hücrel araştırmalarda D vitamininin kanser hücrelerinin üremelerini yavaşlatıp, kanserli hücrelerin yok olmasını kolaylaştırdığı saptanırken; hayvan deneylerinde de D vitamini eksikliğinin kanser ve bozuk bağışıklık sistemi ile seyreden hastalıkların gelişimini artırdığı ifade edilmektedir [18].

Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalar, D vitamininin antikanserojen etki mekanizmalarını ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda ortaya konan mekanizmalar şu şekilde sıralanabilir [19]:

- Hücre büyümesini tetikleyen sinyallerin baskılanması,
- Hücre büyümesini inhibe eden sinyallerin tetiklenmesi,

- Hücre çoğalması, hücrelerin başka dokulara taşınması ve damar oluşumunun inhibisyonu

## 2.5. D Vitamini Kaynakları

Normal koşullarda insan vücudunun içerdiği D vitamininin %90-95'i güneş ışınlarının etkisiyle deride sentezlenmektedir. D vitamininin özellikle besinlerin içeriğine katılmaması durumunda, besinlerle alınan vitamin D'nin düzeyi azdır [20]. D vitamininin bulunduğu mantarlar dışındaki hayvansal ve bitkisel gıdalar şu şekilde sınıflandırılabilir:

Hayvansal gıdalar;

- Tereyağ,
- Süt,
- Yulaf,
- Yumurta sarısı,
- Sıvı yağlar,
- Karaciğer,
- Özellikle yağlı olan tuzlu su (deniz) balıklarından somon,
- Sardunya
- Ton balığında

Bitkisel gıdalar;

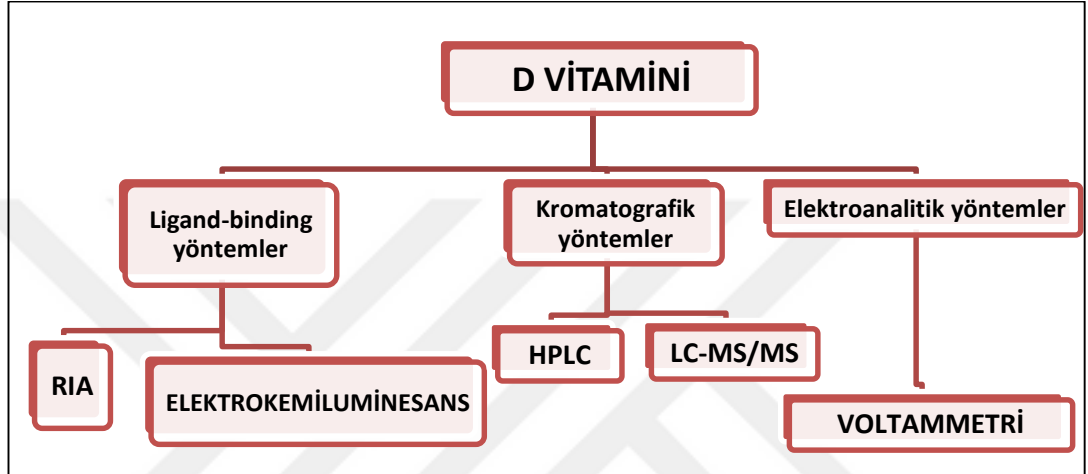
- Maydanoz,
- Isırgan otu,
- Tatlı patates
- Yonca

Morina balığının karaciğer yağı D vitamini açısından en zengin besin kaynağıdır. Ayrıca somon, uskumru, sardalya gibi diğer yağlı balık türleri, süt, yumurta sarısı, tereyağı, tatlı patates, yulaf, brokoli, maydanoz, yosun ve mantar gibi besinler yüksek miktarda D vitamini içermektedir. Ancak hiçbir gıda maddesi, insan vücudunun günlük D vitamini gereksinimini karşılayabilecek düzeyde D vitamini içermemektedir [21].

## 2.6. D Vitamini Tayin Yöntemleri

25-OH vitamin D'nin tayini birçok teknolojik yenilik ile beraber gelişmiştir. Yoğun iş gücü gerektiren ve pahalı ekipman ile büyük örnek hacimleri gerektiren yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirilmiştir. Çeşitli türlerden doğal olarak oluşan D vitamini bağlayıcı protein kullanılarak birçok deney geliştirilirken, önışlem adımları olarak ekstraksiyon veya kromatografik saflaştırma

gerektirmektedir. Bu analizler genellikle endojen D vitamini metabolitleri ile önemli etkileşimlere ve çapraz reaktivitelere maruz kalmıştır. Bağlanma protein analizleri,  $^3\text{H}$ - (trityum) ya da  $^{125}\text{I}$ - (iyot 125) etiketli işaretleyicilerin kullanıldığı radyoimmünoanalizler (RIA) ile değiştirilmiştir. Son zamanlarda, otomatik kemilüminesans bazlı analizler, vitamin D bağlayıcı protein veya serum 25-OH Vitamin D konsantrasyonlarının ölçümünde spesifik bir antikor kullanılarak kullanılabilir hale gelmiştir [22].



Şekil 5: D Vitamini Tayin Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Günümüzde kullanılan D vitamini ölçüm yöntemleri Şekil 5' te verilmiştir. Bunlara ek olarak Immunoassay yöntemleri ile de yapılabilmektedir. Immunoassay yöntemlerde kullanılan antikorların hangi D vitamini türevini tanıdığı önem kazanmaktadır [23].

İmmün testlerin dezavantajları olmasına rağmen avantajları da bulunmaktadır. Otomatik sistemler olması yanında verimli ve ucuz olmaları avantajları arasındadır. Ancak toplam D vitamini ölçümü konusunda yetersiz olması, D vitamini ile bağlayıcı proteini tam verimli ayıramaması, örnek matris etkilerine dayanıklı olamaması dezavantajları arasındadır. Kromatografik yöntemler immün yöntemlere göre daha uzun, daha karmaşık ve daha pahalı yöntemlerdir. Kromatografik yöntemler D vitamini ile bağlayıcı proteini tam verimli ayırabilen ve D2 ve D3 vitaminlerini ayrı ayrı ölçebilen kesinlikte yöntemlerdir [24].



## 2.6.1. Ligand-Binding Yöntemler

### 2.6.1.1. RIA

Radyoimmunoassay (RIA), çok yüksek duyarlılığa sahip bir antijenin varlığını ölçen *in vitro* bir testtir. Temel olarak belirli bir antikorun mevcut olduğu herhangi bir biyolojik madde, dakikalık konsantrasyonlarda bile ölçülebilir. RIA yöntemi, radyoizotop etiketlemenin yüksek duyarlılığını immünolojik reaksiyonların belirginliği ile birleştirmektedir. Bu prosedür, çeşitli eser miktardaki biyolojik maddelerin analizi için klinik kimya alanında geniş çapta uygulanmaktadır [25].

RIA'da hedef antijen radyoaktif olarak etiketlenmekte ve spesifik antikorlarına bağlanmaktadır (sınırlı ve bilinen belirli bir antikor miktarı eklenmelidir). Daha sonra etiketlenmiş antijenlerin ve spesifik antikorlarla serum numunesinden etiketlenmemiş antijenlerin hazırlanışından bir reaksiyon başlatmak amacıyla örnek eklenmektedir. Antikora ilişkin rekabetçi reaksiyon, belirli bir miktarda etiketli antijeni serbest bırakmaktadır. Bu miktar, etiketlenen ve etiketlenmeyen antijen oranı ile orantılıdır. Daha sonra serum numunesinde antijen miktarının türetilmesini mümkün kılan bir bağlanma eğrisi üretilebilmektedir. Bu reaksiyon, etiketlenmemiş antijen konsantrasyonu arttıkça etiketlenen varyantı yer değiştirerek antikora bağlandığı anlamına gelmektedir. Bağlı antijenler daha sonra bağlanmamış olanlardan ayrılır ve süpernatantta kalan serbest antijenlerin radyoaktivitesi ölçülür. Bilinen bir standart kullanılarak bir bağlanma eğrisi oluşturulabilir ve bu da numunedeki antijenlerin miktarının türetilmesini sağlar.

Genellikle  $^{125}\text{I}$  etiketleri kullanılırken,  $^{14}\text{C}$  ve  $^3\text{H}$  gibi diğer izotoplar da tercih edilmektedir. Yüksek düzeyde spesifik aktiviteli radyoizotop ( $^{125}\text{I}$ ) antijen, saf antijenin tirozin kalıntısı/kalıntıları üzerindeki kloramin-T veya peroksidaz yöntemleri ile iyodinasyonu aracılığıyla hazırlanmakta ve daha sonra radyoizotop antijeni serbest izotoptan jel filtrasyon veya HPLC aracılığıyla ayırmaktadır [26].

### 2.6.1.2. Elektrokemilüminesans

Otomatik kemilüminesans temelli analizler, vitamin D bağlayıcı protein veya serum 25-OH Vitamin D konsantrasyonlarının ölçümünde spesifik bir antikor aracılığıyla kullanılabilir hale gelmiştir. Bu analizler, D vitamini değerlendirmesinin genel uygulayıcılar için daha erişilebilir olmasını sağlama potansiyeline sahiptir.

Modern klinik laboratuvarlar için test metodolojilerinin doğrulanmasının zorunlu olduğu kabul edilmektedir [22].

Elektrokemilüminesans yöntemi, D vitamini kiti kompetitif immunoassay prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde D vitamini bağlayıcı proteini Rutenyum ile işaretli ve işaretli ve işaretli formu vitamin D2 ve vitamin D3'e bağlanmak için rekabet etmektedir [23].

## **2.6.2. Kromatografik Yöntemler**

### **2.6.2.1. HPLC**

HPLC yöntemleri geçmişte altın standart olarak kabul görmüştür. Daha fazla numune hacmi gerektirmesi, yoğun insan gücüne ihtiyaç duyması ve analizin uzun zaman gerektirmesi, HPLC'nin dezavantajlarındandır. HPLC-UV teknikleri aynı anda 25 (OH) D2 ve 25 (OH) D3 seviyelerini de belirleyebilmektedir [27].

Günümüzde EN 12821 gıda maddelerinde ergokalsiferol ve kolekalsiferol tayini için standart analitik yöntem kullanılmaktadır. Seçilen gıda maddelerinden sabunlaşma sonrası vitaminler uygun bir çözücü ile ekstrakte edilmektedir. Bu vitaminlerin uygun örnek ekstraktlarda belirlenmesi genellikle normal fazlı yarı-verimli HPLC ve ardından ters fazlı analitik HPLC ile gerçekleştirilir [28].

### **2.6.2.2. LC-MS/MS**

Son yıllarda "altın standart yöntem" olarak kabul gören LC-MS/MS, kullanmış olduğu internal standartlar ve fizikokimyasal metodundan dolayı doğru ve kesin sonuçlar vermektedir. HPLC'ye göre daha hızlı sonuç vermekte ve daha düşük numune hacmi kullanmaktadır. 25 (OH) D2 ve 25 (OH) D3 ayrımını yapabilmektedir [29]. Örnekteki bileşiklerin kolaylıkla hareket edebilen iyonlara (çoğunlukla pozitif) dönüştürülmesi ve bu iyonların kütle/yük oranına göre sıralanmasıyla elde edilir. İyonizasyon işleminde, çoğunlukla kütle dağılımı ana maddeye göre özel olan, bir pozitif tanecikler serisi meydana gelir. Kütle spektrometresi de bu gerçek üzerine kurulmuştur. Bir kütle spektrumu kimyasal yapı hakkında önemli bilgiler verir.

LC-MS/MS nispeten daha duyar ve kesin bir yöntem olmasına rağmen, çoğu laboratuvar, deneyimli personel ve yüksek maliyetli alet ekipman gerektirmesi sebebiyle bu yöntemi kullanmaktan kaçınmaktadır [30].

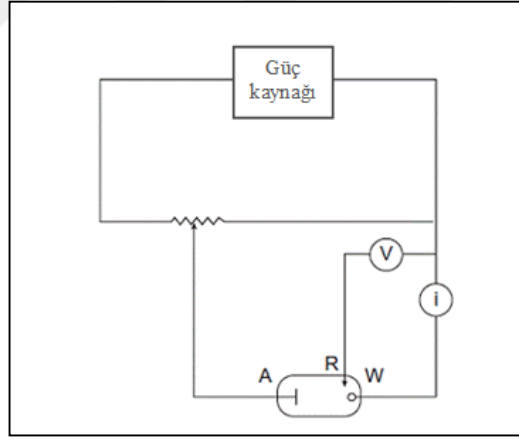
## 2.6.3. Elektroanalitik Yöntemler

### 2.6.3.1. Voltammetri

Voltammetri, elektroda uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesine dayalı potansiyel kontrollü dinamik bir elektrokimyasal yöntemdir. Voltammetri, derişim polarizasyon şartları altında bir elektrokimyasal hücrede oluşan akımın ölçülmesine dayanan, elektrokimyasal süreçler içerisinde akım ve potansiyel arasındaki ilişkinin katı elektrot (membran, metalik, karbon elektrot) kullanılarak ölçüldüğü teknikler topluluğudur [31, 32].

Analizi yapılacak uygun çözelti ile doldurulan elektroliz hücresine gittikçe artan potansiyel farkları uygulanır ve hücreden geçen akım değerleri okunur. Potansiyel farka karşılık akım grafiğı oluşturulduğunda elde edilen eğri voltammogramdır [32].

İlk voltammetrik teknikler yalnızca 2 elektrodun kullanımına dayanmasına rağmen, modern voltammetri şekilde şematik olarak gösterilen 3'lü potansiyostatından yararlanılmaktadır.



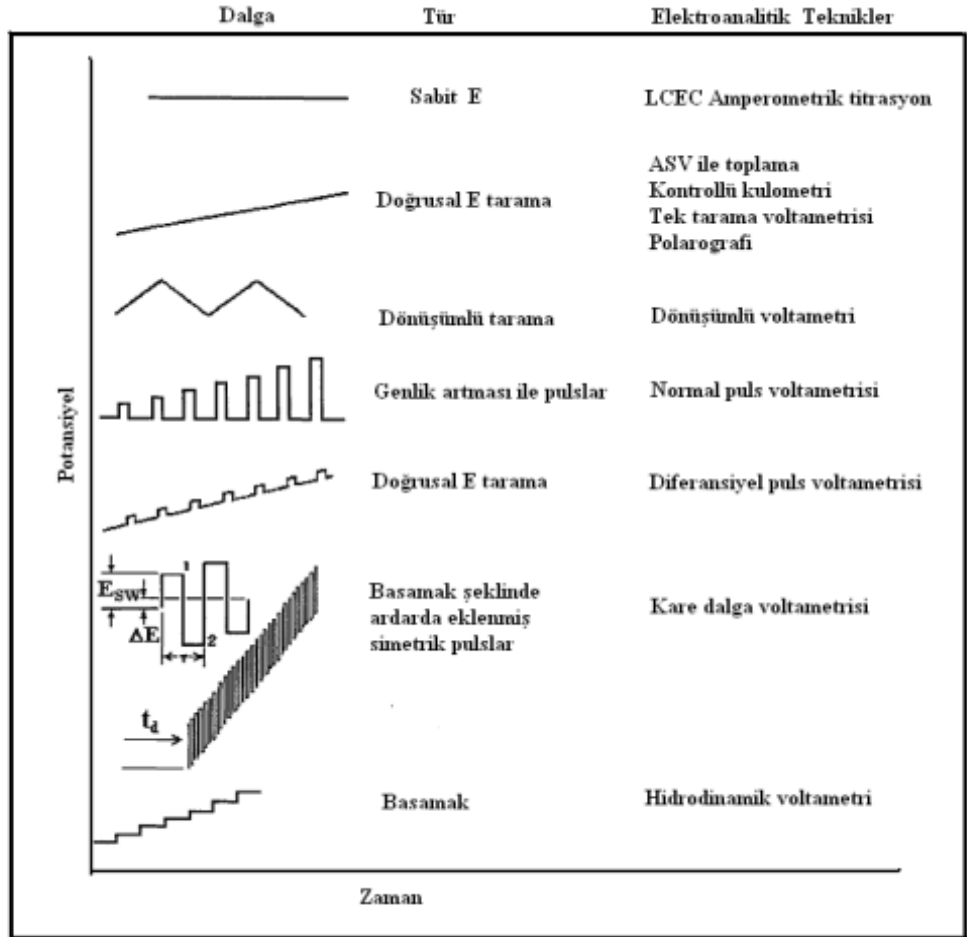
Şekil 6: Potansiyostat Cihazının Şematik Gösterimi

- A: Yardımcı elektrot
- R: Referans elektrot
- W: Çalışma elektrodu
- i: Galvanometre

Voltammetri analitik uygulamaları dışında, anorganik, fizikokimya ve biyokimyada, çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme-indirgenme olaylarının ve adsorbsiyon olaylarının incelenmesinde ve kimyasal olarak modifiye edilmiş

elektrot yüzeylerindeki elektron aktarım mekanizmaları gibi bazı temel araştırma alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Voltammetride çeşitli sinyal dalga şekillerine göre voltammetrik tekniklerin isimlendirilmesi aşağıda Şekil 7’ de verilmiştir.



Şekil 7: Voltammetrik Teknikler İçin Potansiyel Uyarı Sinyalleri

Voltammetri deneyleri üçlü elektrot sisteminde gerçekleşir (Şekil 8). İncelenen elektrokimyasal olayın gerçekleştiği elektrot potansiyeli değişen elektrot olup çalışma elektrodu adını almaktadır. Çalışma elektrodunun işlevi elektrokimyasal ölçüm bölgesini oluşturmaktır.

Çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesinden dolayı oluşan akım katodik akım, yükseltgenmesinden dolayı oluşan akım ise anodik akım olarak tanımlanmaktadır. Çalışma elektrotları amaca bağlı olarak soy (inert) veya soy

olmayan metallere seçilebilmekte ve voltammetride sıklıkla GC, Pt, Au, HMDE ve MFE tercih edilmektedirler.

Genel anlamda bir çalışma elektrodu;

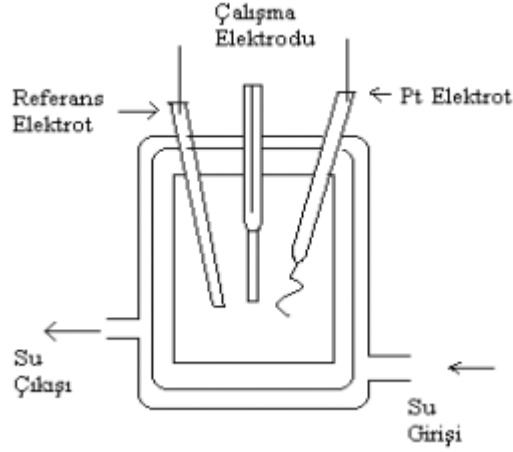
- iletken olmalı,
- Çalışılan potansiyel aralığında inert olmalı,
- negatif potansiyel sınırı yüksek olmalı,
- istenilen geometrik Şekil kolaylıkla verilebilir ve kolay işlenebilir olmalıdır.

İkinci türden metalik elektrotlar olarak bilinen referans elektrotların potansiyeli deney süresince sabit kalır ve polarize olmayan elektrotlardır. Referans elektrodun potansiyeli oldukça sabit olup, hücrede potansiyeli ölçülen diğer elektrotların kıyaslanması için referans kabul edilmektedir. Referans elektrot olarak Ag/Ag<sup>+</sup>, Ag/AgCl, SHE ve SCE sıklıkla kullanılmaktadır.

İdeal bir referans elektrot;

- tersinir olmalı ve Nernst eşitliğine uymalı,
- potansiyeli zamanla değişmemeli,
- az miktarda akım geçmesi ile potansiyelinde değişme olmamalı,
- potansiyeli, sıcaklık değişimlerinden fazla etkilenmemelidir.

Karşıt elektrot olarak ta adlandırılan üçüncü elektrot yardımcı elektrottur. Yardımcı elektrotlar elektronlar için kaynak oluşturarak pilden akımın geçmesini sağlamaktadır. Genellikle soy metallere seçilen yardımcı elektrotların potansiyeli bilinmemekte ve ölçülmemektedir.



Şekil 8: Üçlü Elektrot Sistemine Örnek

Dengedeki bir elektrokimyasal hücreye dışarıdan denge potansiyelinden farklı bir potansiyel uygulanırsa, sistem yeniden dengeye ulaşmaya çalışır ve bu sırada bir elektrot tepkimesi olur, yani akım geçer. Voltammetrik hücrede yer alan ve alanı çok küçük olan bir mikro çalışma elektrodu ile bir karşılaştırma elektrodu arasına uygulanan ve değeri zamanla değiştirilen potansiyele karşı, çalışma elektrodu ile karşıt elektrot (iki elektrotlu hücrelerde çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu) arasındaki akım ölçülür.

Voltammetride, herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektroda uygulanabilecek potansiyel aralığının sınırları, kullanılan çalışma elektrodu, çözücü ve elektrolitin türlerine bağlıdır.

Elektrokimyasal bir hücrede kullanılan elektrolit çok basit bir sulu çözücü, tuz karışımlarının çözeltisi, bir pasta veya bir katı hatta bir gaz dahi olabilir. Ancak, özellikle bu son sayılan elektrolitler kimyadan çok fiziğin alanına girmektedir. Genel olarak bir elektrolit bir kaç bileşen içerir ve bu bileşenlerin her biri hücrede yapılan gözlemi etkiler. Bu bileşenler; çözücü, destek elektrolit, tampon ve diğer maddelerdir.

Esas olan çözücünün varlığıdır. Ancak, diğer bileşenler de hemen hemen daima bulunur. Çözücülerde aranan en önemli özellik yüksek dielektrik sabitine sahip olmasıdır. En çok kullanılan çözücüler ve dielektrik sabitleri; su, 80; DMF, 36.7; DMSO, 46.7 ve ACN, 37.5 'dir. Polaritesi daha düşük çözücüler de voltammetrik çalışmalarda kullanılabilir. Ancak, yeterince iletkenliği sağlamak için ortama destek

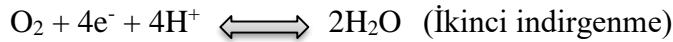
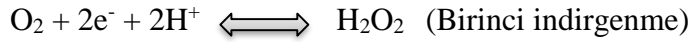
elektrolit ilave edilir. Çeşitli tuzlar, asitler ve bazlar sulu ortamda destek elektrolit olarak kullanılabilir.

Elektroanalitik ölçümlerin çoğu sulu ortamda yapılmaktadır. Bu nedenle su en önemli elektrokimyasal çözücülerden biridir. Çok yüksek saflıkta elde edilebilmesi, ucuzluğu, toksik olmaması, başka çözücülere kıyasla çok fazla sayıda ve türde maddeyi çözebilmesi suyun en büyük avantajlarıdır. Dezavantajı ise özellikle büyük moleküllü organik bileşikler yeterince çözmemesi ve protik bir çözücü olmasıdır.

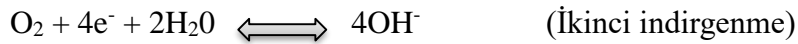
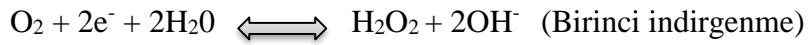
Ortamın iletkenliğini ve elektroaktif maddenin elektrot yüzeyine yalnızca difüzyonla taşınmasını sağlamak için destek elektrolit kullanılır. Destek elektrolit bu göreve ek olarak bazı uygulamalarda ortamın pH' sını ayarlayan bir tampon ya da ortamda bazı iyonları kompleksleştiren bir ligand görevini de görebilir.

Ayrıca normal şartlarda havayla dengede olan bir çözeltideki çözünmüş olarak bulunan elektroaktif oksijen molekülü konsantrasyonu  $2 \times 10^{-4}$  M 'dır. Bu konsantrasyondaki oksijen oldukça belirgin bir pik verir. Bu pik hem asidik hem de bazik ortamda aşağıdaki tepkimeleri meydana getirir:

Asidik çözeltide;



Nötral veya bazik çözeltide;



Bu reaksiyonların ortamda gerçekleşmesinin istenmediği durumlarda elektroliz ortamında inert bir gaz, genellikle  $\text{N}_2$ , uzun bir süre geçirilmelidir.

Genel voltammetrik ölçümler için kullanılan elektrokimyasal hücreler, 5–50 mL çözelti ile çalışabilecek şekilde yapılmıştır. Teflondan yapılmış kapağa elektrotlar takılır. Bir ince boru yardımıyla çözeltiden  $\text{N}_2$  gazı geçirilir. Hücre yüzeyde adsorpsiyon yapmayan camdan imal edilmiştir. Sıcaklık kontrolünün gerektirdiği

ölçümlerde hücrenin dış kısmında suyun dolaşmasına izin veren özel hücreler kullanılmaktadır.

Elektrokimyasal hücreler iki elektrotlu ve üç elektrotlu olmak üzere sınıflandırılabilir. İki elektrotlu hücrelerde bir çalışma elektrodu ile referans elektrot bulunur. Referans elektrot uygun yapılmışsa potansiyeli, çözültiden akım geçişiyle değişmez. Ancak bazı durumlarda çalışma elektrodunun potansiyeli özellikle çözülti direncinden dolayı değişmektedir. Bu nedenle direnci düşük çözültinin kullanılmaması veya elektrodun birbirine çok yakın yerleştirilmesi gereklidir. Bu problemlerin ortadan kaldırılması için üç elektrotlu hücreler gelişmiştir. Üç elektrotlu sistemde çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrot bulunur. Üç elektrotlu hücrelerde çalışma elektrodu ve referans elektrodun yerleşmeleri oldukça esnekler. Ek olarak diğer bir avantajı, akım referans elektrot üzerinden geçmez. Ek bir devreyle potansiyel çalışma elektrodu ile referans elektrot arasında kontrol edilir, fakat çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasındaki hücre akımı ölçülür.

Bir elektrokimyasal hücrenin çalışması sırasında maddenin elektrot yüzeyine aktarımı üç yolla olur. Bu elektron aktarımı yolları, elektriksel göç (migrasyon), difüzyon ve karıştırma (konveksiyon) olarak adlandırılır. Elektrokimyasal hücredeki katot ile anot arasındaki potansiyel farkı elektriksel bir alan oluşturur. İyonlar bu alanın etkisiyle ters yüklü elektrotlara doğru hareket etme eğilimi içine girerler ve böylece elektriksel göç adı verilen bir olayla madde aktarımı olur. İyonların elektriksel alandaki hareket hızları, iyon yüküne, büyüklüğüne ve çalışılan ortamdaki yönlenme biçimine bağlıdır. Deneysel koşullara bağlı olarak bu olaylardan birisi veya bir kaçını kütle aktarımına katkıda bulunabilir. Hücredeki elektrotta tüketilen elektroaktif maddenin ara yüzeyde azalan derişimini arttırmak üzere, çözültiden madde aktarımı olayı difüzyon adını alır. Difüzyonla kütle aktarımının hızı, ara yüzeyle çözültinin iç kesimleri arasındaki derişim farkına ve elektroaktif madde ile çözücünün türlerine bağlıdır. Her maddeye özgü difüzyon hızını belirten bir difüzyon katsayısı,  $D$ , vardır. Çözültinin karıştırıldığı durumlarda elektrot ara yüzeyine konveksiyon yolu ile de madde aktarılır [32].

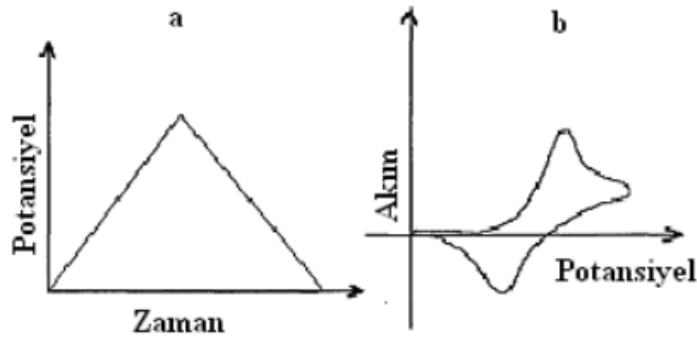


### 2.6.3.1.1 Dönüşümlü Voltammetri (CV)

İletken bir maddeyi içeren durgun bir çözeltideki çalışma elektroduna zamanla doğrusal olarak artan bir potansiyel uygulandığında akım–potansiyel eğrisinin bir pik şeklinde çıktığı görülür. Bu uygulamada potansiyel taraması ileri yönde belli bir potansiyel değerine ulaştıktan sonra yine doğrusal olarak azalacak biçimde ters çevrilirse, bu tekniğin adı dönüşümlü voltammetri olur. Dönüşümlü voltammetride ileri ve geri yöndeki potansiyel tarama hızları aynı tutulabildiği gibi, istenildiğinde farklı tarama hızları da kullanılabilir. Ayrıca ileri ve geri yöndeki tarama bir kez yapılabildiği gibi, birçok kez de yapılabilir.

Elektroda hızlı bir potansiyel taraması uygulandığı zaman potansiyel, standart indirgenme potansiyeli değerine yaklaşır ve madde indirgenmeye başlar. Potansiyel negatif değerlere ulaştıkça elektrot yüzeyindeki maddenin indirgenme hızı ve buna bağlı olarak da daha fazla madde indirgeneceğinden akım değeri artar. İndirgenme hızı arttıkça akımı, elektrot yüzeyine difüzyonla gelen madde miktarı kontrol etmeye başlar. Difüzyon tabakası zamanla kalınlaşacağı için difüzyon hızı ve dolayısıyla akım azalır.

Şekil 9 'da dönüşümlü voltammetri tekniğine ait potansiyel uyarı sinyal türü ve dönüşümlü voltammetri kullanılarak elde edilen voltammogramda akım–potansiyel ilişkisi gösterilmiştir.



Şekil 9: a) Dönüşümlü Voltammetride Elektroda Uygulanan Gerilim  
b) Elde Edilen Akım–Gerilim Eğrisi

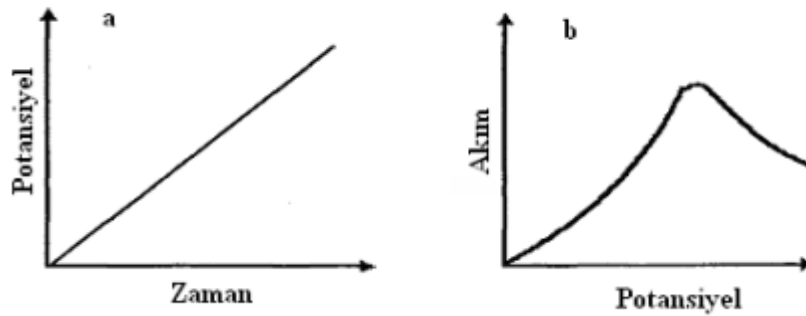
Dönüşümlü voltammetri tekniğinde, tarama hızı değiştirilerek pik yüksekliklerinin tarama hızı ile değişiminden adsorpsiyon, difüzyon ve elektron aktarım sayısına eşlik eden kimyasal reaksiyon olaylarının var olup olmadığı ve varsa büyüklüğü belirlenebilir.

Ayrıca ileri ve geri tarama piklerinden reaksiyon mekanizması hakkında fikir edinilip, kinetik veriler de elde edilebilir. Dönüşümlü voltammetri birçok alanda kullanılır. Bu tekniğin kullanım alanlarını;

- kantitatif analizler,
- yüzey modifikasyonu,
- elektrot reaksiyonlarının kinetiklerinin incelenmesi,
- çeşitli fizikokimyasal sabitlerin bulunması ( $D$ ,  $n$ ,  $i$ ,  $K$ ,  $E$ ,  $\alpha \dots$ ),
- adsorpsiyon olaylarının incelenmesi,
- elektrot reaksiyonlarının mekanizmalarının incelenmesi ve
- kompleks yapıların belirlenmesi olarak sıralayabiliriz [32].

#### 2.6.3.1.2 Doğrusal Taramalı Voltammetri (LSV)

Elektroaktif bir madde içeren karıştırılmayan çözeltide bir mikro elektrot ile referans elektrot arasında doğrusal olarak artan bir potansiyel programı uygulanır ve bu sırada geçen akım ölçülürse, bu yöntemle doğrusal taramalı voltammetri denir. Doğrusal taramalı voltammetri tekniğinde potansiyel tarama hızı 0.01–1000 V/s arasında değiştirilebilen önemli bir deneysel değişkendir. Şekil 10' da elektroda uygulanan potansiyel programı ve elde edilen voltammogram görülmektedir [32].



Şekil 10: a) Taramalı Voltammetride Elektroda Uygulanan Gerilim  
b) Elde Edilen Akım–Gerilim Eğrisi

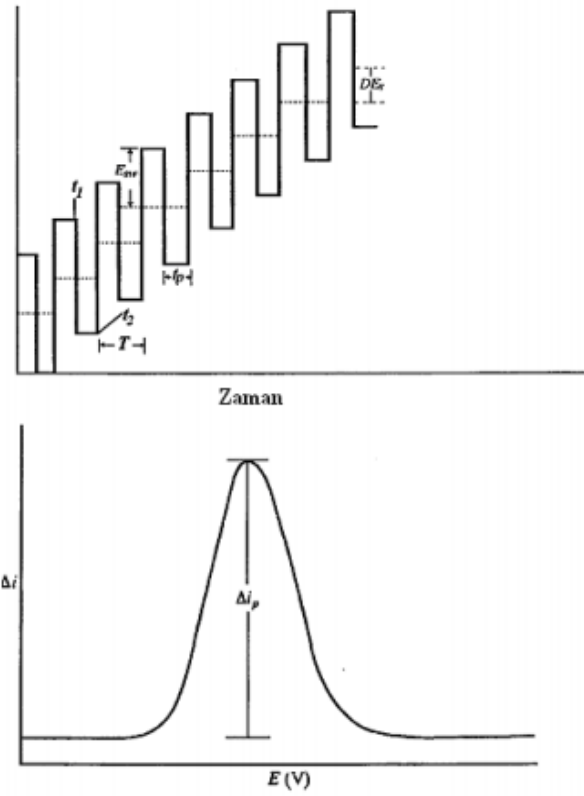
### **2.6.3.1.3 Puls Teknikleri**

Puls voltammetri tekniği, destek elektrolit yükleme akımını ortadan kaldırmak için geliştirilmiş ve bundan dolayı voltammetrik ölçümlerin tayin sınırı daha da düşmüştür.

Faradayik akım/yükleme akım oranını artırmak için basamaklı, normal puls ve kare dalga gibi bir kaç dalga şekli kullanılmıştır. Potansiyel pulsunun uygulanması yaklaşık 50 ms kadar sürer. Potansiyel adımından sonra yükleme akımı çok hızlı bir şekilde ihmal edilebilecek kadar küçük bir değere ulaşır. Ancak bu esnada faradayik akım daha yavaş bir şekilde düşer. Böylece pulsun son bir kaç milisaniyedeki örnekleme akımı hemen hemen neredeyse tamamen faradayik akımdır denilebilir [32].

### **2.6.3.1.4 Kare Dalga Voltammetrisi (SWV)**

Kare dalga voltammetrisi geniş genlikli bir diferansiyel tekniktir. Basamakların st üste biniştirildiği simetrik bir kare dalganın birleştirilmesiyle oluşan bir dalga şeklidir. (şekil 13). Her bir kare dalga dönüşümü için bir ileri yöndeki pulsun sonunda ve bir de ters yöndeki pulsun sonunda olmak üzere akım iki kez örneklenir. Voltammogram mükemmel bir duyarlılık ve etkin bir ayırmayla sonuçlanır. Tayin sınırı yaklaşık  $10^{-8}$  M 'dir. Kare dalga voltammetrisinin en büyük avantajı hızlı olmasıdır. Sonuç olarak analiz süresi çok belirgin bir şekilde azalır ve tüm polarogram bir kaç saniye içinde kaydedilir. [32].



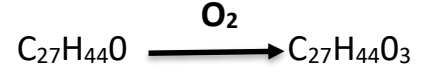
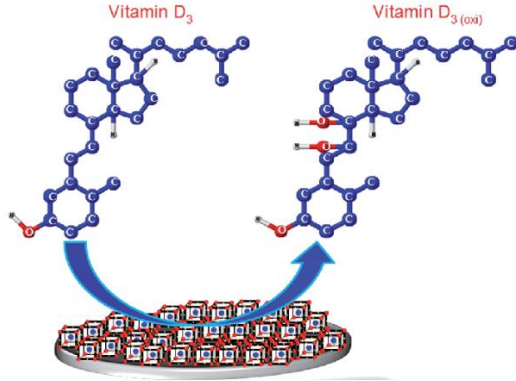
Şekil 11: Kare Dalga Uyarı Sinyali Ve Polarogramı

### 2.6.3.1.5 Sıyırma Voltammetrisi

Sıyırma voltammetrisi tüm elektroanalitik teknikler içinde tayin sınırı en iyi olan tekniktir. Duyarlılığı, çoklu analiz imkânı, seçiciliği, ucuzluğu ve ölçüm basamağının kolaylığı nedeniyle dikkatleri üzerine çekmektedir. Analiz iki adımdan oluşur: Birinci adımda analit potansiyel kontrollü elektroliz ile elektrot üzerinde toplanır, ikinci adımda ise analit elektrot yüzeyinden uygun bir potansiyel taraması ile uzaklaştırılır, yani sıyırılır [32].

### 2.6.3.2. Voltammetrik Yöntem ile D Vitamini Çalışmaları

Voltammetrik olarak kolekalsiferolün yükseltgenmesi şematik olarak Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 12: Nano materyal kaplı elektrot yüzüeyinde kolekalsiferol molekülünün olası yükseltgenmesine ait şema [37]

D vitamininin elektrokimyasal özellikleri hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Metanol içeren asetat tamponları içinde D2 ve D3 vitaminlerine ilişkin bir dönüşümlü voltammetri çalışmasında, her iki bileşiğin de kimyasal olarak tersinir olmayan bir işlemde oksitlenebileceği sonucuna varılmış, ancak oksidasyona katılan elektronların sayısına ilişkin bir sonuç bildirilmemiştir [34].

Oksidasyon işlemi kimyasal olarak tersinir olmayan olarak kabul edilmiş, bunun nedeni tarama yönünün tersine çevrildiğinde (bileşiklerin ilk oksitlenmesinden sonra) ters redüktif pik saptanmadığında ileri taramada sadece oksidatif bir pik tespit edilmesidir. Hem D2 hem de D3 vitaminleri için oksidasyon pik potansiyeli ( $E_{p_{ox}}$ ) yaklaşık +1.1 V olarak belirlenmiş ve negatif potansiyelerde indirgen süreçler tespit edilmemiştir [35].

Dönüşümlü voltammetrinin kullanıldığı başka bir çalışmada  $1 \times 10^{-4}$  M vitamin D2 veya vitamin D3 içeren çözeltiler üzerinde çalışma gerçekleştirilmiştir. pH 'ın etkisini incelemek amacıyla çözeltiler ayrıca % 90 metanol ve 0.05 M pH 3.0-7.0 asetat tamponları (görünür pH 4.95-8.65) içermiştir. Voltammetrik koşullar; başlangıç potansiyeli 0 V; tarama hızı  $50 \text{ mV s}^{-1}$  ve son potansiyel, +1.5 V olarak belirtilmiştir. Aynı çalışmada hidrodinamik voltammetri, % 95'lik metanol-0.05 M asetat tamponu (pH 6.0) içinde çözülmüş ve potansiyeli 0.9 ve 1.5 V arasında değişen 100 ng miktarında vitaminler enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda belirtilen yöntem ile üretici değeri 400 U / 0,6 mL olan takviye edici ilaçta D vitamin değeri 412 U / 0,6 mL olarak tespit edilmiştir. Validasyon çalışmasından elde edilen RSD değeri % 7,5 ile yöntemin kesinliği ve güvenilirliği gösterilmiştir. [34].

Başka bir çalışmada ise katı camsı karbon elektrot içeren tipik üç elektrot sisteminde kolekalsiferole ilişkin diferansiyel pulse voltammetri kullanmışlardır. Voltammetrik koşullar; uygulanan potansiyel 0 ile +1,2 V arası,  $E_{step} = 5$  mV, genlik potansiyeli ( $E_{ampl}$ ) 140 mV, aralık süresi 0.5 s ve  $v = 50$  mV s<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Tüm voltammetrik ölçümler en az 5 defa tekrarlanmıştır. Voltammetrik metodun validasyonu hassasiyet, kesinlik ve doğruluk olmak üzere üç ana parametreden oluşmaktadır [28].

Öncelikle 10 mL 5,0 µM kolekalsiferol çözeltisi ile geliştirilen yöntemin standart ekleme tekniğine göre validasyonu yapılmıştır. % 98' lik etanol içerisinde 0,01 M kolekalsiferol stok çözeltisinde ardışık 3 defa 10 µL eklenmiştir. 3 tekrarlı analiz çalışmasından % 94,6 geri kazanım oranı hesaplanmıştır.

Valide edilmiş yönteme göre iki farklı üreticinin vitamin destek tabletlerinde 5'er tekrarlı analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları  $R^2$  değeri 0,9992 olarak hesaplanan kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır. Üretici değeri 5,0 µg/tablet olan takviye edici ilaçta D vitamin değeri  $5,8 \pm 0,3$  µg/tablet olarak % 116 geri kazanım oranıyla tespit edilmiştir. Yine aynı yöntem ile üretici değeri 5,0 µg/tablet olan başka bir takviye edici ilaçta D vitamin değeri  $5,3 \pm 0,4$  µg/tablet olarak % 106 geri kazanım oranıyla tespit edilmiştir. Validasyon çalışmasından elde edilen RSD değeri (% 3,2-3,9) ile yöntemin kesinliği ve güvenilirliği gösterilmiştir [28].

### **3. DENEYSEL KISIM**

#### **3.1. Çalışma Materyeli**

Önerilen yöntemin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla kolekalsiferol içeriği bilinen ticari takviye edici ilaç olarak oral solüsyon formunda Devit-3 İ.M Oral ampul kullanılmıştır.

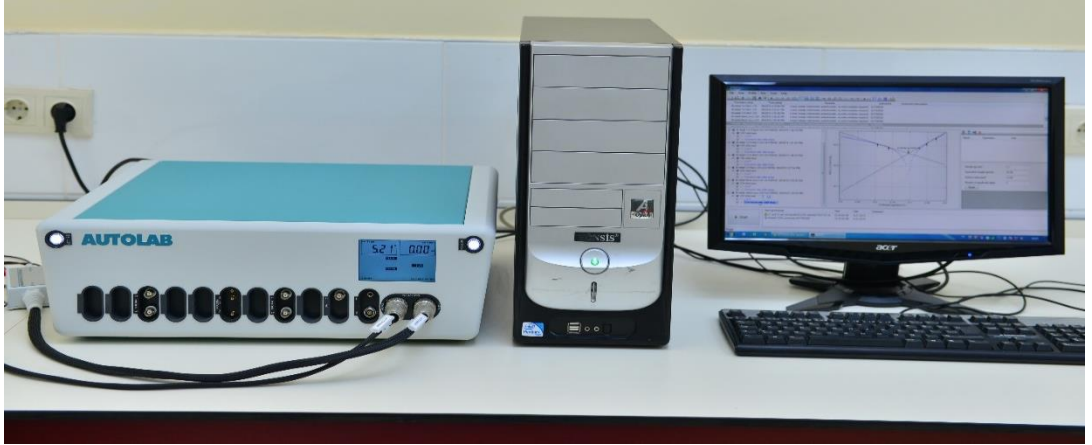
##### **3.1.1. Kimyasallar**

Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Kolekalsiferol Acros(Göteborg İsveç); metanol, etanol, di hidrojen heksakloroplatinat (IV) hidrat ( $H_2PtCl_6 \cdot xH_2O$ ) ve hidrojen tetrakloroaurat (III) hidrat ( $HAuCl_4 \cdot xH_2O$ ) Sigma Aldrich (St. Louis, ABD); Sülfürik asit ve sodyum hidroksit Merck (Darmstadt, Almanya); çok duvarlı karbon nanotüp (% 95 saflıkta, 7-15 nm çaplı, 10 µm uzunluğunda) (Aldrich (St. Louis, ABD); o-fosforik asit ve asetik asit J.T. Baker (Philipsburg, ABD) temin edilmiştir.

### 3.1.2. Cihazlar ve Yöntemler

Voltammetrik ölçümler 3 elektrot sistemli Autolab PGSTAT128N Voltammetri Cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu olarak 3 mm çaplı, 0.0707 cm<sup>2</sup> geometrik alana sahip BASi marka camsı karbon elektrot (GCE) kullanılmıştır. Referans ve yardımcı elektrot olarak sırasıyla Ag/AgCl (doygun KCl) ve platin tel kullanılmıştır. Döngüsel ve doğrusal taramalı voltammetri yöntemleri (0-1500 mV aralığında 50 mV/s olan tarama hızı ile kullanılmıştır.

Kromatografik analizler Agilent 1260 Infinity G13118 Quat HPLC-DAD cihazı ile gerçekleştirilmiştir. ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm 5-Micron) kullanılmıştır. Mobil faz olarak ACN:MeoH (75:25) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 40 °C olup 265 nm dalga boyunda ölçümler alınmıştır.



A



B

Şekil 13: (A) Deneysel çalışmalarda kullanılan Autolab PGSTAT128N voltammetri cihazı (B) Deneysel çalışmalarda kullanılan Agilent 1260 Infinity G13118 Quat HPLC-DAD cihazı

### 3.1.3. Çözeltilerin Hazırlanması

3 M NaOH çözeltisi hazırlamak için 6 g NaOH tartılmış 50 mL saf suda çözülmüştür.

pH:2, pH:5, pH:7, pH:9 ve pH:11 fosfat tampon çözeltilerini hazırlamak için öncelikle 0,1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (% 85 (a/a)' lik d:1,69 g/mL olan H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>' ten 0,68 mL alınmış 100 mL saf suda çözülmüştür) çözeltisi hazırlanmıştır ve 3 M NaOH çözeltisi ile pH' sı ayarlanmıştır.

pH:4 ve pH:5 asetat tampon çözeltilerini hazırlamak için öncelikle 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH (% 100' lük d:1,37 g/mL olan CH<sub>3</sub>COOH' ten 0,22 mL alınmış 50 mL saf suda çözülmüştür) çözeltisi hazırlanmıştır ve 3 M NaOH çözeltisi ile pH' sı ayarlanmıştır.

10<sup>-2</sup> M kolekalsiferol standardı hazırlamak için 10 mL' lik balon jöje içerisine 0,0388 g tartılmıştır. Önce az miktarda etanol ile çözülmesi sağlanmış ardından 10 mL' ye etanol ile tamamlanmıştır.

Karbon nanotüplerin hazırlanması için 150-250 °C ısıtmak suretiyle 0,04 g olarak tartılan MWCNT üzerine 4 kez her seferinde 2 mL derişik HNO<sub>3</sub> eklenmiştir. Son buharlaşmadan kalan yaklaşık 0,5 mL'lik çözelti soğutulmuş, 5 mL saf su ile en



az 7-8 defa yıkanarak asitten uzaklaştırılmıştır. 1 gün boyunca 60-70 °C’de kurutulularak hazırlanan kalıntıdan tartılan 0,037 g karbon nanotüp, 3,7 mL dimetilformamid (DMF) içerisinde dağıtılmıştır [36].

Stok 0,1 M Au hazırlamak için 0,1005 g HAuCl<sub>4</sub>.xH<sub>2</sub>O tartılıp 2,5 mL 0,1 M HCl içerisinde çözülmüştür. Bu stok çözeltiden 100 µL alınıp 10 mL 0,1 M HCl içerisinde çözülerek 1 mM (10<sup>-3</sup> M) Au çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

Stok 0,025 M Pt hazırlamak için 0,122 g H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>.xH<sub>2</sub>O tartılıp 10 mL 0,1 M HCl içerisinde çözülmüştür. Bu stok çözeltiden 400 µL alınıp 10 mL 0,1 M HCl içerisinde çözülerek 1 mM (10<sup>-3</sup> M) Pt çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1 Deney ve Sonuçlar

#### 4.1.1 Destek Elektrolit Çözeltisinin Optimizasyonu

##### 4.1.1.1 pH Denemeleri

Tüm çalışmalarda hücreye 9 mL metanol ve üzerine Tablo 1’ de belirtilen tampon çözeltilerden 1’er mL eklenmiştir. Yaklaşık 1 dk. azot gazı geçirildikten sonra hücredeki derişimi 10<sup>-4</sup> M olacak şekilde hücreye 10<sup>-2</sup> M kolekalsiferol standardından 100 µL eklenmiştir. Standart eklendikten sonra yapılan ölçümler ile elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir. (Tablo 1’ de)

Tablo 1: Çeşitli pH aralığında hazırlanan destek elektrolit çözeltilerinde kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımları

Destek Elektrolit	E (Volt)	I (µA)
0,1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,10	0,779
pH=2 Fosfat	1,08	0,710
pH=5 Fosfat	1,03	0,750
pH=7 Fosfat	1,04	0,336
pH=9 Fosfat	1,05	0,130
pH=11 Fosfat*	-	-
pH=4 Asetat	1,17	0,631
pH=5 Asetat	1,11	0,560

Yapılan denemeler sonrasında pH artışına bağlı olarak metodun duyarlılığının bozulduğu görülmüştür. pH=11 fosfat tampon çözeltisinde kaydadeğer herhangi bir yükseltgenme akımı görülmemiştir. Fosfat tampon çözeltileri asetat çözeltilerine kıyasla daha düşük ve daha temiz zemin sinyali vermektedir. Diğer taraftan

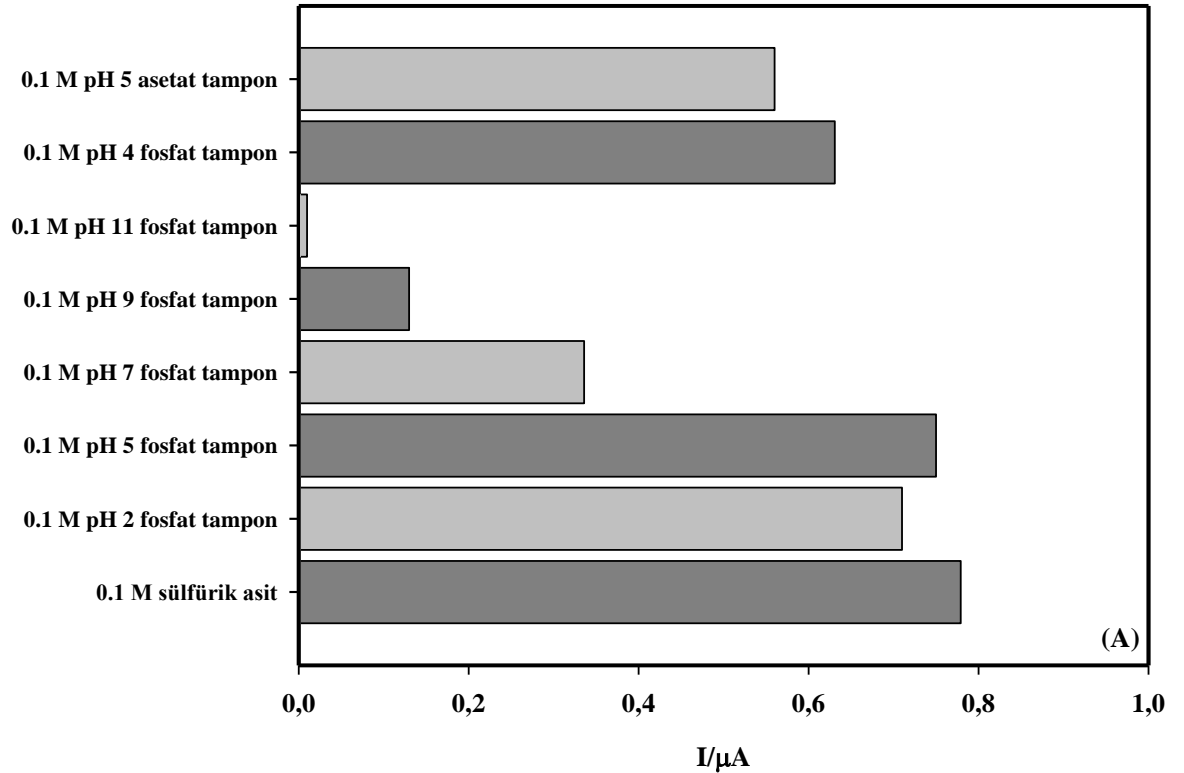
hazırlanması sırasında fosfat çözeltilerine kıyasla daha az belirsizlik kaynağı içeren H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi destek elektrolit olarak seçilmiştir.

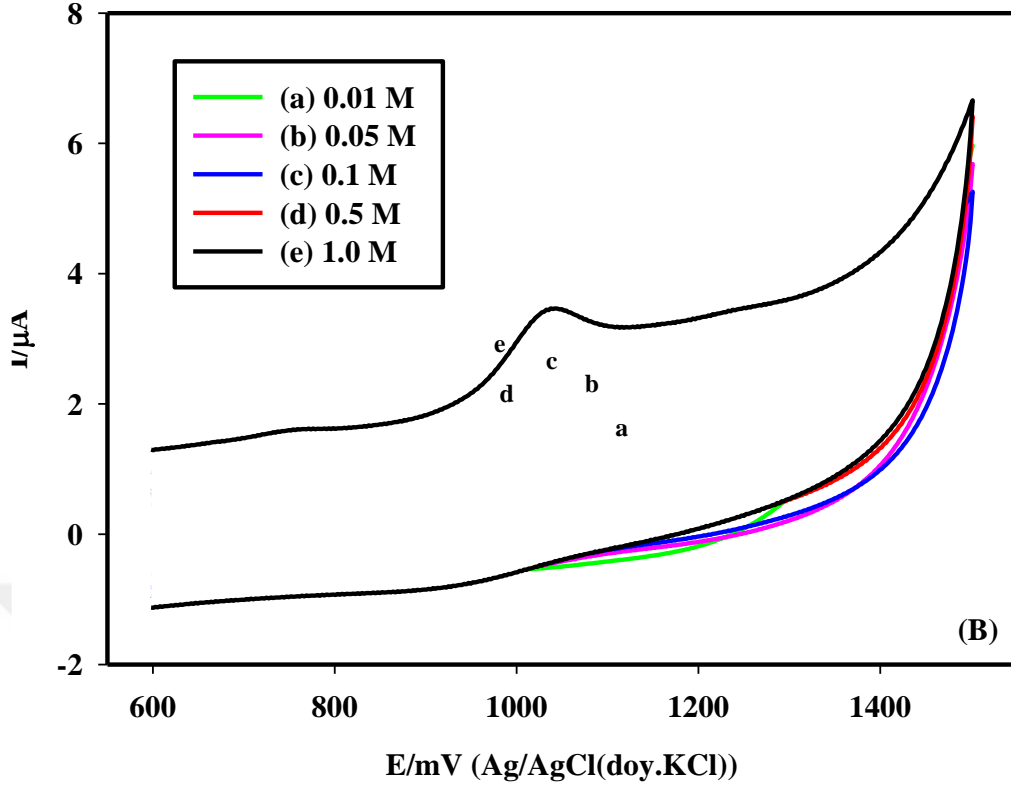
#### 4.1.1.2. İyonik Şiddet Denemeleri

Yapılan tüm çalışmalarda hücreye 9 mL metanol ve üzerine 1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisinin çeşitli konsantrasyonlarında hazırlanan (0,01 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) çözeltilerden eklenmiştir. Yaklaşık 1 dk. azot gazı geçirildikten sonra hücredeki derişimi 10<sup>-4</sup> M olacak şekilde 10<sup>-2</sup> M kolekalsiferol standardından 100 µL eklenmiştir. Standart eklendikten sonra yapılan ölçümler ile elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 2' de özetlenmiştir.

Tablo 2: İyonik Şiddet Denemeleri İçin Çalışma Özeti

Destek Elektrolit	E (Volt)	I (µA)
0,01 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,17	0,360
0,05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,10	0,821
0,1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,08	0,952
0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,04	1,175
1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,03	0,915





Şekil 14 : (A)  $10^{-4}$  M kolekalsiferol standardının yalnız GCE ile çeşitli destek elektrolit çözeltilerindeki yükseltgenme pik akımları. (B)  $10^{-4}$  M kolekalsiferol standardının yalnız GCE ile  $H_2SO_4$  çözeltisinin çeşitli konsantrasyonlarındaki döngüsel voltammogramları.

pH ve iyonik şiddet denemeleri için yapılan çalışma sonucunda en yüksek akım değeri 0,5 M  $H_2SO_4$  ile elde edildiği için bu çözelti ile deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. (Şekil 14)

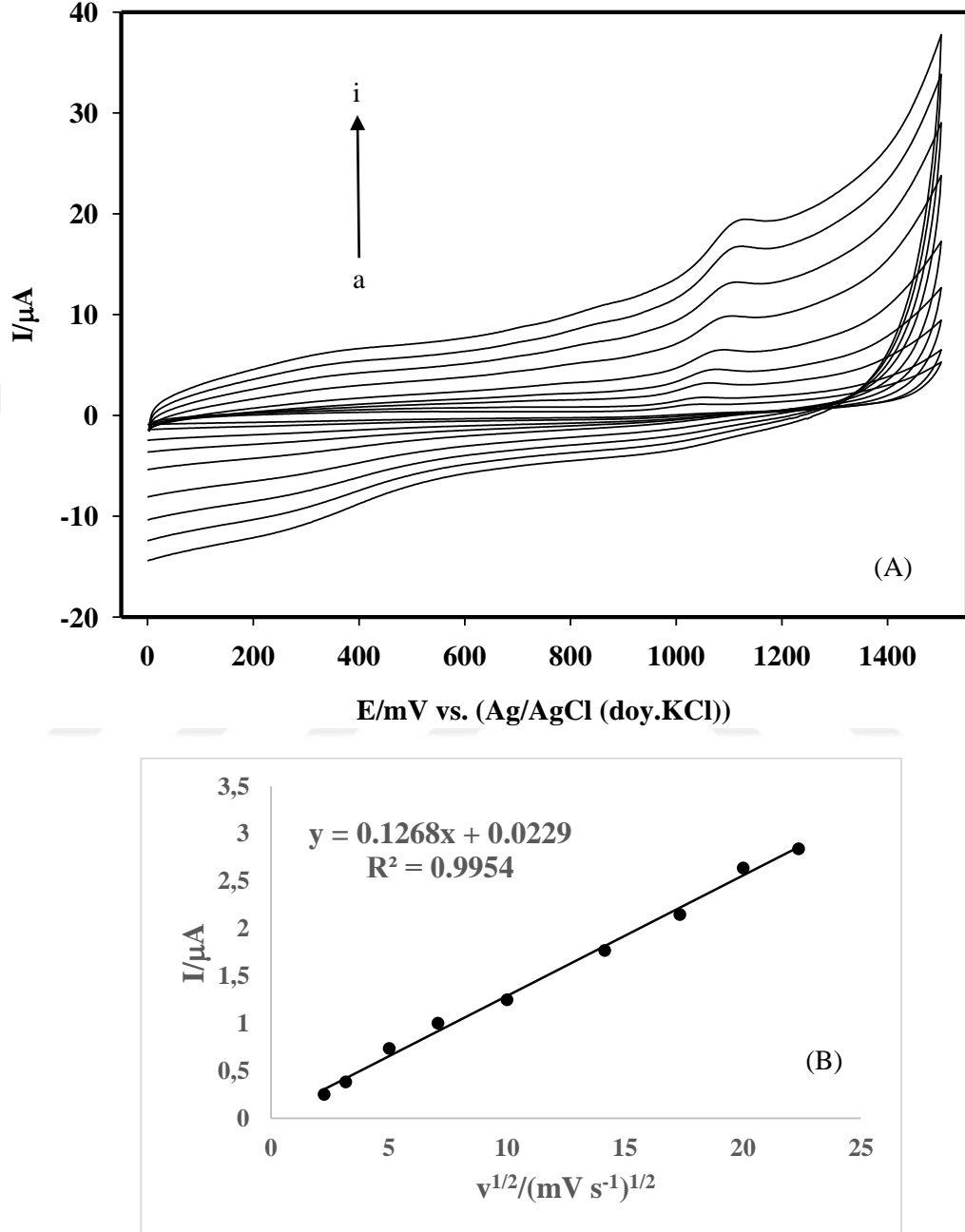
#### 4.1.2. Kolekalsiferolün Yalın Camı Karbon Elektrot ve Modifiye Elektrotlardaki Elektrokimyasal Davranışı

##### 4.1.2.1. Kolekalsiferolün Yalın Camı Karbon Elektrottaki Elektrokimyasal Davranışı

Hücreye 9 mL metanol ve üzerine 1 mL 0,5 M  $H_2SO_4$  tampon çözeltisinden eklenmiştir. Yaklaşık 1 dk. azot gazı geçirildikten sonra hücredeki derişimi  $10^{-4}$  M olacak şekilde  $10^{-2}$  M kolekalsiferol standardından 100  $\mu$ L eklenmiştir. Yüzeyi sulu alümina ve ardından saf su ile temizlenen yalnız GCE ile  $10^{-4}$  M kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımı 1,175  $\mu$ A elde edilmiştir.

Yalnız GCE ile  $10^{-4}$  M kolekalsiferolün farklı tarama hızlarında (5-500 mV/s) elde edilen döngüsel voltammogramları Şekil 15 A' da verilmiştir. Sonuçlar

kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımının tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak değiştiğini göstermektedir (Şekil 15 B). Bu durumda yalnız GCE üzerindeki reaksiyon difüzyon kontrollüdür.

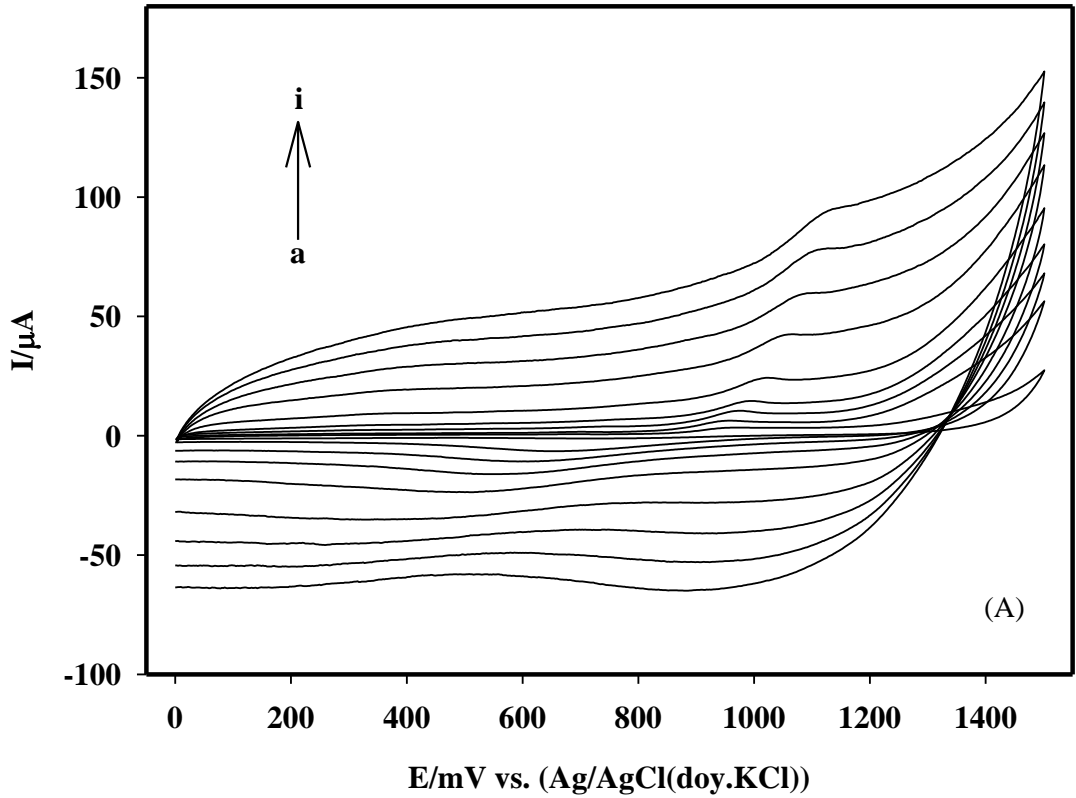


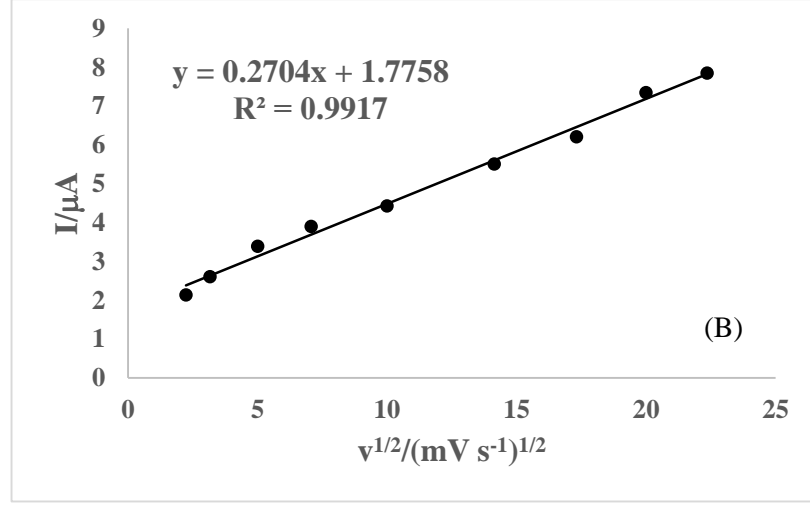
Şekil 15: (A)  $10^{-4}$  M kolekalsiferolün yalnız GCE ile çeşitli tarama hızlarında döngüsel voltammogramları. (a-i): 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mV/s , (B) Yalnız GCE üzerinde kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımı ile tarama hızının karekökünün ilişkisi.

#### 4.1.2.2. Kolekalsiferolün MWCNT/GCE Üzerindeki Elektrokimyasal Davranışı

GCE sulu alümina ( $Al_2O_3$ ) ile temizlenerek yüzeyi parlatılmıştır. Temizlenmiş GCE üzerine 10  $\mu$ L MWCNT çözeltisinden damlatılmış ve yaklaşık 10 dakika 150 W IR lamba altında çözücü uçurularak MWCNT/GCE hazırlanmıştır. Hücreye 9 mL metanol ve üzerine 1 mL 0,5 M  $H_2SO_4$  tampon çözeltiden eklenmiştir. Yaklaşık 1 dk. azot gazı geçirildikten sonra hücredeki derişimi  $10^{-4}$  M olacak şekilde  $10^{-2}$  M kolekalsiferol standardından 100  $\mu$ L eklenmiştir. MWCNT/GCE ile  $10^{-4}$  M kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımı 6,632  $\mu$ A elde edilmiştir.

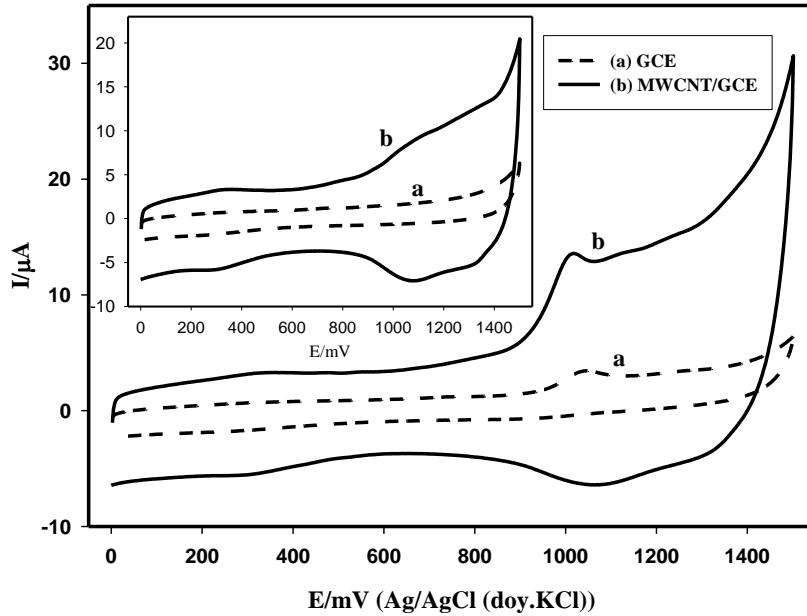
MWCNT/GCE ile  $10^{-4}$  M kolekalsiferolün farklı tarama hızlarında (5-500 mV/s) elde edilen döngüsel voltammogramları Şekil 16 A' da verilmiştir. Sonuçlar kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımının tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak değiştiğini göstermektedir. (Şekil 16 B) Bu durumda MWCNT/GCE üzerindeki reaksiyon difüzyon kontrollüdür.





Şekil 16: (A)  $10^{-4}$  M kolekalsiferolün MWCNT/GCE ile çeşitli tarama hızlarında döngüsel voltammogramları. (a-i): 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mV/s , (B) MWCNT/GCE üzerinde kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımı ile tarama hızının karekökü ile olan ilişkisi.

MWCNT/GCE ile kolekalsiferole ait yükseltgenme pik akımı yalnız GCE ile elde edilen yükseltgenme pik akımından yaklaşık 6 kat daha duyarlı bulunmuştur. Bu durum Şekil 17' de görülmektedir.



Şekil 17:  $10^{-4}$  M kolekalsiferolün yalnız GCE ve MWCNT/GCE ile karşılaştırmalı döngüsel voltammogramları.

#### **4.1.2.3. Kolekalsiferolün Au/MWCNT/GCE Üzerindeki Elektrokimyasal Davranışı**

Au nanoparçacıklar, türlerin asidik çözeltilerinden (0.1 M HCl çözeltisi ile hazırlanmış 1 mM HAuCl<sub>4</sub>) indirgenerek söz konusu elektrot yüzeyine modifiye edilmiştir. Au nanoparçacıkların MWCNT/GCE yüzeyinde oluşumu döngüsel voltammetri ile 15 döngü (100 mV/s sırasıyla 1.0 V ile -1.5 V ve 0.2 V ile -1.0 V potansiyel aralığında gerçekleştirilmiştir.

Hücreye 9 mL metanol ve üzerine 1 mL 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon çözeltiden eklenmiştir. Yaklaşık 1 dk. azot gazı geçirildikten sonra hücredeki derişimi 10<sup>-4</sup> M olacak şekilde 10<sup>-2</sup> M kolekalsiferol standardından 100 µL eklenmiştir. Au/MWCNT/GCE ile 10<sup>-4</sup> M kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımı 6,8 µA elde edilmiştir. Bu çalışma MWCNT/GCE ile elde edilen akımın değerine yakın olduğu için anlamlı olarak değerlendirilmemiştir.

#### **4.1.2.4. Kolekalsiferolün Pt/MWCNT/GCE Üzerindeki Elektrokimyasal Davranışı**

Pt nanoparçacıklar, türlerin asidik çözeltilerinden (0.1 M HCl çözeltisi ile hazırlanmış 1 mM H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) indirgenerek söz konusu elektrot yüzeyine modifiye edilmiştir. Pt nanoparçacıkların MWCNT/GCE yüzeyinde oluşumu döngüsel voltammetri ile 10 döngü (100 mV/s) sırasıyla 1.0 V ile -1.5 V ve 0.2 V ile -1.0 V potansiyel aralığında gerçekleştirilmiştir.

Hücreye 9 mL metanol ve üzerine 1 mL 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon çözeltiden eklenmiştir. Yaklaşık 1 dk. azot gazı geçirildikten sonra hücredeki derişimi 10<sup>-4</sup> M olacak şekilde 10<sup>-2</sup> M kolekalsiferol standardından 100 µL eklenmiştir. Söz konusu modifikasyon sonrasında oldukça artan zemin sinyali nedeniyle kolekalsiferolün yükseltgenmesine ait kayda değer herhangi bir akım gözlenmemiştir. Bu çalışma anlamlı olarak değerlendirilmemiştir.

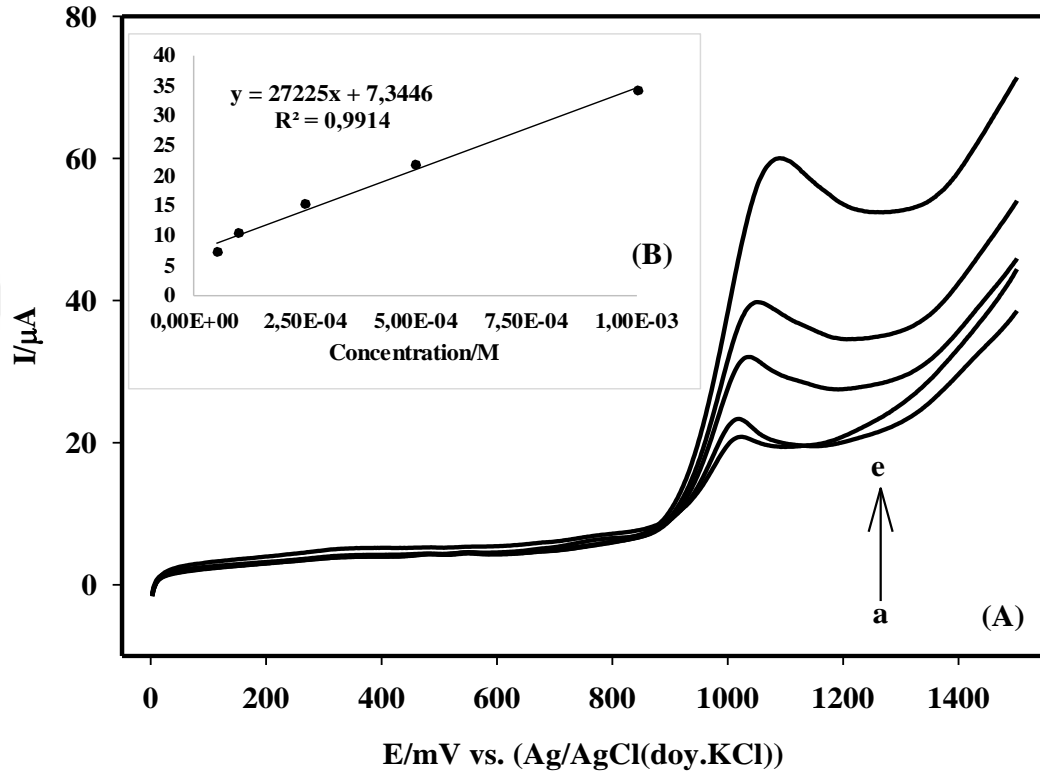
### **4.2. Validasyon Çalışmaları**

#### **4.2.1. Doğrusallık**

Validasyon çalışmalarının doğrusallık parametresi için 5,0x10<sup>-5</sup> M ile 1,0x10<sup>-3</sup> M aralığında 5 konsantrasyon seviyesi için ölçümler yapılmış elde edilen yükseltgenme pik akım değerlerine karşılık 5 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Şekil 17' da gösterilen kalibrasyon eğrisinde R<sup>2</sup> değeri 0,9914 elde edilmiş ve doğrusallık sağlanmıştır. (Doğrusallık denklemi:  $y = 27225x + 7,3446$ )

Tablo 3: Doğrusallık Çalışma Sonuçları

Kolekalsiferol konsantrasyonu (M)	E (V)	I ( $\mu$ A)
$5,0 \times 10^{-5}$	1,0156	10,52
$1,0 \times 10^{-4}$	1,0205	14,02
$2,5 \times 10^{-4}$	1,0352	24,73
$5,0 \times 10^{-4}$	1,0449	32,98
$1,0 \times 10^{-3}$	1,0669	51,37



Şekil 18: (A) MWCNT/GCE ile kolekalsiferol ölçümü için oluşturulan kalibrasyon eğrisine ait standart çözelti voltammogramları. (B) MWCNT/GCE ile kolekalsiferol ölçümü için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

#### 4.2.2. Tespit (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

Madde 4.1.2.2' de anlatıldığı şekilde yapılan MWCNT/GCE ile kolekalsiferol validasyon çalışmasında 2 farklı konsantrasyonda tekrarlanabilirlik yapılmıştır. Düşük seviye çalışma sonuçları ile aynı zamanda tespit (LOD) ve tayin (LOQ) limitleri hesaplanmıştır. Düşük seviye olan  $5,0 \times 10^{-5}$  M konsantrasyonu ile yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarında 8 tekrarlı çalışma sonuçlarından standart sapma (s) hesaplanmıştır. ( $s = \pm 5,71 \times 10^{-6}$ ) Standart sapmanın 3 katından LOD, 10 katından LOQ hesaplanmıştır. Buna göre hesaplanan;

LOD:  $1,7 \times 10^{-5}$  M ve LOQ:  $5,0 \times 10^{-5}$  M' dir.



#### 4.2.3. Tekrarlanabilirlik

Madde 4.1.2.2' de anlatıldığı şekilde yapılan MWCNT/GCE ile kolekalsiferol validasyon çalışmasında kesinlik koşullarının sağlandığının kanıtı olarak aynı gün 2 farklı konsantrasyonda 8' er çalışma ile tekrarlanabilirlik yapılmıştır. Düşük seviye olarak  $5,0 \times 10^{-5}$  M, yüksek seviye olarak ise  $1,0 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonunda çalışılmıştır.

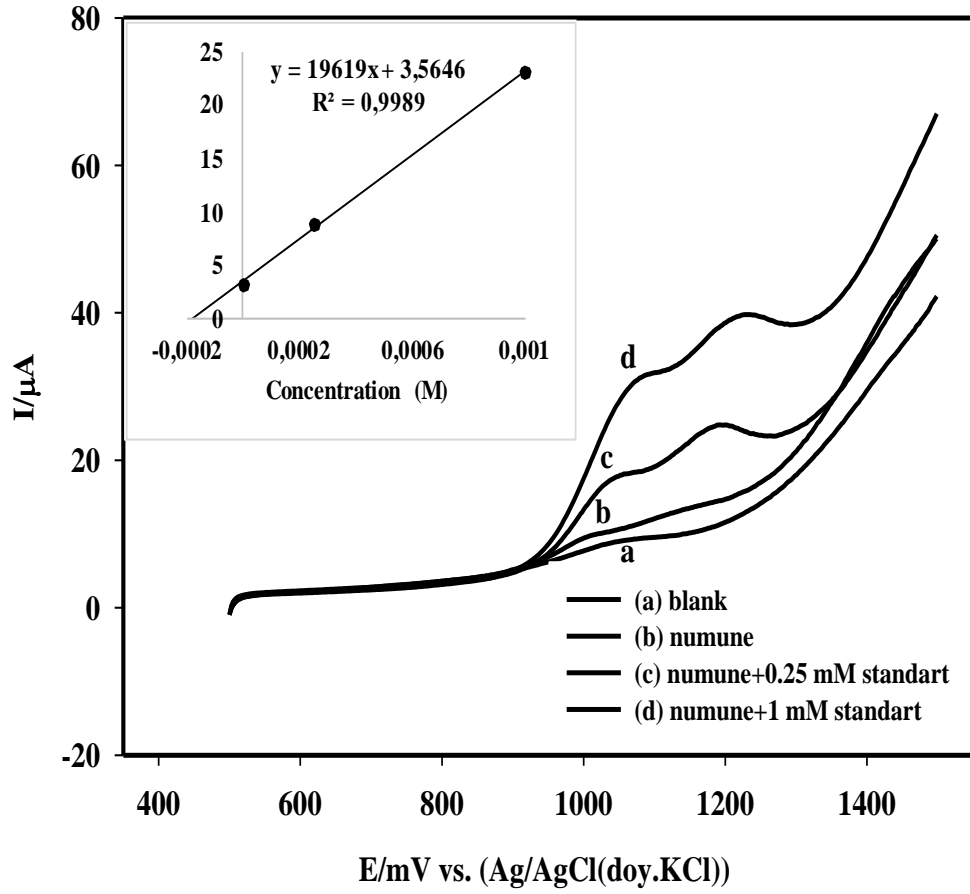
Tablo 4: Düşük Seviye ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) ve Yüksek Seviye ( $1,0 \times 10^{-4}$  M) İçin Kesinlik Çalışma Sonuçları

<b><math>5,0 \times 10^{-5}</math> M için I (<math>\mu</math>A)</b>	<b><math>1,0 \times 10^{-4}</math> M için I (<math>\mu</math>A)</b>
10,5000	14,0000
9,2000	14,0000
7,7000	13,9000
8,2000	13,8000
7,5000	13,4000
9,1000	12,6000
9,1000	10,8000
8,2000	10,6000
RSD : $\pm$ % 8,4	RSD: $\pm$ % 8,5

#### 4.2.4. Oral Solüsyon da MWCNT/GCE Elektrot ile Kolekalsiferol Tayini

Oral Solüsyon (1 mL) içerisinde bulunan D3 vitamini (kolekalsiferol) 1 mL metanol ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt  $0,45 \mu\text{m}$ ' lik PTFE filtreden geçirilmiştir.

Madde 4.1.2.2' de anlatıldığı şekilde yapılan MWCNT/GCE ile kolekalsiferol tayininde kullanılan hücre hazırlanmış standart yerine oral solüsyondan ekstrakte edilen metanol fazından  $100 \mu\text{L}$  eklendikten sonra voltammogram alınmıştır. Daha sonra üzerine sırasıyla  $0,25 \text{ mM}$  ve  $1 \text{ mM}$  kolekalsiferol olacak şekilde standart ilavesi yapılmıştır. (Şekil 19)



Şekil 19: Oral solüsyon numunesi ve üzerine eklenen 0,25 mM ile 1 mM standart kolekalsiferole ilişkin elde edilenvoltammogramlar (tarama hızı 50 mV/s).

Etiket beyanında Oral Solüsyondaki D3 vitamini konsantrasyonu 1 mL' de 300.000 IU (7,5 mg/mL) olarak verilmiştir. İlaç içerisinde 7,5 mg/mL olan kolekalsiferol miktarı molarite cinsinden hesaplandığında  $1,95 \times 10^{-2}$  M olarak bulunmaktadır (Kolekalsiferol MA: 384,65 g/mol). Hücreye 100  $\mu\text{L}$  eklendiğinde 10 mL' lik hücre içerisindeki konsantrasyonu  $1,95 \times 10^{-4}$  M olmalıdır. Optimize edilen şartlarda kolekalsifeolün voltammetrik tayini sonucunda oral solüsyondaki kolekalsiferol miktarı  $1,90 \times 10^{-4}$  M olarak tespit edilmiştir. Seyreltme oranını dikkate aldığımızda değer  $1,90 \times 10^{-2}$  M olmaktadır. Bu değeri etiket beyanı ile kıyaslayabilmek için mg/mL cinsine çevirdiğimizde  $7,3 \pm 0,6$  mg/mL olarak bulunmuştur. Solüsyon içerisinde bulunan kolekalsiferol miktarı etiket beyanı ile uyumlu olduğu gösterilmiştir.

#### 4.2.5. Oral Solüsyon da HPLC-DAD ile Kolekalsiferol Tayini

Geliştirilen ve valide edilen voltammetrik yöntemle analizi yapılan oral solüsyon içerisindeki kolekalsiferol miktarının doğruluğunu karşılaştırmak amacıyla analiz referans yöntemlerden kabul edilen HPLC-DAD yöntemi kullanılarak da gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kolekalsiferol analizi için önerilen şartlar kullanılarak [ C18 (4,6 x 150 mm 5-Micron) kolon ve mobil faz olarak ACN:MeOH (75:25) kullanılarak 40 °C kolon sıcaklığında 265 nm dalga boyunda izokritik elüsyon ] tayin yapılmıştır. Yapılan analiz sonucu oral solüsyondaki kolekalsiferol miktarı 7,42±0,24 mg/mL olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi bulunan sonuç hem etiket beyanı hem de voltammetrik yöntemle bulunan sonuçlarla uyumludur.

### 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Döngüsel voltammetri yöntemi ile kolekalsiferolün çok duvarlı karbon nanotüp modifiye camısı karbon elektrot üzerindeki (MWCNT/GCE) elektrokimyasal davranışı incelenmiş, kolekalsiferolün tayinine dair yöntem geliştirilmiştir.

Destek elektrolit sıvısının belirlenebilmesi için öncelikle tampon denemeleri yapılmış en yüksek akım değerinin ve en iyi zemin sinyalinin ölçüldüğü tampon çözelti belirlenmiştir. Asetat, fosfat ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ortamlarında yapılan çalışmalar neticesinde H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ortamında en iyi akım değeri ile temiz zemin sinyali alındığı görülmüştür. Daha sonra belirlenen destek elektrolit sıvısının konsantrasyonunun belirlenebilmesi için çeşitli konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hazırlanmış ve yalın camısı karbon elektrot (GCE) ölçümler alınmıştır. Çalışmalar neticesinde 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile diğer konsantrasyonlara kıyasla daha yüksek akım değeri elde edildiği görülmüştür. Yapılan denemeler sonrasında deneysel çalışmalar için 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile deney örgüsü planlanmıştır.

Kolekalsiferolün organik bir molekül olması sebebiyle destek elektrolit için molekülün çözünebildiği bir çözücü olarak metanol seçilmiştir. 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren metanol ortamında yalın GCE, yardımcı elektrot olarak platin (Pt) ve referans elektrot olarak Ag/AgCl 'e karşı 10<sup>-4</sup> M kolekalsiferol molekülü ölçümüne ait optimizasyon çalışmalarında yaklaşık olarak 1,02 V değerinde yükseltgendiği görülmüştür. GCE ile yapılan ölçümlerde yükseltgenme pik potansiyeli 1,175 µA elde edilmiştir.

Çok duvarlı karbon nanotüp ile camısı karbon elektrot modifikasyonu işlemlerinde benzer şekilde kaplama yapabilmenin zorluğu sebebiyle çok dikkatli ve

hassas çalışılmıştır. Her modifikasyon işleminden sonra 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren metanol ortamında MWCNT/GCE, yine yardımcı elektrot olarak platin (Pt) ve referans elektrot olarak Ag/AgCl 'e karşı 10<sup>-4</sup> M kolekalsiferol ölçümüne ait optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kolekalsiferol molekülünün yaklaşık olarak 1,02 V değerinde yükseltgendiği görülmüştür. MWCNT/GCE ile yapılan ölçümlerde yükseltgenme pik potansiyeli 6,632 µA elde edilmiştir. Yalnız GCE ile yapılan 0,5 M MWCNT/GCE modifikasyonunda yaklaşık 6 kat hassasiyetle 6,632 µA olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmalara ek olarak Au ve Pt nano parçacık modifikasyonları yapılarak ölçümler alınmıştır. Pt/MWCNT/GCE ile 10<sup>-4</sup> M kolekalsiferolün ölçümlerinde oldukça artan zemin sinyali nedeniyle kolekalsiferolün yükseltgenmesine ait kayda değer herhangi bir akım gözlenmemiştir. Bu çalışma anlamlı olarak değerlendirilmemiştir. Au/MWCNT/GCE ile 10<sup>-4</sup> M kolekalsiferolün yükseltgenme pik akımı 6,8 µA elde edilmiştir. Bu çalışma MWCNT/GCE ile elde edilen akımın değerine yakın olduğu için anlamlı olarak değerlendirilmemiştir.

MWCNT/GCE ile kolekalsiferol ölçümü için belirlenen şartlar ile metod validasyonu çalışmaları yapılmıştır. Validasyon parametreleri olarak doğrusallık ve tekrarlanabilirlik çalışılmıştır.

Doğrusallık parametresinde çalışma aralığının belirlenebilmesi adına birçok konsantrasyonda çalışma yapılmış olup ancak 5×10<sup>-5</sup> ile 1×10<sup>-3</sup> M aralığında R<sup>2</sup> değeri 0,9914 elde edilerek doğrusallık sağlanabilmiştir.

Tekrarlanabilirlik çalışmaları aynı gün 2 farklı konsantrasyon seviyesinde aynı kişinin çalışmaları değerlendirilmiştir. LOD ve LOQ değerleri tekrarlanabilirlik çalışmalarında kullanılan düşük seviye sonuçları ile hesaplanmıştır. Yöntemin çalışabileceği en düşük seviyenin belirlenmesi için yapılan çalışma sonucunda LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,7×10<sup>-5</sup> ve 5,1×10<sup>-5</sup> M olarak hesaplanmıştır. Önerilen elektrodun cevabı kolekalsiferolün belirlenmesi için yeterince tekrarlanabilirdir.

Önerilen modifiye elektrot, 300.000 IU kolekalsiferol/mL içeren ticari bir oral solüsyonda kolekalsiferol tayini için başarıyla uygulanmıştır. Oral solüsyondan kolekalsiferolü ekstrakte etmek için metanol kullanılarak gerçekleştirilen basit bir sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği izlenmiştir. Elde edilen sonuçlar (7,3±0,6 mg/L) solüsyon içeriği ile (7,5 mg/mL) uyum içerisindedir. Söz konusu oral solüsyonda kolekalsiferol

tayini karşılaştırma yapmak adına HPLC-DAD metodu ile de çalışılmıştır. Elde edilen sonuç (7,42±0,24 mg/mL) nerilen yönteme ait sonuç ve etiket beyanı ile uyumludur.

Tüm bu çalışmalar ile kolekalsiferol molekülü için belirlenen şartlarda kalibrasyon grafiği çizilerek kantitatif olarak tayin edilebileceği gösterilmiştir.



## KAYNAKLAR

- 1-Basit, S. Vitamin D in Health and Disease A Literature Review. *British Journal of Biomedical Science*. 2013, 70(4), 161-172.
- 2-McCollum, E.V., Davis, M. The necessity of certain lipins in the diet during growth. *The Journal of Biological Chemistry*.1913, 25, 167-231.
- 3-Askew, F.A., Bourdillon, R.B., Bruce, H.M., Jenkins, R.G.C., Webster, T.A. The distillation of vitamin D. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1931, 8107, 76-90.
- 4-Windaus, A., Schenck, F., von Werder, F. Concerning the antirachitic activity of the irradiation product of 7-dehydrocholesterol. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie*. 1936, 241, 100-103.
- 5-DeLuca, H.F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, 80 (6 suppl), 1689S-1696S.
- 6-Zhang, Y., Hao, X., Sun, W., Ma, H., Yang, Y., Zhu, Y., Zhu, H. The Study Advance on The Role of Vitamin D in Hypertension and Cardiovascular Disease (CVD). *Journal of American Science*. 2015, 11(3), 120-125.
- 7-Holick, M.F. The vitamin D epidemic and its health consequences. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005, 22, 2739-2747.
- 8-Holick, M.F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, 8, 1678-1688.
- 9-Karatoy-Erdem, B. Renal Transplantasyon ve 1, 25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub>. Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Antalya, 2015, 70s. (Yüksek Lisans Tezi)
- 10-Nagpal, S., Na, S., Rathnachalam, R. Noncalcemic Actions of Vitamin D Receptor Ligands. *Endocrine Reviews* 2005, 26(5), 662-687.
- 11-Chakraborti, C.K. Vitamin D as a promising anticancer agent. *Indian Journal of Pharmacology*. 2011, 43(2), 113-120.
- 12-Wang, Q., He, Y., Shen, Y., Zhang, Q. et al. Vitamin D Inhibits COX-2 Expression and Inflammatory Response by Targeting Thioesterase Superfamily Member 4. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(17), 11681-11694.
- 13-Goldblatt, H., Soames, K.M. Studies on the fat-soluble growth-promoting factor. *Biochemical Journal*. 1923, 17, 446-453.

- 14-Bikle, D. D. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chemical Biology*. 2014, 21(3), 319-329.
- 15-Turunen, M.M., Dunlop, T.W., Carlberg, C., Vaisanen, S. Selective use of multiple vitamin D response elements underlies the 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated negative regulation of the human CYP27B1 gene. *Nucleic Acids Research* 2007, 35, 2734-2747.
- 16-Fidan, F., Alkan, B.M., Tosun, A. Çağın Pandemisi: D Vitamini Eksikliği ve Yetersizliği. *Türk Osteoporoz Dergisi*. 2014, 20, 71-74.
- 17-Tarakçı, Z., Dervişoğlu, M. Vitamin D, Beslenmede Önemi ve Gıdalarda Zenginleştirilmesi. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- 18-Kurylowicz, A., Bernarczuk, T., Nauman, J. The influence of vitamin D deficiency on cancers and autoimmune diseases development. *Endokrynologia Polska*. 2007, 58(2), 140-52.
- 19-Lamprecht, S.A., Lipkin, M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. 2003, 3, 601-614.
- 20-Akpınar, P., İçağasıoğlu, A. D Vitamininin Yaşam Kalitesi ile İlişkisi. *Türk Osteoporoz Dergisi*. 2012, 18, 13-18.
- 21-Akkoyun, H.T., Bayramoğlu, M., Ekin, S., Çelebi, F. D Vitamini ve Metabolizma İçin Önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 2014, 9(3), 213-219.
- 22-Ersfeld, D.L., et al. Analytical and clinical validation of the 25 OH vitamin D assay for the LIAISONR automated analyzer. *Clinical Biochemistry*. 2004, 37, 867-874.
- 23-Bekmez, M., Alataş, Ö. HPLC ve Immunoassay Yöntemleri İle Ölçülen D Vitamini Düzeylerinin Karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. 2016, 14(1), 46-50.
- 24-Yüce, N., Uzun-Kara, N., Çakır-Madenci, Ö., Dağdelen, L., Akbaba, D., Orçun-Kaptanağası, A. Evaluation of Vitamin D Assays in Relation to the Measurement Range and the Statistical Method. *Turkiye Klinikleri, Journal of Medical Science*. 2014, 34(4), 406-416.
- 25-Forghani, B., Schmidt, N.J., Lennette, E.H. Sensitivity of a Radioimmunoassay Method for Detection of Certain Viral Antibodies in Sera and Cerebrospinal Fluids. *Journal of Clinical Microbiology*, 1976, 4(6), 470-478.
- 26-Patrono, C., Peskar, B.A. (eds). *Radioimmunoassay in basic and clinical pharmacology*. Heidelberg, Springer-Verlag, 1987.

- 27-Saenger, A.K., Laha, T.J., Bremner, D.E., Sadrzadeh, S.M.H. Quantification of Serum 25-Hydroxyvitamin D2 and D3 Using HPLC–Tandem Mass Spectrometry and Examination of Reference Intervals for Diagnosis of Vitamin D Deficiency. *The American Journal of Clinical Pathology*. 2006, 125, 914-920.
- 28-Nallbani, A., Holubová, J., Sýs, M., Arbnesi, T., Vyřas, K. Voltammetric determination of kolekalsiferol at glassy carbon electrode performed in water-ethanol mixture. *Slovak Journal of Food Sciences*. 2018, 12(1), 166-172.
- 29-Tsugawa, N., Suhara, Y., Kamao, M., Okano, T. Determination of 25-Hydroxyvitamin D in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2005, 77, 3001-3007.
- 30-Lensmeyer, G.L., Wiebe, D.A., Binkley, N., Drezner, M.K. HPLC Method for 25-Hydroxyvitamin D Measurement: Comparison with Contemporary Assays. *Clinical Chemistry*. 2006, 52(6), 1120-1126.
- 31-Bard, A.J. The Rise of Voltammetry: From Polarography to the Scanning Electrochemical Microscope. *Journal of Chemical Education*. 2007, 84, 644–650.
- 32- Skoog, A.D, Holler, F.J., Crouch, S.R., Ed: Sandra Kiselica. *Principles of Instrumental Analysis* (E. Kılıç ve H. Yılmaz, Çev.), Ankara, Bilim Yayıncılık, 2013, 1037s.
- 34-Hart, J.P., Norman, M.D., Lacey, C. J. Voltammetric Behaviour of Vitamins D2 and D3 at a Glassy Carbon Electrode and Their Determination in Pharmaceutical Products by Using Liquid Chromatography With Amperometric Detection. *Analyst*. 1992, 117, 1441–1445.
- 35-Webster, R.D. Voltammetry of the Liposoluble Vitamins (A, D, E and K) in Organic Solvents. *The Chemical Record*. 2012, 12, 188-200.
- 36- Bakır, Ç.C., Şahin, N., Polat, R., Dursun, Z. Electrocatalytic reduction of oxygen on bimetallic copper-gold nanoparticles- multiwalled carbon nanotube modified glassycarbon electrode in alkaline solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2011, 662, 275-280.
- 37- Raymundo-Pereira, A.P., Alan R.F. Limaband Sergio A.S.M. A nanostructured label-free platform based on an ultrathin film for ultrasensitive detection of a secosteroid hormone. *RSC Adv.*, 2016, 6, 34458



## ÖZGEÇMİŞ

Ad- Soyad :Şerife KAHYA  
Doğum Yeri ve Yılı :İzmir, 1982  
e-posta :serifeeryilmaz@windowslive.com

### Eğitim Bilgileri

Lise : Mersinli Anadolu Teknik Lisesi-Kimya Bölümü, 2001  
Lisans : Celal Bayar Üniv. Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 2005  
Tezsiz Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniv. Fen Bilimleri Ens., 2007

### İş Tecrübeleri

- Türk Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK), Denetçi (2016-devam etmekte)
- A&G Pür Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı, Laboratuvar Sorumlu Müdürü (2018-devam etmekte)
- Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEFAM), Teknik Danışman (2016-2018)
- Deppo Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı, Laboratuvar Sorumlu Müdürü (2012-2016)
- Deppo Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı, GDO Laboratuvar Sorumlusu (2011-2012)
- Ege Chelab Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı, Kimyasal Analiz Laboratuvar Sorumlusu (2007-2011)