



**D VİTAMİNİNİN KARE DALGA VOLTAMETRİSİ İLE TAYİNİ İÇİN
YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

Sedanur UZUN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sedanur UZUN

06/09/2022

D VİTAMİNİNİN KARE DALGA VOLTAMETRİSİ İLE TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Sedanur UZUN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2022

ÖZET

D vitamini, bireyin sağlıklı bir şekilde büyüme ve gelişmesinde büyük öneme sahiptir. D vitamini eksikliği, gelişen beslenme şartlarına rağmen günümüzde küresel bir problem olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple D vitamininin doğru ve kolay olarak belirlenebilmesi için oldukça duyarlı, hızlı ve ekonomik yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu çalışmada D₃ vitamini olarak bilinen kolekalsiferol'ün tayini için yöntem geliştirildi. Çalışma kapsamında ilk olarak çeşitli elektrot ve destek elektrolitlerle, D₃ vitamininin elektrokimyasal davranışı araştırıldı. Bu çalışmalar sonucunda en uygun çalışma elektrodunun kalem grafit elektrot (KGE) ve en uygun destek elektrolitin 0,10 M tetrabütülamonyum tetrafloraborat (TBATFB) çözeltisi olduğu belirlendi. Belirlenen ortamda D₃ vitamininin +0,200 ile +1,600 V aralığında anodik yönde dönüşümlü voltamogramı alındığında +1,200 V civarında bir anodik pik verdiği görüldü. +1,200 V da D₃ vitamini ilavelerine düzgün cevaplar veren bu pikten faydalanarak D₃ vitamini için kalibrasyon grafiği çizildi. Daha sonra bilinen miktardaki D₃ vitamini derişimi, standart ekleme metodu ile tayin edildi ve yöntemin uygulanabilirliği gösterildi. Askorbik asit, ürik asit, B vitamini, E vitamini ve C vitamininin, D₃ vitamininin +1,200 V civarında görülen pikine girişim etkileri incelendi. Askorbik asit, Ürik asit ve B vitamininin girişim yapmadığı, aksine E ve C vitaminlerinin girişim yaptığı gözlemlendi. Girişim yapmayan türleri ve D₃ vitaminini içeren sentetik bir karışım hazırlandı. Bu karışım içinde bilinmeyen olarak ilave edilen 65,5 µM D₃ vitamini % -6,2 bağıl hata ile 61,4 µM olarak tayin edildi. Yöntem gerçek numune olarak balık yağına uygulandı ve gerçek numunedeki D₃ vitamini standart ekleme metodu ile 8, 13 µg/100 g olarak bulundu. Geliştirilen metot için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla $3,7 \times 10^{-8}$ M ve $1,1 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı.

Bilim Kodu : 20102
Anahtar Kelimeler : Voltametri, D vitamin tayini, Kare dalga voltametrisi
Sayfa Adedi : 59
Danışman : Prof. Dr. Halit ARSLAN

DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR THE DETERMINATION OF VITAMIN D
BY SQUARE WAVE VOLTAMMETRY

(M. Sc. Thesis)

Sedanur UZUN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

Sep 2022

ABSTRACT

Vitamin D is of great importance in the healthy growth and development of the individual. Vitamin D deficiency is considered a global problem today, despite developing health technology. For this reason, very sensitive, fast and economical methods are needed for the accurate and easy determination of vitamin D. In this study, a method was developed for the determination of cholecalciferol, known as vitamin D₃. Within the scope of the study, firstly, the electrochemical behavior of vitamin D₃ was studied with various electrodes and supporting electrolytes. As a result of these studies, it was determined that the most suitable working electrode was pencil graphite electrode (KGE) and the most suitable supporting electrolyte containing 0. 10 M tetrabutylammonium tetrafluoroborate (TBATFB). In the determined environment, it was observed that vitamin D₃ gave an anodic peak of around +1,200 Volts when the alternating voltammogram was taken in the anodic direction in the range of +0,200 and +1,600 Volts. A calibration graph was drawn for vitamin D₃ by taking advantage of this peak, which gave correct responses to vitamin D₃ additions at +1,200 V. Then, the concentration of known amount of vitamin D₃ was determined by the standard addition method and the applicability of the method was determined. The interference effects of ascorbic acid, uric acid, vitamin B, vitamin E and vitamin C on the peak of vitamin D₃ at +1,200 V were investigated. Ascorbic acid, uric acid and vitamin B did not interfere, but the interference effects of vitamin E and vitamin C were observed. A synthetic mixture containing non-interfering species and vitamin D₃ was prepared. 65. 5 µM vitamin D₃ added as unknown in this mixture was determined as 61. 4 µM with a relative error of -6. 2%. The method was applied to the real sample (fish oil) and vitamin D₃ in the real sample was found to be 8. 13 µg/100 g by standard addition method. For the developed method, LOD = $3,7 \times 10^{-8}$ and LOQ = $1,1 \times 10^{-6}$.

Science Code : 20111

Key Words : Voltammetry, determination of vitamin d, square wave voltammetry

Page Number : 59

Supervisor : Prof. Dr. Halit ARSLAN

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın oluşması ve yürütülmesinde, kendisine ne zaman danışsam bana zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle yardımcı olan, bilgileri ve tecrübeleri ile yol göstererek destekolan, saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Halit ARSLAN' a en içten dileklerimle teşekkür ederim. Deneylerim sırasında benimle ilgilenen, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Araştırma Görevlisi Ezgi ADAK ve Araştırma Görevlisi Onur Can BODUR'a teşekkür ederim. Hayatım boyunca koşulsuz sevgileri ve güvenleri ile, her zaman daha iyisini yapabilmem için maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, annem Bilgi UZUN' a, babam Davut UZUN'a ve kardeşim Hamza UZUN'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. D vitamini.....	2
2.1.1. D vitamininin kimyasal yapısı ve özellikleri	2
2.1.2. D vitamininin kaynakları.....	3
2.1.3. D vitamininin metabolizması	4
2.1.4. D vitamini ve sağlığımız	6
2.2. Elektrokimya	8
2.2.1. Elektroanalitik Kimya	8
2.2.2. Voltametri	11
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI	21
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
4.1. Kullanılan Cihazlar	25
4.2. Elektrokimyasal Hücre ve Kullanılan Elektrotlar	25
4.3. Çözeltilerin Hazırlanması.....	26
4.3.1. $1,0 \times 10^{-1}$ M Tetrabütilamonyum tetrafloroborat çözeltisi.....	26
4.3.2. $1,0 \times 10^{-2}$ M D ₃ vitamini çözeltisi	26
4.3.3. $1,0 \times 10^{-3}$ M D ₃ vitamini çözeltisi	26

	Sayfa
4.3.4. Askorbik asit ($1,0 \times 10^{-2}$ M) çözeltisi	26
4.3.5. Ürik asit ($1,0 \times 10^{-4}$ M) çözeltisi	27
4.3.6. $5,40 \times 10^{-4}$ M B ₁ , $3,87 \times 10^{-5}$ M B ₂ , $2,153 \times 10^{-4}$ M B ₆ vitamini	27
4.3.7. 0,317 M E vitamini	27
4.3.8. $1,8 \times 10^{-5}$ M C vitamini	27
4.3.9. Gerçek numune	27
5. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	29
5.1. D ₃ vitamininin Kalitatif Tayini	29
5.2. Destek Elektrolitin Belirlenmesi	31
5.3. Çalışma Elektrodunun Belirlenmesi	31
5.4. D ₃ Vitamini Tayininde Gözlenebilme Sınırının (LOD), Tayin Sınırının (LOQ) ve Doğrusal Çalışma Aralığının (LOL) Belirlenmesi	34
5.4.1. Gözlenebilme sınırının (LOD) belirlenmesi	34
5.5. D ₃ vitamininin Kantitatif Tayini	35
5.5.1. $1,0 \times 10^{-2}$ M D ₃ vitamini standartları ile çizilen kalibrasyon grafiği	35
5.5.2. $1,0 \times 10^{-3}$ M D ₃ vitamini standartları ile çizilen kalibrasyon grafiği	38
5.6. Girişim Çalışması	39
5.6.1. D ₃ vitamini tayinine askorbik asidin girişim etkisi	39
5.6.2. D ₃ vitamini tayinine ürik asitin girişim etkisi	40
5.6.3. D ₃ vitamini tayinine B ₁ , B ₂ , B ₆ vitaminlerinin girişim etkileri	41
5.6.4. D ₃ vitamini tayinine E vitamininin girişim etkisi	42
5.6.5. D ₃ vitamini tayinine C vitamininin girişim etkisi	44
5.7. Sentetik Numune Analizi	44
5.8. Gerçek Numune Analizi	47
5.8.1. Ton balığı	47
5.8.2. D vitamini numunesi	50
6. YORUM VE ÖNERİLER	53

Sayfa

KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	59

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Vitamin D' nin kimyasal yapısı ve özellikleri.....	2
Çizelge 2.2. Bazı gıdalardaki D vitamini miktarları	4
Çizelge 2.3. Serum 25 (OH) D değerinin yorumu	6
Çizelge 5.1. 5,00 mL DE içerisinde $1,0 \times 10^{-3}$ M D ₃ vitamini ilavelerine karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar	34
Çizelge 5.2. LOD ve LOQ çalışması	35
Çizelge 5.3. 5,00 mL DE içerisinde 1×10^{-2} M D ₃ vitamini ilavelerine karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar	37
Çizelge 5.4. 5,00 mL DE içerisinde 1×10^{-3} M D ₃ vitamini ilavelerine karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar	38
Çizelge 5.5. Şekil 5.16'deki voltamogramlardan derişimlere karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar	46
Çizelge 5.6. 5,00 mL DE ve ton balığı yağı içerisinde 1×10^{-3} M D ₃ vitamini ilavelerine karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar	49
Çizelge 5.7. 5,00 mL DE ve D vitamini numunesi içerisinde $1,0 \times 10^{-2}$ M D ₃ vitamini ilavelerine karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar	51

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. a) D ₂ vitamini ve b) D ₃ vitamini moleküler yapıları	3
Şekil 2.2. D vitamini kaynakları ve metabolizması	3
Şekil 2.3. D vitamininin sentez metabolizması.....	5
Şekil 2.4. Elektrot yüzeyine madde taşınma yolları	10
Şekil 2.5. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması	11
Şekil 2.6. Voltametrik ölçümlerde kullanılan üç elektrotlu elektrokimyasal sistem	12
Şekil 2.7. Voltametrik çalışmalarda kullanılan üç elektrotlu elektrokimyasal hücre	13
Şekil 2.8. Referans elektrotlar (a) DKE, (b) Ag/AgCl, (c) SHE.....	14
Şekil 2.9. Karşıt Elektrotlar	14
Şekil 2.10. Voltametrik yöntemlerde kullanılan çalışma elektrotları	15
Şekil 2.11. Voltametrik yöntemlerin sınıflandırılması	16
Şekil 2.12. Dönüşümlü voltametri tekniğinde zamana karşı gerilim eğrisi ve ölçüm sonucu alınan dönüşümlü voltamogram	17
Şekil 2.13. Kare dalga voltametrinde potansiyelin zamanla değişimi	18
Şekil 2.14. Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyali ve elde edilen bir kare dalga voltamogramı	18
Şekil 5.1. D ₃ vitamininin dönüşümlü voltametri ile alınan voltamogram.....	30
Şekil 5.2. D ₃ vitamininin kare dalga voltametrisi ile anodik yönde alınan voltamogramı	30
Şekil 5.3. D ₃ vitamininin tayininde destek elektrolitin belirlenmesi için anodik yönde kare dalga voltametrisi ile yapılan çalışmalar (5,00 mL 0,10 M TBATFB çözeltisi içerisinde $3,846 \times 10^{-5}$ M D ₃ vitamini).....	31
Şekil 5.4. D ₃ vitamininin tayininde çalışma elektrodunun belirlenmesi için kare dalga voltametrisi ile anodik yönde yapılan çalışmalar (5,00 mL 0,10 M TBATFB çözeltisi içerisinde $3,846 \times 10^{-5}$ M D ₃ vitamini).....	32
Şekil 5.5. 5,00 mL DE içerisine $1,0 \times 10^{-3}$ M standart D ₃ vitamini ilaveleri için, kare dalga voltametrisi ile elde edilen kalibrasyon grafiği çalışması	33
Şekil 5.6. $1,0 \times 10^{-3}$ M standart D ₃ vitamini için kare dalga voltametrisi ile yapılan çalışma sonucu	34

Şekil	Sayfa
Şekil 5.7. $1,0 \times 10^{-2}$ M standart D ₃ vitamini ilaveleri için kare dalga voltametrisi ile elde edilen kalibrasyon grafiği çalışması	36
Şekil 5.8. Çizelge 5.3'den elde edilen verilere göre çizilen kalibrasyon grafiği	37
Şekil 5.9. $1,0 \times 10^{-3}$ M standart D ₃ vitamini ilaveleri için kare dalga voltametrisi ile elde edilen kalibrasyon grafiği çalışması	38
Şekil 5.10. Çizelge 5.4'den elde edilen verilere göre çizilen kalibrasyon grafiği	39
Şekil 5.11. $1,0 \times 10^{-2}$ M askorbik asit ile yapılan girişim çalışmasının kare dalga voltametrisine ait voltamogramları.....	40
Şekil 5.12. $1,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit ile yapılan girişim çalışmasının kare dalga voltametrisine ait voltamogramları.....	41
Şekil 5.13. $5,40 \times 10^{-4}$ M B ₁ , $3,87 \times 10^{-5}$ M B ₂ , $2,153 \times 10^{-4}$ M B ₆ vitamini ile yapılan girişim çalışmasının kare dalga voltametrisine ait voltamogramları.....	42
Şekil 5.14. 0,317 M E vitamini ile yapılan girişim çalışmasının kare dalga voltametrisine ait voltamogramları.....	43
Şekil 5.15. $8,17 \times 10^{-5}$ M C vitamini ile yapılan girişim çalışmasının kare dalga voltametrisine ait voltamogramları.....	44
Şekil 5.16. Sentetik örnekteki 65,5 µM D ₃ vitamininin anodik kare dalga voltametrisi kullanılarak standart ekleme metodu ile tayini.....	45
Şekil 5.17. Şekil 5.16'deki voltamogramların yarı türevlerinin alınmış hali.....	46
Şekil 5.18. Çizelge 5.5'e göre çizilen standart ekleme grafiği	47
Şekil 5.19. Ton balığı örneğindeki D ₃ vitamininin anodik kare dalga voltametrisi kullanılarak standart ekleme metodu ile tayini.....	48
Şekil 5.20. Şekil 5.19'deki voltamogramların yarı türevlerinin alınmış hali.....	49
Şekil 5.21. Çizelge 5.6'ya göre çizilen standart ekleme grafiği	50
Şekil 5.22. D vitamini numunesindeki D ₃ vitamininin anodik kare dalga voltametrisi kullanılarak standart ekleme metodu ile tayini.....	51
Şekil 5.23. Şekil 5.22'deki voltamogramların yarı türevlerinin alınmış hali.....	52
Şekil 5.24. Çizelge 5.7'ye göre çizilen standart ekleme grafiği	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

μA

mikroamper

μM

mikromolar

Kısaltmalar

Açıklamalar

CV

Dönüşümlü voltametri

DE

Destek elektrolit

DPV

Diferansiyel puls voltametrisi

GC

Gaz kromatografisi

GC-MS

Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi

GCE

Camsı karbon elektrot

GO

Grafen oksit

HPLC

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

KGE

Kalem grafit elektrot

LOD

Gözlenebilme sınırı

LOQ

Tayin sınırı

PGE

Kalem grafit elektrot

SWV

Kare dalga voltametri

TBATFB

Tetrabütilamonyum tetrafloraborat

VDR

Vitamin D reseptörleri

WHO

Dünya Sağlık Örgütü

25- (OH) D

25 Hidroksi Vitamin D

1. GİRİŞ

İnsanın sağlıklı bir şekilde büyümesi ve gelişmesinde vitaminlerin önemi büyüktür. Vitaminler içinde yer alan D vitamini ise kemik hastalıkları başta olmak üzere bireyin sağlıklı yaşamını etkileyen birçok sistem için büyük öneme sahiptir. D vitamininin birincil kaynağı bireyin cildinin güneşten alınan ultraviyole ışığa maruz kalması ile üretilir. D vitamini kaynaklarının başında Güneş ışınları olmakla birlikte, D vitamini somon, uskumru, kılıç balığı, alabalık, ton balığı ve sardalya gibi yağlı balıklar, peynir, tereyağı, yumurta, mantar, maydonoz, yulaf gibi birçok besinde de bulunmaktadır (Ross AC, Taylor CL, 2011).

Günümüzde, ilerleyen tüm sağlık teknolojisi ve beslenme çeşitliliğine rağmen D vitamini eksikliği sessiz bir salgın şeklinde yayılmaktadır.

Geçmişte D vitamini sadece kemik ve kas yapısını güçlendiren bir vitamin olarak bilinirken, son yıllarda yapılan araştırmaların sonuçlarına bakıldığında Vitamin D reseptörleri (VDR) lerin beyin, kalp, mide, pankreas, lenfositler, prostat, meme, kolon, deri ve gonadlar, barsak gibi çok sayıda organda bulunduğu görülmektedir. Gerek VDR gen hasarlı ya da gen hasarsız D vitamini eksikliği hücre farklılaşması, oksidasyon bozuklukları, T hücre farklılaşmasına neden olarak tüberküloz, enfeksiyon hastalıkları, astım, diyabet, kanser, romatizmal hastalıklar, otoimmün hastalıklar, miyokart enfarktüsü, alerjik hastalıklar ve otizm olmak üzere birçok hastalık için risk faktörü oluşturmaktadır (Sutton AL, 2003).

İnsan sağlığı üzerinde büyük etkileri bulunan D vitaminin doğru ve kesin olarak tayini için oldukça duyarlı yöntemlere ihtiyaç vardır. D3 vitamini tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), Yüzey Plazmon Rezonansı, diferansiyel puls voltametri (DPV) gibi yöntemler kullanılmıştır. Voltametrik çalışmalar incelendiğinde, çoğu çalışmada elektrotun ön işlem uygulanarak modifiye edildiği görülmektedir. Bu sebeple D vitaminin doğru ve kesin olarak belirlenmesi için oldukça duyarlı yöntemlere ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada, çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrotu, karşıt elektrot olarak Platin telden oluşan üç elektrotlu sistemle D vitamini tayini yapılmıştır. Çalışmamızın diğer çalışmalardan farkı elektrotlara ön işlem uygulamadan doğrudan, düşük maliyet, yüksek hassasiyet, yüksek doğruluk ve çok kısa sürede tayininin yapılabilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. D vitamini

2.1.1. D vitamininin kimyasal yapısı ve özellikleri

Vitaminler; vücutta üretilmeyen, beslenme yoluyla alınması zorunlu bileşiklerdir. Koenzim olarak enzim tepkimelerinde görevli olan bu bileşikler, insan metabolizması için vazgeçilmezdir (Holick, 2004).

D vitamininin, diğer vitaminlerden farklı özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikleri, birinci olarak deri altında bulunan 7- dehidrokolesterol güneş ya da UV ışık altında D₃ vitaminine dönüşür böylece vücutta üretilebilirler (Holick, 2005). İkinci olarak; aktif şekilleri koenzim değildir (Glerup, ve diğerleri, 2000). Kimyasal yapılarının steroid hormonlara benzerliği ve bir dokuda sentezlenip hedef dokuya etki etmesi için dolaşım sistemine salındığından, hormon olarak da sınıflandırılabilirler (Balcı, 2021).

Çizelge 2.1. Vitamin D' nin kimyasal yapısı ve özellikleri

D vitamininin kimyasal adı	(3 β , 5Z, 7E) -9, 10-Secokolesta-5,7, 10 (19) -trien-3-ol
Molekül formülü	C ₂₇ H ₄₄ O
Molar kütle	384,64 g/mol
Erime noktası	83 °C
Kaynama noktası	496, 4 °C

D vitamininin besinlerle alınan ergokalsiferol (vitamin D₂) ve deride sentezlenen kolekalsiferol (vitamin D₃) olmak üzere iki kaynağı vardır. D₂ ve D₃ vitaminin her ikisi de aynı yolla metabolize olduğu için ortak bir isimle, D vitamini olarak adlandırılır. D₂ ve D₃ vitaminlerinin etkileri benzer olmakla birlikte D₃ vitamininin biyolojik etkinliği daha fazladır (Deluca HF, 2004).

Güneş Işığından D Vitamini Sentezlenmesi

D vitamininin önemli bir kısmı (genellikle %50 ile %90 arasında) cildin güneş ışınlarına maruz kalmasıyla 7-dehidrokolesterolden vitamin D₃ (kolekalsiferol) üretilmesi ile oluşur (Borradale & Kimlin, 2009; Holick, 2008; Lips, 2010).

D₃ vitamininin güneş ışığı ile sentezi birçok etkene bağlıdır. Bu etkenler; coğrafi bölgeler, iklim koşulları, ileri yaş, obezite, güneş koruyucuların kullanımı, ışığa maruz kalma süresi olarak belirtilebilir (Engelsen, 2010; Lips, 2010).

Doğal Besin Kaynaklarından D₃ Vitamini Sentezlenmesi

D vitamininin doğal besin kaynakları sınırlı sayıdadır (Teichmann, 2007). D₃ vitamini sırasıyla en çok balıkta, et, süt ve yumurta sarısı gibi doğal besinlerde bulunur. D₂ vitamini ise bitkiler tarafından güneş ışınının katalizlediği tepkimeler sonucu üretilir ve metabolizmaya bitkisel gıdalarla alınır.

Çizelge 2.2. Bazı gıdalardaki D vitamini miktarları

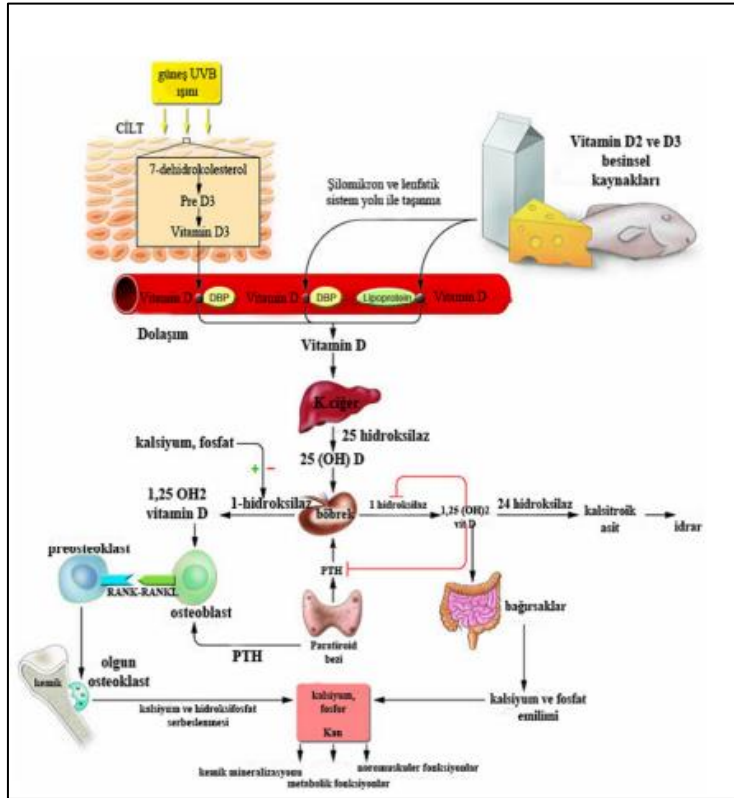
Besinler	İçerdiği D Vitamini (IU/100 gr)
Biftek	13 (0,000325 mg)
Tereyağı	35 (0,000875 mg)
Peynir	12 (0,0003 mg)
Yumurta Sarısı	25 (0,000625 mg)
Sardalya	1500 (0,0375 mg)
Uskumru	120 (0,003 mg)
Lahana	0,2 (0,00005 mg)

2.1.3. D vitamininin metabolizması

Besinlerle alınan ya da deride sentezlenen D vitamini, karaciğerde 25 Karbondan hidroksillenerek 25hidroksi D formuna dönüştürülür. 1alfa-hidroksilaz enzimi D vitamini eldesinde elzem bir enzimdir. Böbreğe taşınan 25hidroksi D ekstrarenal doku içindeki 1alfa-hidroksilaz enzimi ile 1,25hidroksi2D formuna dönüştürülür. D Vitamini böbrekten D vitamini Bağlayıcı Protein (DBP)' ye bağlanarak dolaşıma giren 1,25-dihidroksi vitamin D, kalsiyum ve fosfat düzeyini ayarlama önemli rol oynar.

1,25-dihidroksi D vitamini sentezi için önemli olan 1α -hidroksilaz enzimi; hipokalsemi, hipofosfatem ve PTH ile aktive olurken; 1,25-dihidroksi D vitamini artışı bu enzimin etkinliğini önler. (Bayraktar, 2017)

D vitamininin tüm şekilleri serumda DBP' ye bağlanarak taşınır ve sadece %1-3'ü serbest şekildedir. D vitamininin hedef dokudaki reseptörlerinde etki göstermesi için ilk olarak karaciğerde sitokrom P450-25 hidroksilaz enzimi (CYP27A1) ile 25-hidroksi D vitaminine (25 (OH) D) daha sonra böbrekte 1α -hidroksilaz enzimi (CYP27B1) ile 1,25-dihidroksi D vitaminine (1,25(OH)₂D) (aktif vitamin D) dönüşmesi gerekir. D vitamini biyosentezinde 25-hidroksilaz enzimi anahtar enzim durumunda olup, bu enzimde bulunan gendeki homozigot mutasyon klasik D vitamini eksikliğine ait bulgular ile düşük 25(OH)D düzeyleri ile sonuçlanır. Vücudun tüm D vitamini durumu hakkında en iyi bilgi veren parametre 25(OH)D olup, yarılanma ömrü 15-20 gün olarak bilinmektedir. Vücutta 25 (OH)D ve 1,25(OH)₂D dolaşımında DBP'ye bağlanarak taşınır. Bu sebeple doğrudan dolaşan aktif D vitamini ölçümünün aktif D vitamininin biyolojik aktivitesini yansıtmayacağı bildirilmiştir. (Özkan & Döneray, 2011)



Şekil 2.3. D vitamininin sentez metabolizması (Güleken, 2012)

2.1.4. D vitamini ve sağlığımız

D vitamininin aktif formu 1,25(OH)D₂ olarak bilinmesine rağmen vücuttaki miktarı hakkındaki en güvenilir sonucu veren parametre 25(OH)D’dir. Bunun nedeni; D vitamininin en aktif formu olan 1,25(OH)D₂’nin yarılanma ömrü 3-6 saat, 25(OH)D’ nin yarılanma ömrü ise 20 gündür. D vitamini eksikliği tanısında 25(OH)D ölçütü kullanılmaktadır (Buğrul F, 2011).

Çizelge 2.3. Serum 25 (OH) D değerinin yorumu (Buğrul F, 2011)

D vitamini düzeyi (ng/ml)	D vitamini düzeyi (nmol/L)	Yorum
< 12	< 30	Bebek ve çocuklarda raşıtzmlle, erişkinlerde osteomalazi ile ilişkili D vitamini eksikliği
12-20	30-50	Sağlıklı bireylerde kemik ve genel sağlık ağısından D vitamini yetersizliği
≥20	50-125	Sağlıklı bireylerde kemik ve genel sağlık ağısından D vitamini yeterli düzeyi

T. C. Sağlık Bakanlığı D vitamini düzeyleri konusunda yayınladığı genelgede, erişkinler için istenilen düzeyin 40 ng/ml’nin üzerinde olmasını belirterek, 25 ng/ml’nin altında olmasını yetersizlik, 10 ng/ml’nin altında olmasını eksiklik olarak kabul etmektedir (Buğrul F, 2011).

Vitamin D eksikliğine yol açan nedenler şöyle sıralanabilir:

- Yetersiz emilim
- Diyetle yetersiz alım
- Yetersiz güneş ışığı maruziyeti
- İnce bağırsak hastalıkları (Çölyak hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalıkları vb.)
- Pankreas yetersizliği
- Kronik karaciğer hastalıkları (siroz vb.)

D vitamininin fizyolojik etkilerin dışında, birçok sistemi etkilediği gözlenmiştir. İmmun sistemde, inflamasyonda, hücre proliferasyonu gibi birçok biyolojik evreyi etkilemesi nedeniyle eksikliği, son yıllarda daha fazla önem verilmesini sağlamıştır.

Günümüzde, raşitizm, osteoporoz ve osteomalazi gibi fizyolojik hastalıkların yanı sıra, otoimmün hastalıklar, kanserler, kardiyovasküler hastalıklar, Tip I diyabet gibi pek çok patolojik süreçte de etkisi olduğu bilinmektedir.

Bu sebeple Türkiye’de ve Dünya’da yaygın gözlenen sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır (Ardeniz 2008, Uçan ve Delibaş 2015, Karagöl ve Atak 2016).

D vitamininin iskelet sistemi üzerine etkisi

Vücutta fosfor seviyesi böbrekler, kalsiyum seviyesi ise bağırsaklar tarafından düzenlenir. D vitamininin etkisi olmadan fosforun sadece %60’ı, kalsiyumun ise %10-15’i emilirken 1,25 (OH) 2D ile VDR etkileşimi sonucunda bu oranlar kalsiyum için %30-40, fosfor için %80’e çıkmaktadır (Holick MF, 2008).

Raşitizm, D vitamini eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Raşitizm de hem kemik yapımı hem de kemik sağlığı etkilenir. Raşitizme düşük kalsiyum, artan paratiroid hormon ve D vitamini seviyesinin azalması neden olmaktadır (Hatun Ş, 2003)

D vitamininin bağışıklık sistemi üzerine etkisi

D vitamini bağışıklık sistemi içinde önemli bir etkiye sahiptir. Kış aylarında, güneş ışınlarının yetersiz olduğu kuzey yarım kürede, yapılan araştırmalar sonucu, tip I diyabet mellitus, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, multipl skleroz, bazı kronik hastalıkların fazla olduğu gözlemlenmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre; takviye D vitamini alımının romatoid artrit, tip I diyabet mellitus, multiple skleroz gibi hastalıklar üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Buğrul F, 2011).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda romatoid artritli hastalarda %60 oranında kan 25 (OH) D seviyesi düşük bulunmuştur (Aguado P, 2000). Yine farklı bir çalışmada ülseratif kolit ve Crohn gibi inflamatuvar barsak hastalıklarında da D vitamini seviyeleri düşük bulunmuştur (Jahnsen J, 2002).

D vitamininin solunum sistemi üzerine etkisi

Pnömoni, tüberküloz ve bronşiyolit gibi solunum yolu enfeksiyonları D vitamini eksikliği ile ilişkilendirilmektedir. Akut alt solunum yolu enfeksiyonları, ağırlıklı olarak pnömoni, dünyanın her bölgesinde beş yaşın altında daha fazla çocuğun ölümüne sebep olmaktadır.

D vitamini ve metabolik hastalıklar

D vitamininin osteoporoz teşhisi konmuş ve uzun süreli sedef hastalığı tedavisi olan kişiler üzerinde etkin olduğu gösterilmiştir. Hastalığa sahip bireylere D vitamini takviyesi yapıldığında hastanın lezyonlarında düzelme gözlenmiştir. Dev verru, Grover hastalığı, morfea, vitiligo, oral lökoplaki gibi deri hastalıklarında tedavi olarak D vitamini takviyesi uygulanmaktadır (Kulie T, 2009).

Araştırmalar obezite ile D vitamini düzeyini ilişkilendirmektedir. D vitamini seviyesi düşük olan bireylerde D vitamini düzeyleri normal olanlara göre, vücut kitle indeksi yüksek bulunmuştur. Eşit olarak güneş ışığına maruz bırakılan obez bireyler obez olmayanların yarısı kadar D vitamini üretebilmektedir. Sonuç olarak obezlerde deri altında yağ dokusu birikmesine bağlı olarak deride D vitamini sentezi ve D vitaminin dolaşım sistemine salgılanması azalır. Bu şekilde gelişen D vitamini eksikliğine bağlı hipotoni, obezitenin oluşumuna da katkıda bulunur (Adams JS, 2010)

2.2. Elektrokimya

Kimya biliminin bir dalı olan elektrokimya, elektriksel ve kimyasal etkileşimlerin birbirleri ile olan ilişkisini inceler. Elektrokimyanın büyük bir bölümü, elektrik akımının geçmesi ile meydana gelen kimyasal değişikliklerin incelenmesi ve kimyasal tepkime sonucu elektrik enerjisinin üretilmesi ile ilgilidir (Bard & Faulkner, 2001, s. 15-25).

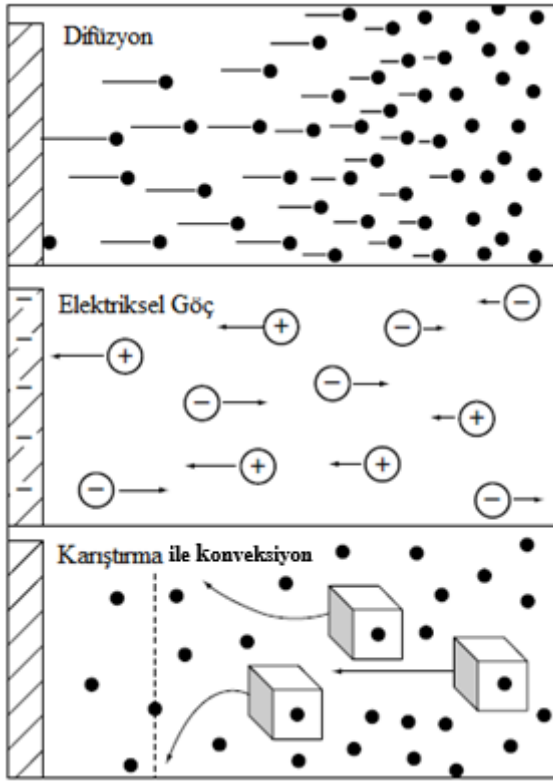
2.2.1. Elektroanalitik kimya

Elektroanalitik Kimya; numune çözeltisini içeren bir elektrokimyasal hücrede, analit – elektrik etkileşimine dayanarak yapılan kalitatif ve kantitatif analiz teknikleri grubudur. Elektroanalitik yöntemler elektrik ve kimya arasındaki etkileşimini incelemektedir. Bir

başka deyişle akım, potansiyel, yük ile kimyasal parametrelerin ilişkisinin ölçümüdür. Analitik amaçlar için elektriksel ölçümlerin kullanılması, çevresel görüntüleme, biyomedikal analizler ve endüstriyel kalite kontrolü gibi birçok uygulama örneği ile karşımıza çıkmaktadır (Wang J. , 2006, s. 1-60).

Elektroanalitik yöntemlerde; elektrot yüzeyine madde taşınması üç farklı yolla gerçekleşir.

- ❖ Difüzyon; derişim farkı olan iki bölge arasındaki çözeltinin iyonların veya moleküllerin daha derişik bölgeden daha seyreltik bölgeye doğru hareket etmesine denir. Bu hareket derişim farkı kalmayıncaya kadar devam eder. Şekil 2. 4'te yüzeyden uzaklığa bağlı olarak derişim değışiminin temsili diyagramı verilmiştir.
- ❖ Elektriksel göç; iyonların bir elektriksel alan etkisiyle hareket etmesine denir. Şekil 2. 4'te göç sonucu anyonlar pozitif elektroda katyonlar ise negatif elektroda hareket ettiğı gösterilmiştir. Elektriksel göç, bir hücre içindeki çözeltide kütle aktarımının ana sebebidir. Elektrokimyasal yöntemlerin çoğunda analit türünün göçü istenmez. Bunun yerine negatif yüklü elektrotta anyonların ve katyonların indirgenmesi ve pozitif yüklü elektrotta katyonların ve anyonların yükseltgenmesi istenilir. Bu amaçla ortama destek elektrolit adı verilen derişimi analit çözeltisinin derişiminden yaklaşık 1000 kat fazla olan, iyonik hareketliliğı yüksek, elektroanalitik çalışma şartlarında elektroaktif olmayan, ortamdaki türlerle kimyasal tepkimeye girmeyen bir çözelti ilave edilerek analitin göçü en aza indirilebilir (Arslan, 2021).
- ❖ Konveksiyon; mekanik yollarla bir elektroda doğru ve elektrottan dışarıya madde taşınmasına denir. Karıştırma, çalkalama veya sarsma gibi müdahalelerle meydana getirilen konveksiyona zorlamalı konveksiyon, sıcaklık ve yoğunluk farkından kaynaklanan konveksiyona doğal konveksiyon denir (Skoog, West, & Holler, 2004, s. 630-640).

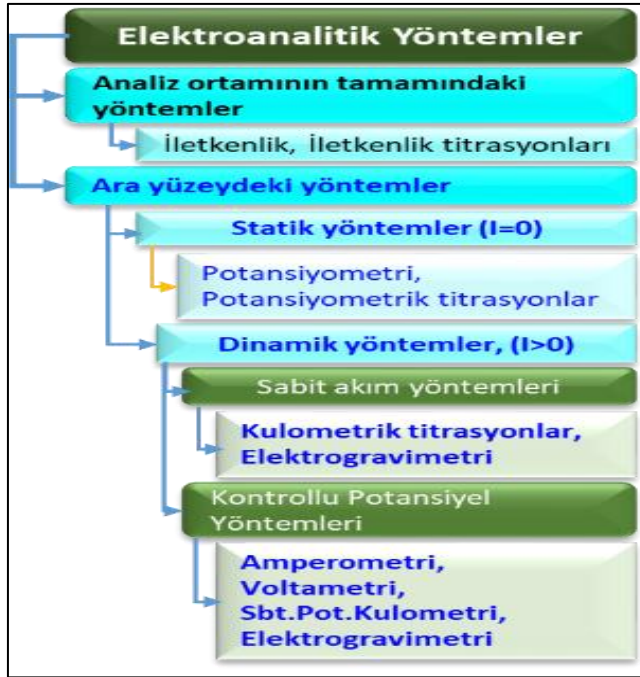


Şekil 2.4. Elektrot yüzeyine madde taşınma yolları (Wang, 2006: 6)

Elektroanalitik yöntemler; yüksek hassasiyet, elektroaktif türlere karşı yüksek seçicilik, geniş doğrusal çalışma aralığı, maliyetin ekonomik olması, analiz için ihtiyaç duyulan numune miktarının çok az olması, kesinlik ve duyarlılık gibi avantajlara sahiptir (Wang J., 2006, s. 1-60; Uslu & Özkan, 2011).

Tüm bu avantajlar değerlendirilerek tez çalışması kapsamında D vitamini tayinine yönelik bir analitik yöntem geliştirilmesi için elektroanalitik yöntemlerin tercih edilmesine karar verildi.

Elektroanalitik yöntemlerin kendi içinde çeşitli sınıflandırılması Şekil 2.5' de belirtilmiştir.



Şekil 2.5. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması (Arslan, 2021)

Tez çalışması kapsamında burada belirtilen yöntemlerden kare dalga voltametri kullanıldı.

2.2.2. Voltametri

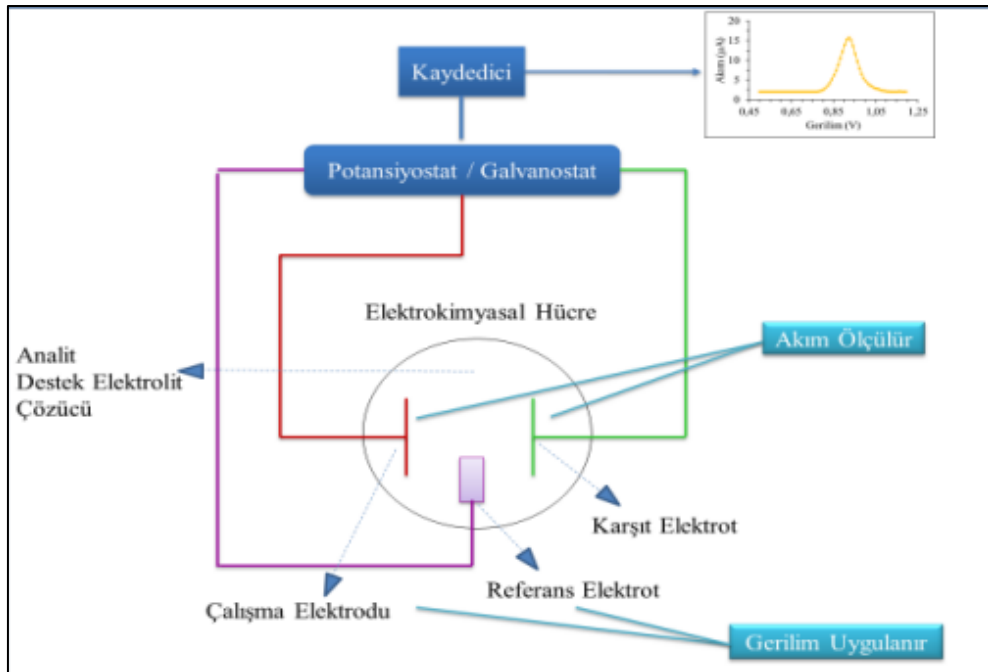
Voltametri, tam derişim polarizasyonu şartları altında bir elektrokimyasal hücrede oluşan akımın ölçülmesidir. Voltametri, 1920'li yılların başlarında Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından polarografi yönteminin keşfedilmesi ile gelişmeye başlamıştır. Voltametrimin hala önemli bir dalı olarak bilinen polarografının, diğer voltametrik tekniklerden farkı, çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodun (DCE) kullanılmasıdır. Voltametri;

- ✓ Analitik çalışmalar başta olmak üzere fizikokimya, inorganik kimya ve biyokimya alanlarında,
- ✓ Çeşitli ortamlarda meydana gelen indirgenme ve yükseltgenme tepkimelerinin incelenmesinde,
- ✓ Yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılmasında,
- ✓ Kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının açıklanmasında oldukça yaygın kullanım alanları olan bir yöntemdir (Skoog, West, & Holler, 2004, s. 665-704).

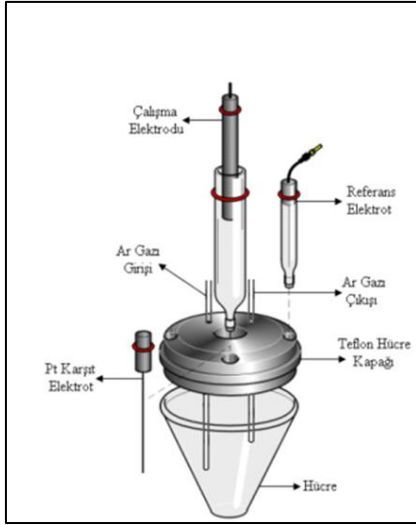
Voltametrik yöntemler, polarizasyon şartlarında elektrokimyasal hücrede çalışma elektroduna uygulanan ve zamanla doğrusal olarak artan potansiyel ile gerçekleşen elektrokimyasal değişim sonucunda, hücreden geçen akımın ölçüldüğü yöntemlerdir. Çalışma elektroduna uygulanan potansiyele karşılık okunan akım grafiğe geçirildiğinde voltamogram adı verilen bir eğri elde edilir. Voltametrik çalışmalardan elde edilen voltamogramın yorumlanması ile kalitatif, kantitatif tayin, elektrot kinetiği, elektrokimyasal tepkimeden alınan veya verilen elektron sayısı, adsorpsiyon, dönüşümlülük vb. daha birçok bilgi elde edilir (Arslan, 2021).

Voltametrik yöntemlerde kullanılan elektrotlar

Voltametrik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda elektrokimyasal hücreler iki ya da üç elektrotlu sistemlerdir. Son yıllarda daha çok üç elektrotlu sistemler kullanılmaktadır. Deneyler, elektrokimyasal hücrenin içerisinde iyonik bir elektrolit ortamı olmak üzere sulu veya susuz çözelti varlığında yapılır. Kullanılan bu çözeltiye destek elektrolit adı verilir. Kullanılan sistem üç elektrotlu ise bunlar; çalışma elektrodu, referans (karşılaştırma) elektrot ve karşıt elektrot şeklindedir. İki elektrotlu sistemlerde referans elektrotlar yoktur. Tez çalışması kapsamında üç elektrotlu sistem kullanılmıştır.



Şekil 2.6. Voltametrik ölçümlerde kullanılan üç elektrotlu elektrokimyasal sistem (Özbal, 2020)



Şekil 2.7. Voltametrik çalışmalarda kullanılan üç elektrotlu elektrokimyasal hücre

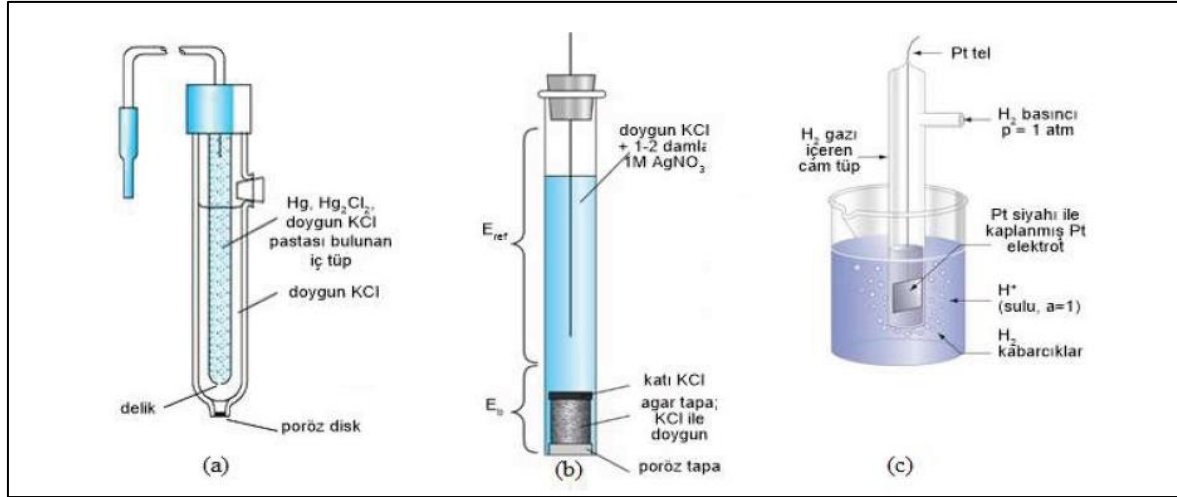
Referans elektrotlar

Deney süresince ortamdaki sıcaklık ve zaman gibi çeşitli değişkenlerden etkilenmeyerek potansiyeli sabit kalan elektrot olarak tanımlanabilir. Bu sebeple, hücre içerisinde potansiyeli ölçülen diğer elektrotlarla karşılaştırma yapmak amacıyla kullanılır.

İdeal bir referans elektrot aşağıda belirtilen özelliklere sahiptir;

- ✓ Kolay hazırlanabilir.
- ✓ Tersinirdir.
- ✓ Nernst eşitliğine uygun davranış gösterir.
- ✓ Sıcaklık ve zamanla değişmeyen potansiyele sahiptir.
- ✓ Küçük akım değişikliklerinde potansiyeli sabit ve tekrarlanabilir.

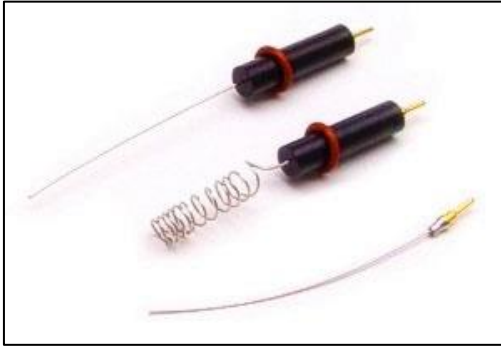
Referans elektrotlar içerisinde yaygın olarak bilinen ve kullanılanları, doygun kalomel elektrot (DKE), gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrotlar ve standart hidrojen elektrot (SHE) dir (Skoog, West, & Holler, 2004, s. 490-518).



Şekil 2.8. Referans elektrotlar (a) DKE, (b) Ag/AgCl, (c) SHE.

Karşıtlar elektrotlar

Karşıtlar elektrotlar çalışma elektrodunun redoks çifti olup genellikle üzerinde suyun bozunduğu elektrotlardır. Birçok inert metal karşı elektrot olarak kullanılabilir. Çalışmalarda genellikle metalik redoks elektrotları (platin, altın, gümüş gibi) kullanılır.

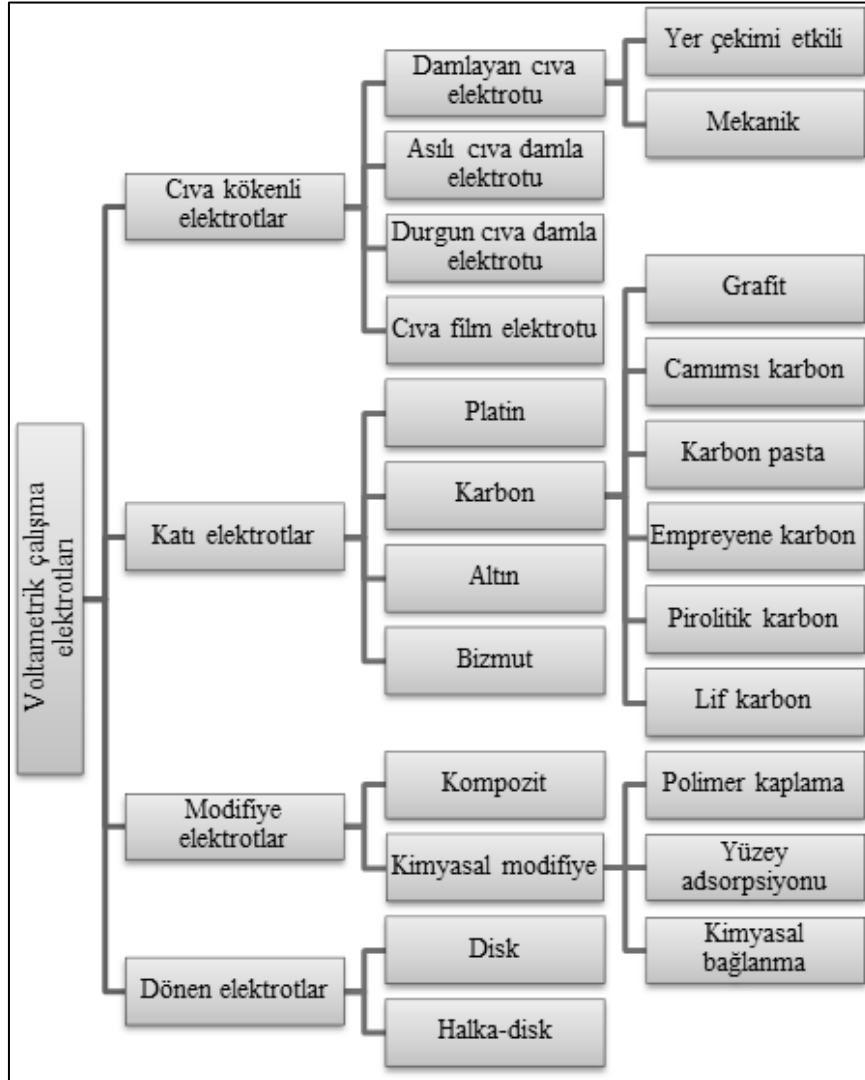


Şekil 2.9. Karşıtlar Elektrotlar

Çalışma elektrotları

Voltametri polarizasyon şartlarında yapılan elektroanalitik bir metot olmasından dolayı, çalışma elektrodu olarak mikro elektrotlar kullanılır. Metalik elektrotların neredeyse hepsi çalışma elektrodu olarak kullanılabilirdiği gibi son yıllarda iletken polimerler ve amalgam elektrotlar, kalem grafit elektrotlar, karbon pasta elektrotlar ve bunların nanopartikül veya bazı kimyasallarla modifiye edilmesi sonucu elde edilen ve modifiye elektrotlar olarak

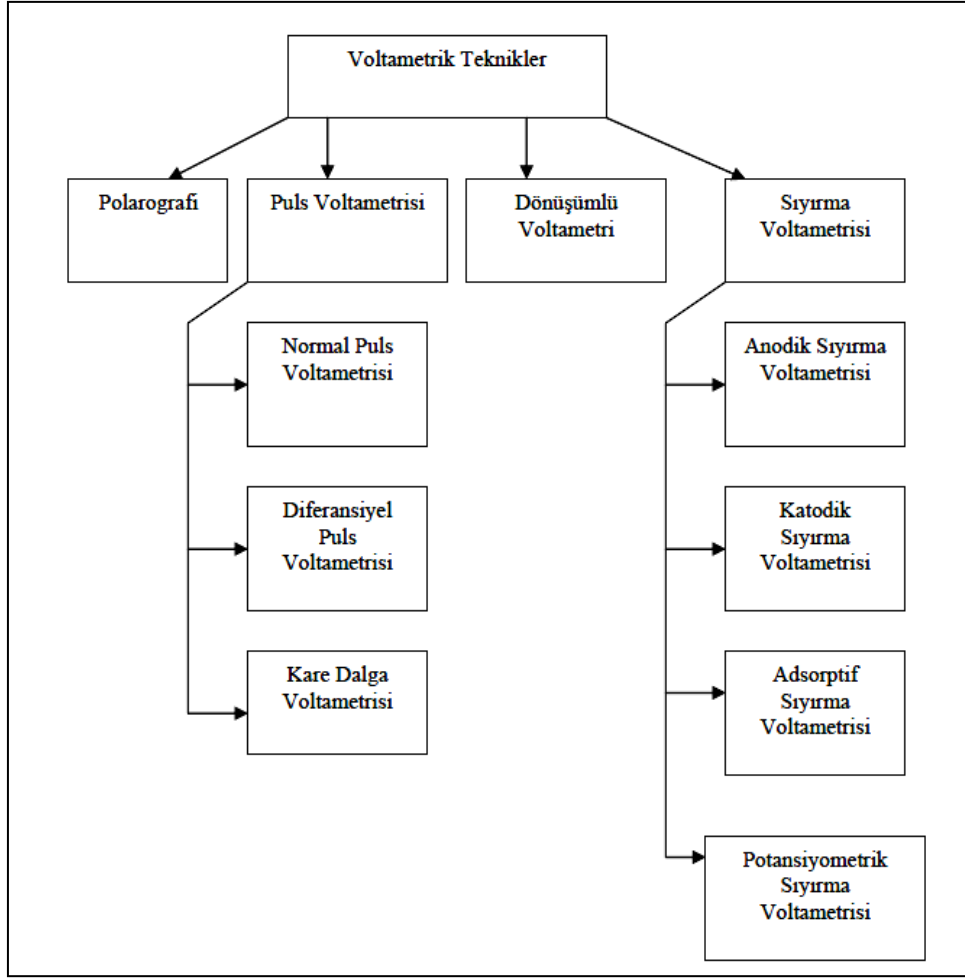
adlandırılan çeşitleri de mevcuttur. Şekil 2.10’ da voltametrik çalışmalarda kullanılan bazı elektrotlar görülmektedir.



Şekil 2.10. Voltametrik yöntemlerde kullanılan çalışma elektrotları

Voltametrik yöntemlerin sınıflandırılması

Voltametrik yöntemlerin temel amacı sisteme belirli bir potansiyel uygulayarak meydana gelen akımı ölçmektir. Voltametri, elektrokimyasal tepkimelerin mekanizmalarını araştırmak için kullanılan önemli tekniklerden biridir. Voltametrik yöntemlerin sınıflandırılması Şekil 2.11’ da verilmiştir.



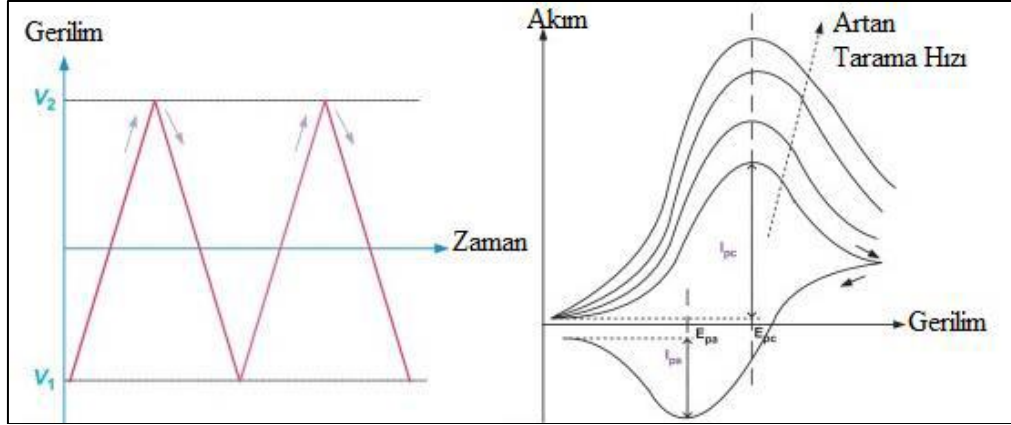
Şekil 2.11. Voltametrik yöntemlerin sınıflandırılması

Aşağıda kullanımı yaygın olan; dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametri ve kare dalga voltametri yöntemleri açıklanmıştır.

Dönüşümlü Voltametri

Elektroanalitik çalışmalarda genellikle ilk olarak uygulanan tekniktir. Dönüşümlü voltametri kantitatif tayin amacı ile kullanımı yaygın olmamakla birlikte elektrokimyasal tepkimelerle ilgili kalitatif tayin amacı ile en yaygın kullanılan tekniktir. Bunun nedeni, dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak redoks tepkimelerinin termodinamiği, elektron transfer tepkimelerinin kinetiği ve takip eden kimyasal tepkimeler ve adsorpsiyon olaylarıyla ilgili güvenilir bilgileri hızlı bir şekilde elde edilmesidir (Skoog, West, & Holler, 2004, s. 665-692).

Çalışma elektroduna ileri ve geri yönde bir potansiyel taraması uygulanmasıyla elde edilen akım-potansiyel eğrisine dönüşümlü voltamogram (CV) denir. CV tarama hızı, derişim, sıcaklık gibi çeşitli parametreler değiştirilerek aktif türün davranışları hakkında çeşitli bilgiler elde edilir (Wang J. , 2006).



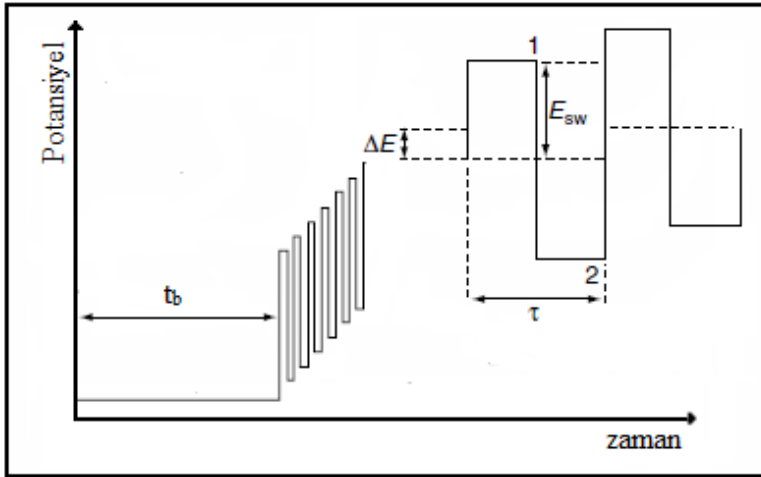
Şekil 2.12. Dönüşümlü voltametri tekniğinde zamana karşı gerilim eğrisi ve ölçüm sonucu alınan dönüşümlü voltamogram (Scott, 2016)

Kare Dalga Voltametri

İlk defa Geoffrey Barker tarafından geliştirilen kare dalga voltametrisi (SWV), Puls voltametri tekniklerinden biridir.

Kare dalga voltametrisinin potansiyel–zaman dalga şekli simetrik kare dalgalardan oluşur.

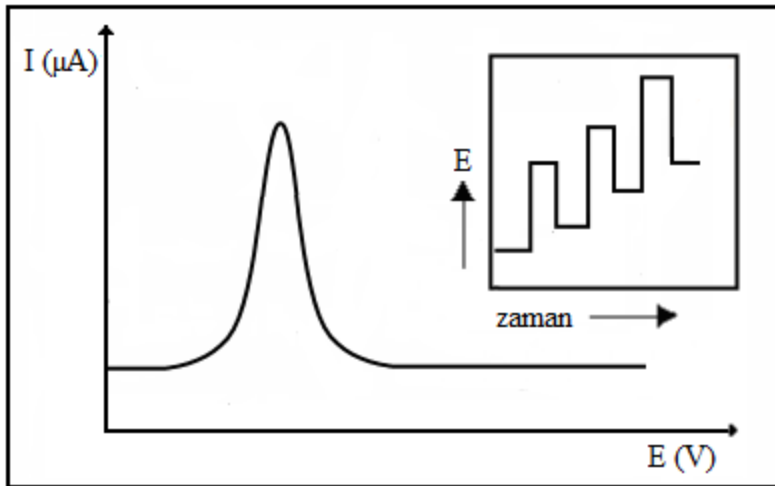
Bir kare dalganın tamamlanma süresi periyod olarak bilinir τ ile gösterilir. Periyod yerine genellikle frekans (f) kullanılır. Frekans $1/\tau$ 'a eşittir. Kare dalga pik akımı ve hassasiyetinin artması, frekansın artması ve buna bağlı olarak periyodun azalmasına bağlıdır. Birbirini takip eden kare dalgalar arasındaki yükseklik farkına basamak potansiyeli adı verilir ve ΔE_s ile gösterilir. Bir kare dalganın en alt ve en üst noktaları arasındaki farkın yarısına ise kare dalga genliği (E_{sw}) denir (Wang J. , 2006, s. 80-81).



Şekil 2.13. Kare dalga voltametrinde potansiyelin zamanla değişimi

Her bir kare dalga tekniğinde akım iki kez ölçülür, ileri yöndeki pulsun sonunda ilk ölçüm, geri yöndeki pulsun sonunda ise ikinci ölçüm alınır. İleri puls için ölçülen akım i_1 , geri puls için ölçülen akım i_2 'dir. Voltamogramları elde etmek için genellikle bu akımların farkı (Δi) $= i_1 - i_2$ 'ye eşittir ve ileri fark akımı olarak adlandırılır.

Potansiyele karşı Δi (net akım) grafiğe geçirildiğinde elde edilen voltamogram Şekil 2.14'de görüldüğü gibi pik şeklindedir.



Şekil 2.14. Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyali ve elde edilen bir kare dalga voltamogramı

Kare dalga voltametrisi son derece hızlı ve duyarlı bir voltametrik yöntemdir. Voltamogramın tamamı 10 ms'den daha az sürede elde edilebilir. Yöntemin tayin sınırları 1×10^{-7} ile 1×10^{-8} M civarındadır.

3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Mendez ve arkadaşları (Mendez, Perez, Zamarreño, & Garcia, 1988) D vitaminin elektroanalitik ve amperometrik davranışlarını incelemişlerdir. Çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrot, destek elektrot olarak lityum perklorat (LiClO_4) çözeltisi içinde çalışma gerçekleştirilmiştir. Sinyalin en iyi tekrarlanabilirliği için optimum deneysel koşullar belirlenmiş ve elektrokimyasal süreci etkileyen farklı parametreler incelenmiştir. D vitamini adsorpsiyonun tersinmez reaksiyon olduğu görülmüştür. D₃ vitamini tayini için çalışma 2×10^{-6} M ve 2×10^{-4} M'lık derişim aralığında önerilmiştir. Gözlenebilme sınırı 2×10^{-6} M düzeyindedir.

Hart ve arkadaşları Norman (Hart, Norman, & Lacey, 1992) yaptıkları bir çalışmada, farmasötik ürünlerdeki D₂ ve D₃ vitaminini dönüşümlü voltametri ve sıvı kromatografi yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Dönüşümlü voltametri ile D₂ vitamini (ergokalsiferol) ve D₃ vitamininin (kolalsiferol) oksidasyonunu, çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrot kullanarak incelemişlerdir. Her iki maddenin de tek adımda oksitlendiğini ve bunun tersinmez bir reaksiyon olduğunu bulmuşlardır. Kolalsiferolün elektrot tepkimesinin pH 4,95 ile 6, 10 arasında değiştiğini ve çözücülerinin %90 metanol içerdiği durumlarda pH 6, 10 ile 8, 65 arasında olduğu bulunmuştur. Bu durumda D₃ vitamini için pKa değerini 6, 10 ve D₂ vitamini için pKa değerini 6, 35 olarak önermişlerdir.

Masuda ve arkadaşları (Masuda, Okano, Kamao, Kaneda, & Kobayashi, 1997), elektrokimyasal dedektör (ECD) kullanarak D vitamini metabolitlerinin çoklu analizlerinde oldukça hassas ve yeni bir HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) testi yöntemi ile çalıştıklarını bildirmişlerdir. Bu yöntemin, beslenme ve klinik durumlarını değerlendirmek için ergokalsiferol ve kolekalsiferol vitaminlerinin tayininde kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir. Çalışma ile önerilen HPLC-ECD test sisteminin biyolojik sıvılardaki D vitamini metabolitlerinin tayininde oldukça hassas bir fizikokimyasal yöntem olarak faydalı olduğu sonucuna varmışlardır. Gözlenebilme sınırı yaklaşık 50 ug/mL dir.

Carlucci ve arkadaşları (Carlucci, ve diğerleri, 2013), hem iskelet sistemindeki hasarların hem de çeşitli patolojik durumların önlenmesinde önemli bir faktör olan D₃ vitamin (25-OHD) tayini için Yüzey Plazmon Rezonansı ve elektrokimyasal tabanlı biyosensörlerin geliştirilmesi için çalışmışlardır. D vitamininin tayininde farklı bir yaklaşım olarak afinite

bazlı biyosensörler ile çalışmışlardır. İlk olarak, D vitamininin doğrudan belirlenmesi için SPR transdüksiyonuna dayalı bir immünosensör ile 2 µg/mL'lik bir LOD elde edilmiştir. Değerin klinik analizdeki ihtiyacı karşılamaması sebebi ile duyarlılığı arttırmak için D vitamini altın nanopartiküller (AuNP'ler) ile modifiye edilmiştir. 25-OHD'nin AuNP'lerle bağlanması SPR sinyalinin amplifikasyonunu değiştirmiş ve LOD'yi 1 µg/ml ile duyarlılığı ikiye katlamıştır. Son olarak, D vitamininin 4-ferrosenilmetil-1,2,4-triazolin-3,5-dion (FMTAD) ile reaksiyonuna dayanan bir elektrokimyasal dönüştürülmüş biyosensör ile çalışılmış ve bu biyosensörle, 10 ng/mL LOD ve 20-200 ng/mL doğrusal aralığında 25-OHD'nin tayini yapılmıştır.

Cincotto ve arkadaşları (Cincotto, Canevari, & Machado, 2014), yaptıkları çalışmada, D₂ (ergokalsiferol) ve D₃ vitamininin (kolekalsiferol) 'ün elektrokimyasal olarak tayinietanol ve su karışımındaki çözücü içinde camı karbon elektrot (GCE) kullanarak yapmışlardır. Destek elektrolit olarak lityum perklorat ile %40 etanol %60 su çözeltisini kullanmışlardır. Organik / su çözücüsünün karıştırma oranının, camı karbon elektrodunun yüzeyindeki D vitaminlerinin elektrokatalitik tepkisi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu düşünmüşlerdir. Yapılan çalışmada D vitamini tayininde A, E ve K vitaminleri için önemli bir etkileşim görmemişlerdir.

Chan ve arkadaşları (Chan, Yue, & Webster, 2014), organik çözücülerde D₂ ve D₃ vitaminleri üzerine voltametrik çalışmalar yapmışlardır. Aprotik organik çözücülerdeki D₂ ve D₃ vitaminlerinin elektrokimyasal davranışlarını, CV, dönen disk elektrot voltametri, kontrollü potansiyel elektroliz ve kimyasal oksidasyon yöntemleri uygulayarak incelemişlerdir. Her iki vitamin de kısa voltametrik zaman ölçeğinde ($\leq$ saniye) tek elektronlu, kimyasal olarak tersinmez bir süreçle diklorometan ve asetonitril içinde elektrokimyasal olarak oksitlendiğini gözlemlemişlerdir. Tarama aralığının (0,1 V s⁻¹ ile 20 V s⁻¹), sıcaklığın (233 K- 293 K) olması, platin ve camı karbon elektrot yüzeylerinde kaydedilen voltametrik tepkiyi önemli derecede etkilememiştir. Gerçekleşen oksidasyon işlemi kimyasal olarak tersinmez olduğunu belirtmişlerdir. Tekrarlanan CV deneyleri ile oksitlenmiş ürünün elektrot yüzeyinde kısmen adsorbe edildiğini ve buna bağlı olarak çoklu taramalarda pik akımlarının azaldığını gözlemlemişlerdir.

Canevari ve arkadaşları (Canevari, Cincotto, Landers, & Machado, 2014), α-nikel (II) hidroksit parçacıklarının organik-inorganik matris üzerinde sentezini ve hassas bir

elektrokimyasal sensörde D vitamini tayinini incelemişlerdir. Yapılan çalışma ile DPV ile D₃ vitaminin tayini için hassas bir elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Çalışmada camsı bir karbon elektrot SiO₂/GO/Ni(OH)₂ ile modifiye edilerek kullanılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, SiO₂/GO/Ni(OH)₂ modifiye edilmiş camsı karbon elektrotun, D₃ vitaminin tayini için çok duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak, D₃ vitamininin pH 13,0'da bir yükseltgenme piki gözlemlemişlerdir. Bu nedenle, D₃ vitamini tespit etmek için bu yöntemin kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir.

Mahmoodani ve arkadaşları (Mahmoodani, Perera, Fedrizzi, Abernethy, & Chen, 2017), HPLC-DAD, UHPLC-MS / MS kullanarak D₃ vitamininin parçalanma çalışmalarını yapmışlardır. Yapılan çalışmada, sıcaklık, iyot, asidik koşullar ve oksidasyon gibi farklı parametrelerin D₃ vitaminin izomerizasyonu üzerindeki etkileri HPLC-DAD ve UHPLC-MS/MS kullanılarak incelemişlerdir. D₃ vitamininin iyot varlığında cis/trans izomerizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bir başka izomerolan, izotachysterolü, asidik koşullar altında oluşturmuşlardır. Diels-Alder reaksiyonu ile farklı tepki hızlarında D₃ vitamininin izomerleştirme ürünlerini oluşturmuşlardır. Bu çalışma sonucuda, UHPLC-MS / MS'deki D₃ vitamininin ve izomerlerinin iyonizasyon verimliliğini arttırdığını ve hassas algılamayı mümkün kılan ayırma ve parçalanmayı geliştirdiğini ortaya çıkarmışlardır.

Nalbani ve arkadaşları (Nalbani, Holubová, Šýs, Tahir, & Vytřas, 2018)asetonitril ve su-etanol karışımı içinde camsı karbon elektrotta (GCE) ve platin disk elektrotta CV ile D₃ ün (kolekalsiferol) tayini için çalışmışlardır. D₃ vitamini tayininde tayin limiti $8,0 \times 10^{-7}$ M, doğrusal aralık ise $2,4 \times 10^{-6} - 3,5 \times 10^{-4}$ M olarak bulunmuştur. Bu çalışma ile GCE'nin ilaç ve gıda takviyelerinde D₃ vitamini tayini için uygun elektrot olduğu düşünülmüştür.

4. MATERİYAL VE YÖNTEM

4.1. Kullanılan Cihazlar

Voltametri Cihazı

Elektrokimyasal çalışmalar için CHI firmasına ait polarografi modu ilave ettirilmiş CHI 1230B Electrochemical Workstation cihazı kullanıldı.

Terazi

Tartma işlemleri, ($\pm 0,0001$ g duyarlı) Ohaus marka (Amerika) terazi kullanılarak yapıldı.

4.2. Elektrokimyasal Hücre ve Kullanılan Elektrotlar

Deneyisel çalışmalarda; referans elektrot, çalışma elektrodu ve karşıt elektrotlu hücre sistemi kullanıldı. Çalışmalar sırasında kendimiz tarafından tasarlanan ve yaptırılan bir çalışma standı kullanıldı. Çalışma hücresi olarak cam hücre kullanıldı.

Referans Elektrot

Kare dalga voltametrisi ile yapılan deneyisel çalışmalarda referans elektrot olarak BAS marka Ag/Ag^+ (MF – 2062) elektrot kullanıldı. Referans elektrot, elektrokimyasal çalışmalarda cam hücre içerisinde bulunan analit çözeltisine temas edecek şekilde hücreye bağlandı.

Çalışma Elektrodu

Çalışma elektrodu olarak kendimiz tarafından özel olarak imal ettirilmiş olan kalem grafit elektrot kullanıldı. Çalışma elektrodu, cam hücre içerisinde bulunan analit çözeltisine temas edecek şekilde hücreye bağlandı.

Karşıt Elektrot

Deneysel çalışmalarda, karşıt elektrot olarak platin tel kullanıldı. Bu elektrot, cam hücre içerisinde bulunan analit çözeltisine temas edecek şekilde hücreye bağlandı.

4.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Tüm deneysel çalışmalar boyunca kullanılan kimyasal ve saf malzemeler, Merck ve Sigma Aldrich'den temin edildi ve analitik saflıkta olup hiçbirini için saflaştırma yoluna gidilmedi.

4.3.1. $1,0 \times 10^{-1}$ M Tetrabütilamonyum tetrafloroborat çözeltisi

3,29 g Tetrabütilamonyum tetrafloroborat (TBATFB) tartılarak 100,0 mL'lik ölçülü balona alındı. Önce az miktar etanolde çözöldü, daha sonra hacim etanol ile işaret çizgisine kadar tamamlandı.

4.3.2. $1,0 \times 10^{-2}$ M D₃ vitamini çözeltisi

0,0384 g D₃ vitamini tartılarak 10,0 mL ölçöülü balona alındı. Önce az miktar etanolde çözöldü, daha sonra hacim, etanol ile işaret çizgisine kadar tamamlandı.

4.3.3. $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini çözeltisi

$1,0 \times 10^{-2}$ M D₃ vitamini çözeltisinden 1,0 mL'lik kısım, 10,0 mL'lik ölçöülü balona alındı. Önce az miktar etanolde çözöldü, daha sonra hacim etanol ile işaret çizgisine kadar tamamlandı.

4.3.4. Askorbik asit ($1,0 \times 10^{-2}$ M) çözeltisi

0,0176 g Askorbik asit (C₆H₈O₆) tartılarak 10,0 mL ölçöülü balona alındı. Önce 5,0 mL saf su ve bir miktar NaOH ilavesi yapıldı. Daha sonra kalan kısım saf su ile işaret çizgisine kadar tamamlandı.

4.3.5. Ürik asit ($1,0 \times 10^{-4}$ M) çözeltisi

0,00168 g Ürik Asit ($C_5H_4N_4O_3$) tartılarak 10,0 mL ölçülü balona alındı. Önce 5,0 mL saf su eklendi, daha sonra kalan kısım saf su ile işaret çizgisine kadar tamamlandı.

4.3.6. $5,40 \times 10^{-4}$ M B₁, $3,87 \times 10^{-5}$ M B₂, $2,153 \times 10^{-4}$ M B₆ vitamini

Sağlık için kullanılan ampul şeklindeki vitamin temin edildi ve doğrudan kullanıldı.

4.3.7. 0,317 M E vitamini

Sağlık için kullanılan ampul şeklindeki vitamin temin edildi ve doğrudan kullanıldı.

4.3.8. $1,8 \times 10^{-5}$ M C vitamini

Sağlık için kullanılan ampul şeklindeki vitamin temin edildi ve doğrudan kullanıldı.

4.3.9. Gerçek numune

a) Ton Balığı çözeltisi

Marketten konserve ton balığı alındı, rondodan geçirildi ve üzerine sıcak su eklenerek oda sıcaklığında bir gün bekletildi. Yüzeye çıkan yağ pipetle çekilerek cam behere alındı ve deneyde kullanıldı.

b) D vitamini ilacı

Sağlık için kullanılan vitamin temin edildi ve doğrudan kullanıldı.

5. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

D₃ vitamininin tayini için tez kapsamında kullanılan çalışma planı aşağıdaki şekildedir;

- a) D₃ vitamininin kalitatif tayini,
- b) En uygun destek elektrolitin belirlenmesi,
- c) En uygun çalışma elektrodunun belirlenmesi,
- d) D₃ vitamininin tayininde gözlenebilme sınırının (LOD) ve tayin sınırının (LOQ) belirlenmesi,
- e) D₃ vitamininin kantitatif tayini,
- f) D₃ vitamininin tayininde bazı vitaminlerin girişim etkilerinin incelenmesi,
- g) Gerçek numunede vitamin D₃ analizi

5.1. D₃ vitamininin Kalitatif Tayini

D₃ vitamini yağda çözünen bir vitamin olduğu için çalışmalar susuz ortamda yapıldı. D₃ vitamininin kalitatif tayini amacıyla; önce 5,00 mL tetrabütülamonyum tetrafloroboratin çözeltisi destek elektrolit olarak voltamogramı alındı. Üzerine D₃ vitamini ilave edildi ve yeniden voltamogram alındığında +1,2 V civarında anodik bir pik gözlemlendi. Üzerine tekrar yapılan D₃ vitamini ilavesinde bu pikin büyüdüğü görüldü. Aynı ortamda anodik yönde alınan kare dalga voltamogramında da aynı pik gözlemlendi.

Bunun üzerine D₃ vitamininin bu anodik pik üzerinden tayinine karar verildi (Şekil 5.1-5.2).

Kare Dalga Voltametri çalışmalarında kullanılan parametreler;

Init E (V)= 0,2

Final E (V)= 1,3

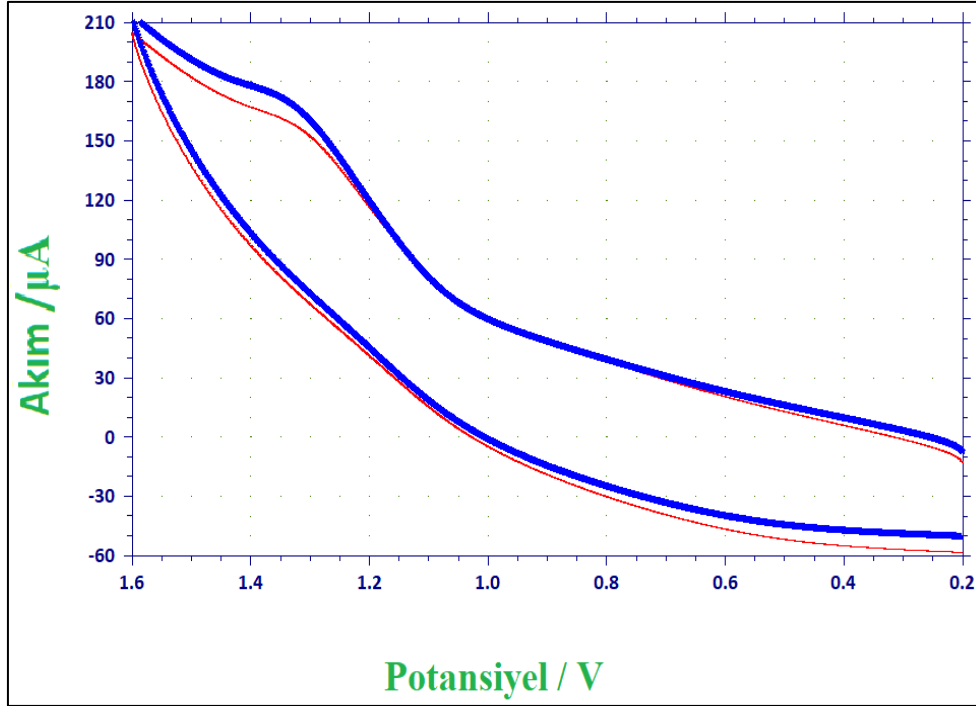
Incr E (V)=0,004

Amplitude (V)= 0,05

Frequency =25

Quit time (s)=2

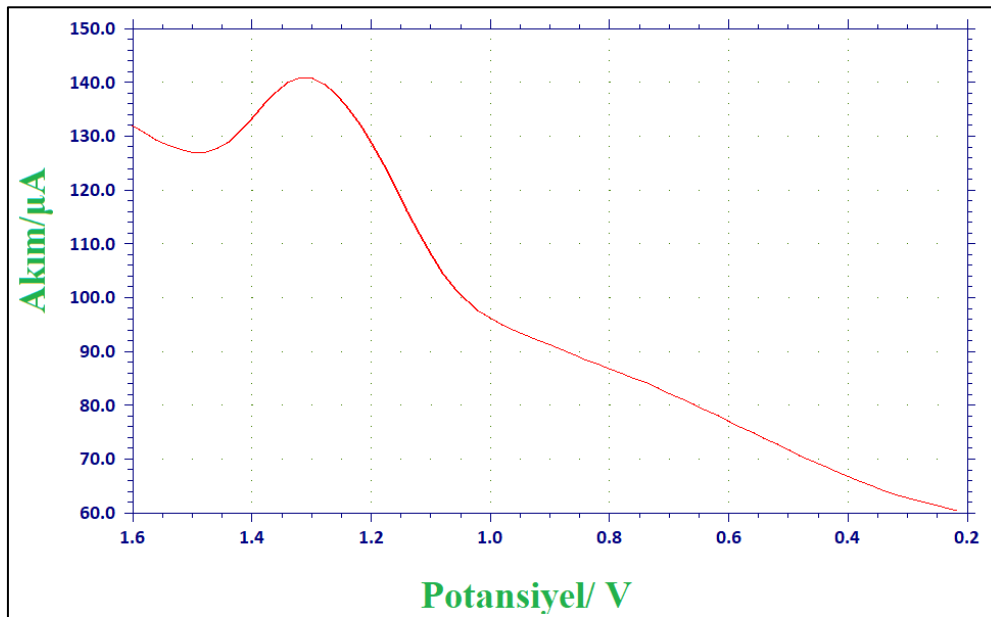
Sensitivity(A/V)= $1e^{-4}$



Şekil 5.1. D₃ vitamininin dönüşümlü voltametri ile alınan voltamogram

— 5,00 mL 0,10 M TBATFB çözeltisi + 2,0 mL 10⁻² M D₃ vitamini

— 5,00 mL 0,10 M TBATFB çözeltisi + 2,5 mL 10⁻² M D₃ vitamini

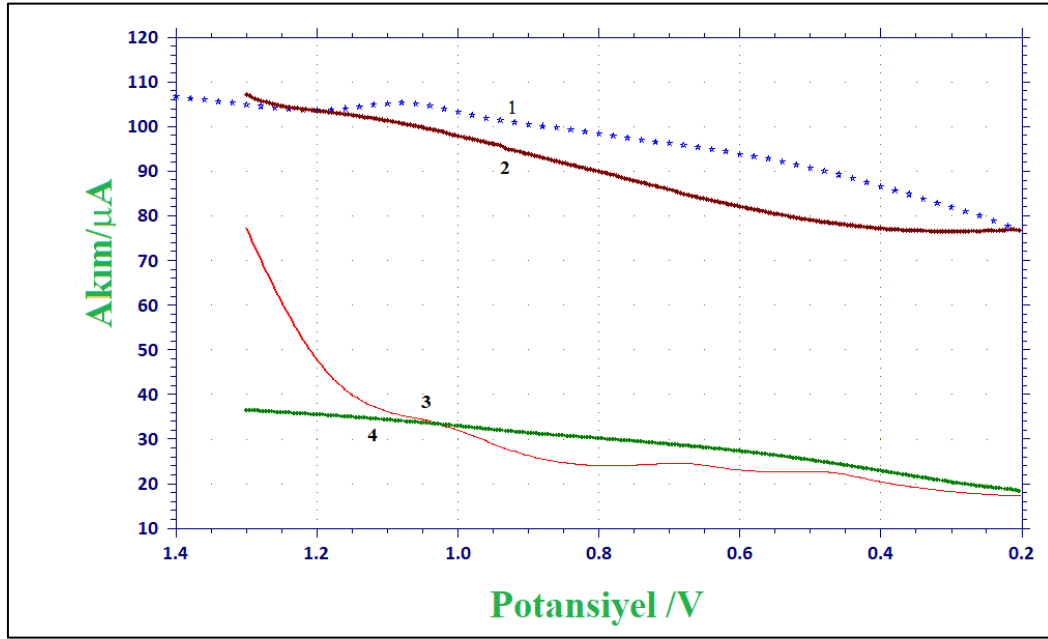


Şekil 5.2. D₃ vitamininin kare dalga voltametri ile anodik yönde alınan voltamogramı

— 5,00 mL 0,10 M TBATFB çözeltisi + 2,5 mL 10⁻² M D₃ vitamini

5.2. Destek Elektrolitin Belirlenmesi

D₃ vitamini tayini için en iyi destek elektrolitin bulunması amacıyla susuz ortama uygun DMSO, Etanol, Etanol-Su içerisine Lityumperklorat (LiClO₄), TETFB, TBATFB 'ın elektrolit olarak kullanıldığı çözeltiler kullanılarak D₃ vitamininin voltamogramları alındı (Şekil 5.3). Şekildeki voltamogramlardan da görüldüğü gibi en uygun destek elektrolitin TBATFB çözeltisi olduğu kararlaştırıldı.



Şekil 5.3. D₃ vitamininin tayininde destek elektrolitin belirlenmesi için anodik yönde kare dalga voltametri ile yapılan çalışmalar (5,00 mL 0,10 M TBATFB çözeltisi içerisinde $3,846 \times 10^{-5}$ M D₃ vitamini)

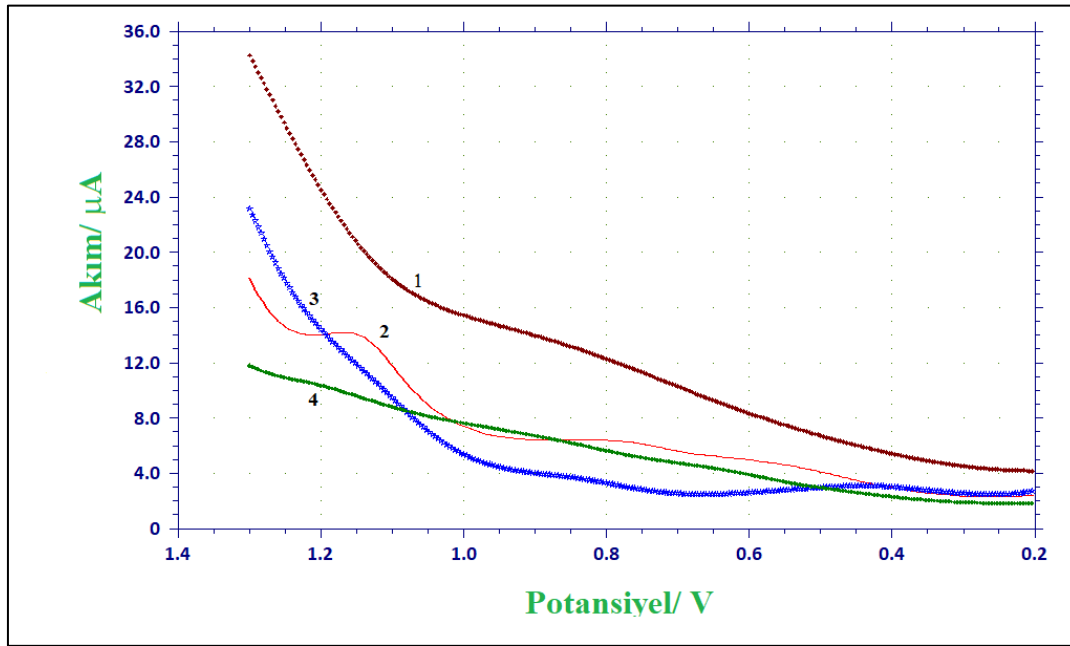
1. 5,00 mL 0,10 M TBATFB çözeltisi
2. 5,00 mL 0,10 M TBATFB + DMSO
3. 5,00 mL 0,10 M LiClO₄ + DMSO
4. 5,00 mL 0,10 M TETFB çözeltisi

5.3. Çalışma Elektrodunun Belirlenmesi

D₃ vitamini tayini için en iyi çalışma elektrodunun belirlenmesi amacıyla Nikel (Ni), Camısı Karbon (GCE), Altın (Au) ve Kalem grafit elektrot (KGE) kullanıldı. 5,00 mL 0,10 M TBATFB çözeltisi içerisinde $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamininin farklı elektrotlarla alınan anodik

kare dalga voltamogramlarından görüldüğü gibi en büyük ve en güzel pikin kalem grafit elektrot ile yapılan çalışmadan elde edildiği görülmektedir (Şekil 5.4). Bu nedenle en uygun çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrot seçilmiştir.

Satın alınan kalem grafit elektrotlar arasında ultra polimer kalem uçlarının en iyi sonuçları verdiği ve bunlar arasında da 2B 0,7 mm ucun D₃ vitamini tayini için en yüksek akımları verdiği gözlemlendi.

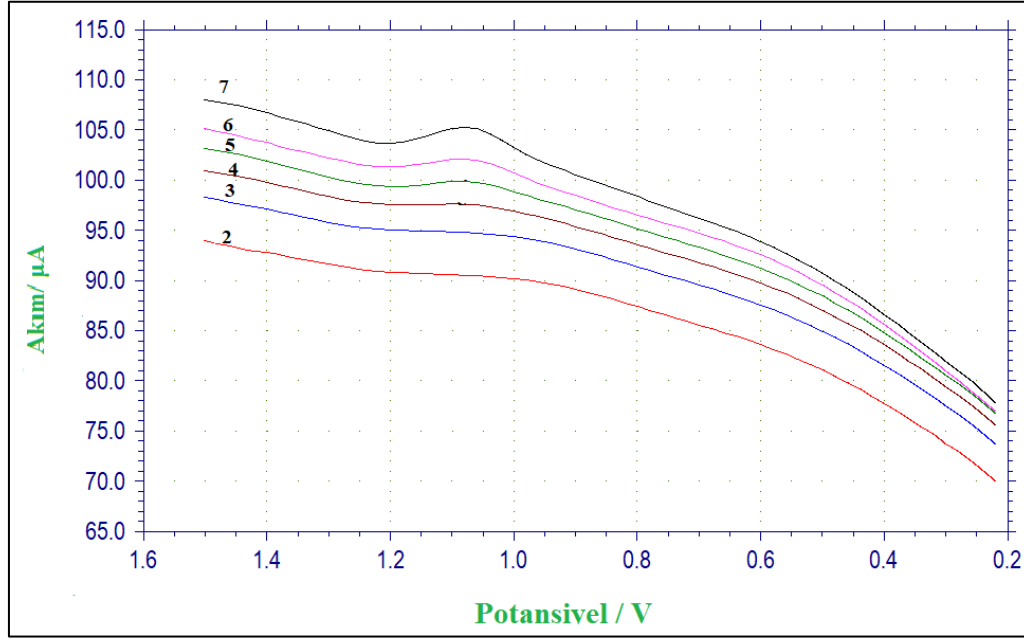


Şekil 5.4. D₃ vitamininin tayininde çalışma elektrodunun belirlenmesi için kare dalga voltametri ile anodik yönde yapılan çalışmalar (5,00 mL 0,10 M TBATFB çözeltisi $3,846 \times 10^{-5}$ M D₃ vitamini)

1. Ni Elektrot
2. KGE
3. GCE
4. Au Elektrot

D₃ vitamininin kalitatif tayini amacıyla elektrokimyasal hücre içerisine destek elektrolit alındı ve voltamogramı çekildi. Üzerine 0,01 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M'luk D₃ vitamini ilaveleri yapılarak kare dalga voltamogramları alındı ve +1,2 V civarında anodik pik görüldü. Daha sonra standart D₃ vitamini ilaveleri yapıldı. Her ilaveden sonra yeniden kare dalga voltamogramları alındı. Eklenen standart D₃ vitamini derişimine karşı okunan pik akımları

grafiğe geçirildiğinde elde edilen kalibrasyon grafiğinde, derişime karşı akımda doğrusal bir artış görüldü ($R^2=0,9963$). Bu sonuç bize D₃ vitamininin tayininin kare dalga voltametrisi ile yapılabileceğini gösterdi (Şekil 5.5- 5.6).

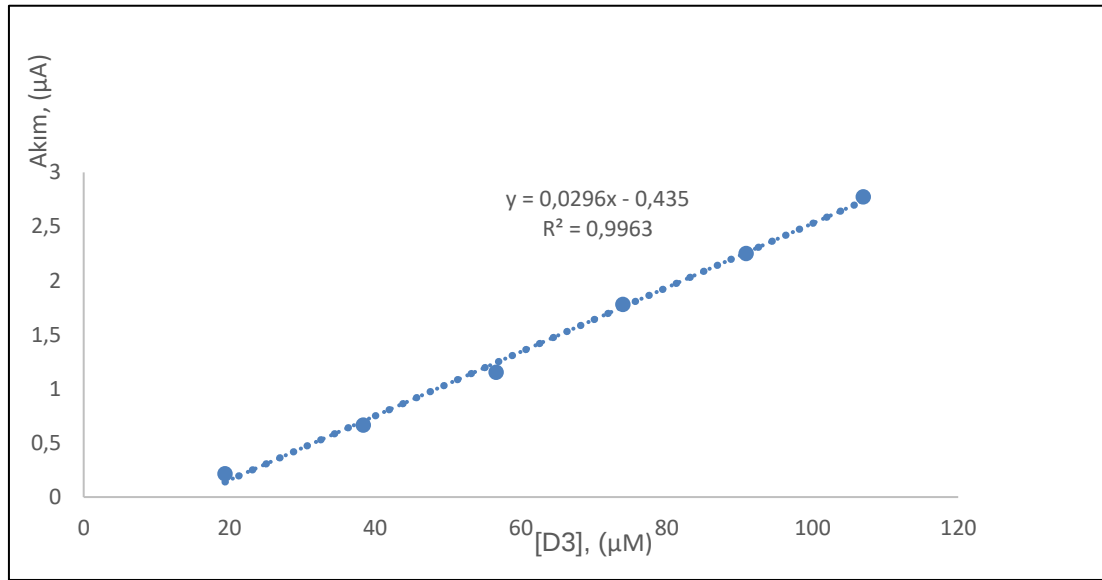


Şekil 5.5. 5,00 mL DE içerisinde $1,0 \times 10^{-3}$ M standart D₃ vitamini ilaveleri için, kare dalga voltametrisi ile elde edilen kalibrasyon grafiği çalışması

1. 5,00 mL DE
2. 1+0,1 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
3. 2+0,1 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
4. 3+0,1 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
5. 4+0,1 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
6. 5+0,1 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
7. 6+0,1 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini

Çizelge 5.1. 5,00 mL DE içerisinde $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini ilavelerine karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar

Eklenen [D3], (mL)	[D3], (mol/L)	μ M	Difüzyon Akımı (Amper)	Ma
0,10	$1,96 \times 10^{-5}$	19,6	$2,15 \times 10^{-7}$	0,21
0,20	$3,84 \times 10^{-5}$	38,4	$6,64 \times 10^{-7}$	0,66
0,30	$5,66 \times 10^{-5}$	56,6	$1,15 \times 10^{-7}$	1,15
0,40	$7,40 \times 10^{-5}$	74,0	$1,78 \times 10^{-7}$	1,78
0,50	$9,09 \times 10^{-5}$	90,9	$2,24 \times 10^{-7}$	2,24
0,60	$1,07 \times 10^{-4}$	107	$2,77 \times 10^{-7}$	2,77



Şekil 5.6. $1,0 \times 10^{-3}$ M standart D₃ vitamini için kare dalga voltametri ile yapılan çalışma sonucu

5.4. D₃ Vitamini Tayininde Gözlenebilme Sınırının (LOD), Tayin Sınırının (LOQ) ve Doğrusal Çalışma Aralığının (LOL) Belirlenmesi

5.4.1. Gözlenebilme sınırının (LOD) belirlenmesi

Gözlenebilme sınırının belirlenmesi amacı ile destek elektrolitin voltamogramı alındıktan sonra üzerine en küçük miktarda, neredeyse akımları okunamayacak kadar küçük $1,0 \times 10^{-2}$ M D₃ vitamini çözeltisi ilaveleri yapılarak difüzyon akımları okundu. Bu işlem 10 kez tekrarlandı ve okunan akımların standart sapmaları bulundu. Daha sonra kullanılan kalibrasyon grafiğinin eğimi belirlendi.

LOD= $3 \times s/m$ eşitliğinde değerler yerine konularak LOD bulundu. Bulunan LOD değeri $3,7 \times 10^{-8} M$ 'dır.

LOQ = $10 \times s/m$ eşitliğinde değerler yerine konularak LOQ bulundu. Bulunan LOQ değeri $1,1 \times 10^{-6} M$ 'dır.

Çizelge 5.1. LOD ve LOQ çalışması

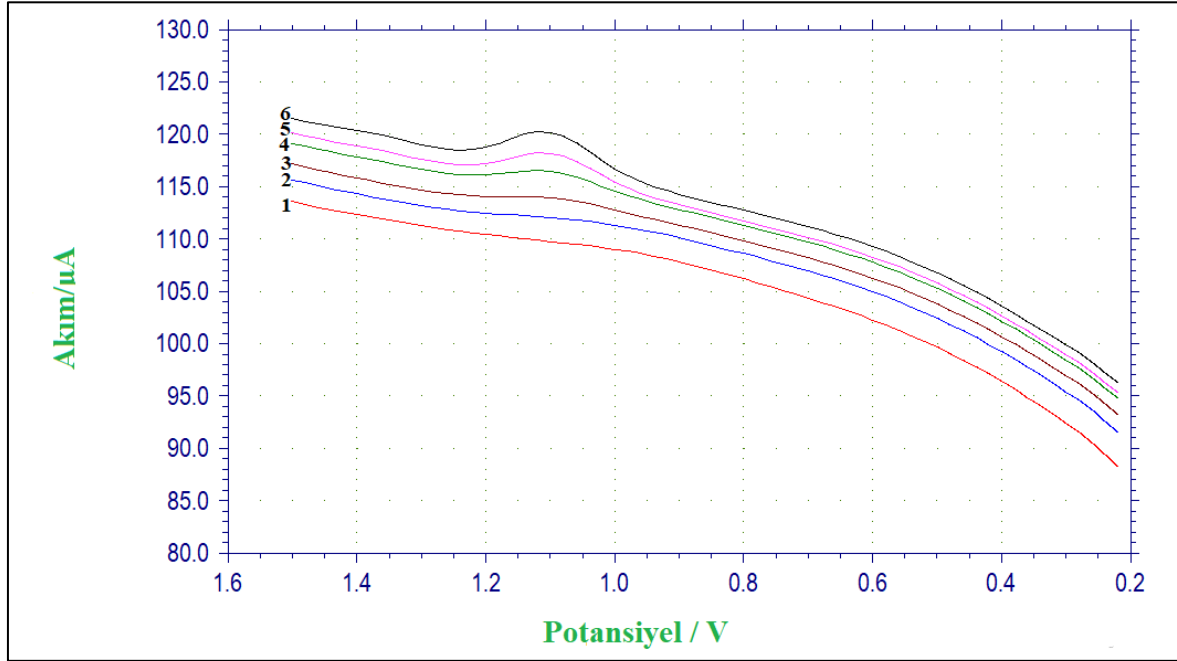
Akım	Bulgular
$8,41 \times 10^{-8}$ $7,40 \times 10^{-8}$ $8,22 \times 10^{-8}$ $7,68 \times 10^{-8}$ $7,90 \times 10^{-8}$ $8,18 \times 10^{-8}$ $8,20 \times 10^{-8}$ $7,28 \times 10^{-8}$ $8,69 \times 10^{-8}$ $8,03 \times 10^{-8}$	Standart Sapma (s) $4,40 \times 10^{-9}$
	Eğim (m) 0,0395
	LOD = $3,3 \times s/m$ $3,7 \times 10^{-8}$
	LOQ = $10 \times s/m$ $1,1154 \times 10^{-6}$

5.5. D₃ vitamininin Kantitatif Tayini

En uygun şartlar belirlendikten sonra D₃ vitaminin kare dalga voltametrisi ile kantitatif tayinine geçildi. Bunun için farklı derişimlerde iki tane standart D₃ vitamini çözeltileri ($1,0 \times 10^{-2} M$ ve $1,0 \times 10^{-3} M$) hazırlandı. Her standart için 3 er defa olmak üzere kare dalga voltamogramları alınarak kalibrasyon grafikleri çizildi

5.5.1. $1,0 \times 10^{-2} M$ D₃ vitamini standartları ile çizilen kalibrasyon grafiğı

Bu işlem için çalışma hücresi içerisine destek elektrolit olarak 5,00 mL DE çözeltisi alındı. Kare dalga voltamogramı alındıktan sonra üzerine 0,01 mL $1,0 \times 10^{-2} M$ D₃ vitamini ilaveleri yapıldı. Her ilaveden sonra voltamogramlar alındı. Bu işlem üç kere tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5.3'de görölmektedir.

Tekrar 1

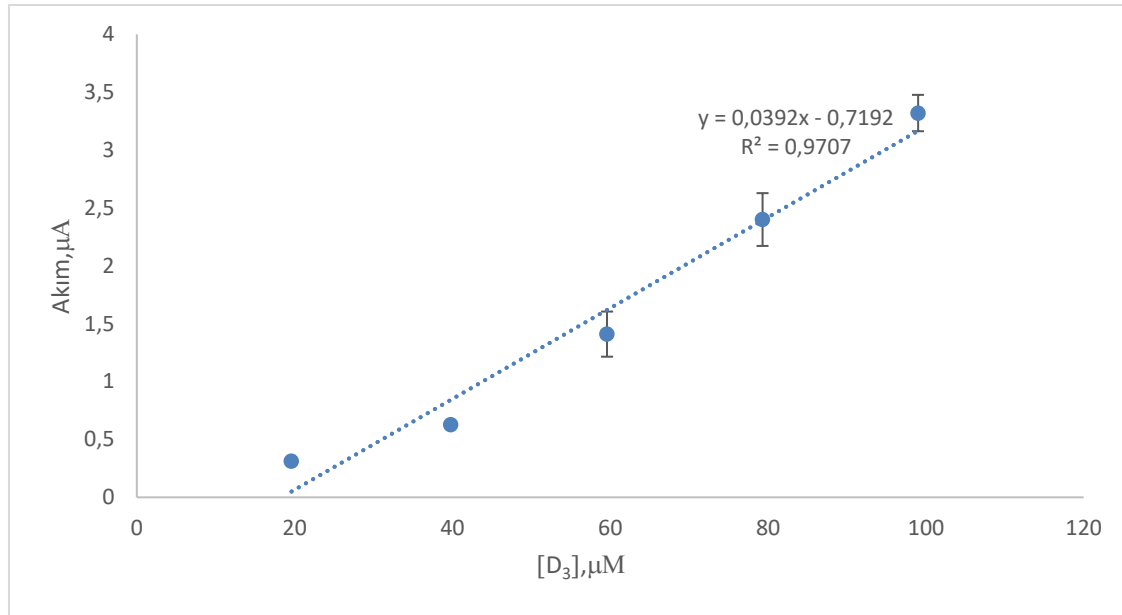
Şekil 5.7. $1,0 \times 10^{-2}$ M standart D_3 vitamini ilaveleri için kare dalga voltametrisi ile elde edilen kalibrasyon grafiği çalışması

1. 5,00 mL DE
2. 1+0,01 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M D_3 vitamini
3. 2+0,01 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M D_3 vitamini
4. 3+0,01 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M D_3 vitamini
5. 4+0,01 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M D_3 vitamini
6. 5+0,01 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M D_3 vitamini

Çizelge 5.3. 5,00 mL DE içerisine 1×10^{-2} M D₃ vitamini ilavelerine karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar

Eklenen [D ₃], (mL)	[D ₃], (mol/L)	Okunan Difüzyon Akımları (Amper)				
		1.Tekrar	2.Tekrar	3.Tekrar	Ortalama	Std. Sapma.
0,01	$1,96 \times 10^{-5}$	$3,15 \times 10^{-7}$	$3,09 \times 10^{-7}$	$3,12 \times 10^{-7}$	$3,12 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-9}$
0,02	$3,98 \times 10^{-5}$	$6,32 \times 10^{-7}$	$6,26 \times 10^{-7}$	$6,27 \times 10^{-7}$	$6,28 \times 10^{-7}$	$3,21 \times 10^{-9}$
0,03	$5,96 \times 10^{-5}$	$1,60 \times 10^{-6}$	$1,21 \times 10^{-6}$	$1,41 \times 10^{-6}$	$1,41 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-7}$
0,04	$7,93 \times 10^{-5}$	$2,66 \times 10^{-6}$	$2,23 \times 10^{-6}$	$2,31 \times 10^{-6}$	$2,40 \times 10^{-6}$	$2,28 \times 10^{-7}$
0,05	$9,90 \times 10^{-5}$	$3,50 \times 10^{-6}$	$3,21 \times 10^{-6}$	$3,25 \times 10^{-6}$	$3,32 \times 10^{-6}$	$1,57 \times 10^{-7}$

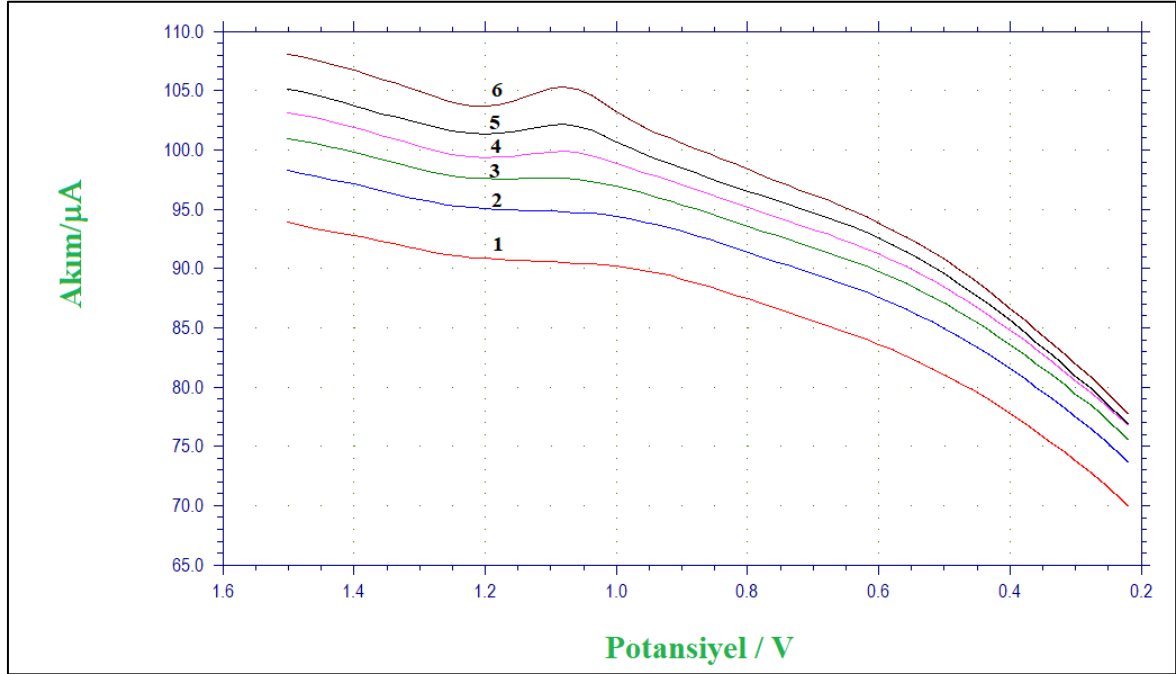
Yapılan 3 çalışmanın istatistiksel değerlendirilmesi çizelge 5.3’de özetlenmiştir. Çizelge sonuçlarına göre örnek 1 için çizilen kalibrasyon grafiği aşağıda görülmektedir. Grafikten de görüldüğü gibi R^2 bire oldukça yakındır.



Şekil 5.8. Çizelge 5.3’den elde edilen verilere göre çizilen kalibrasyon grafiği

5.5.2. $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini standartları ile çizilen kalibrasyon grafiği

Çalışma 1

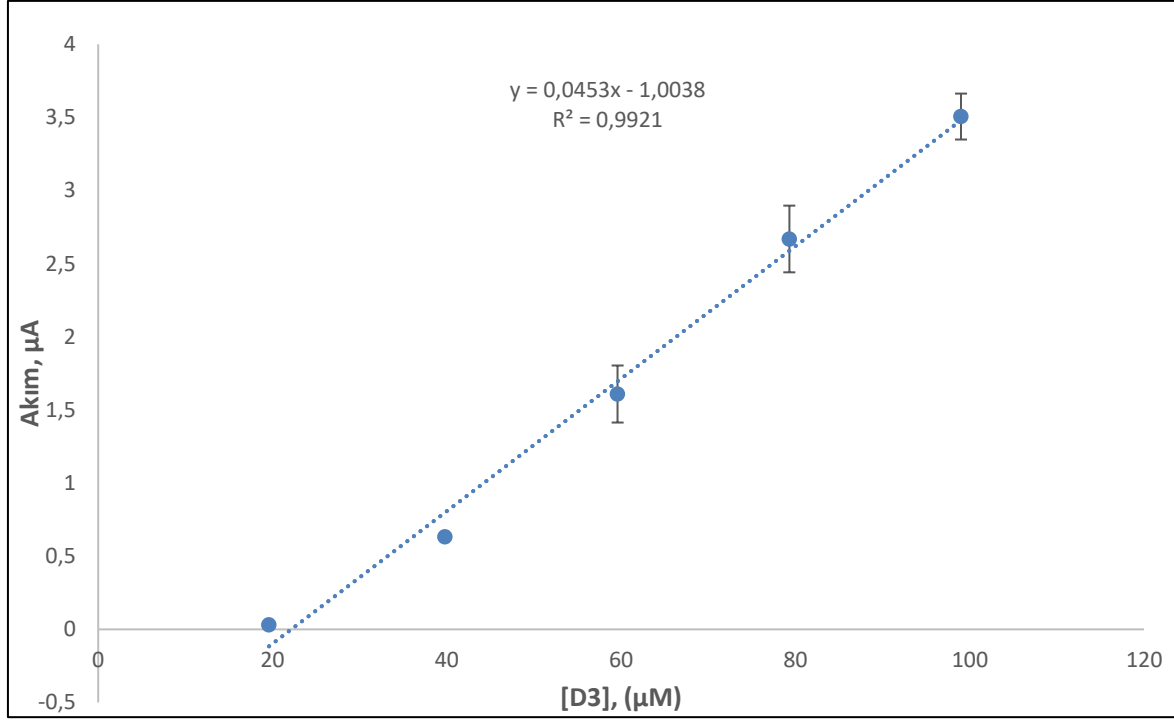


Şekil 5.9. $1,0 \times 10^{-3}$ M standart D₃ vitamini ilaveleri için kare dalga voltametri ile elde edilen kalibrasyon grafiği çalışması

1. 5,00 mL DE
2. 1+0,01 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
3. 2+0,01 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
4. 3+0,01 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
5. 4+0,01 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
6. 5+0,01 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini

Çizelge 5.4. 5,00 mL DE içerisine 1×10^{-3} M D₃ vitamini ilavelerine karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar

Eklenen [D ₃], (ml)	[D ₃], (mol/L)	Okunan Difüzyon Akımları (Amper)			
		1.Tekrar	2.Tekrar	Ortalama	Std. Sapma.
0,1	$1,96 \times 10^{-5}$	$2,49 \times 10^{-7}$	$2,25 \times 10^{-7}$	$2,37 \times 10^{-7}$	$1,69 \times 10^{-8}$
0,2	$3,84 \times 10^{-5}$	$4,52 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-7}$	$4,45 \times 10^{-7}$	$9,89 \times 10^{-9}$
0,3	$5,66 \times 10^{-5}$	$7,11 \times 10^{-7}$	$6,35 \times 10^{-7}$	$6,73 \times 10^{-7}$	$5,37 \times 10^{-8}$
0,4	$7,40 \times 10^{-5}$	$1,15 \times 10^{-6}$	$9,34 \times 10^{-7}$	$1,04 \times 10^{-6}$	$1,52 \times 10^{-7}$
0,5	$9,09 \times 10^{-5}$	$1,75 \times 10^{-6}$	$1,57 \times 10^{-6}$	$1,36 \times 10^{-6}$	$1,27 \times 10^{-7}$



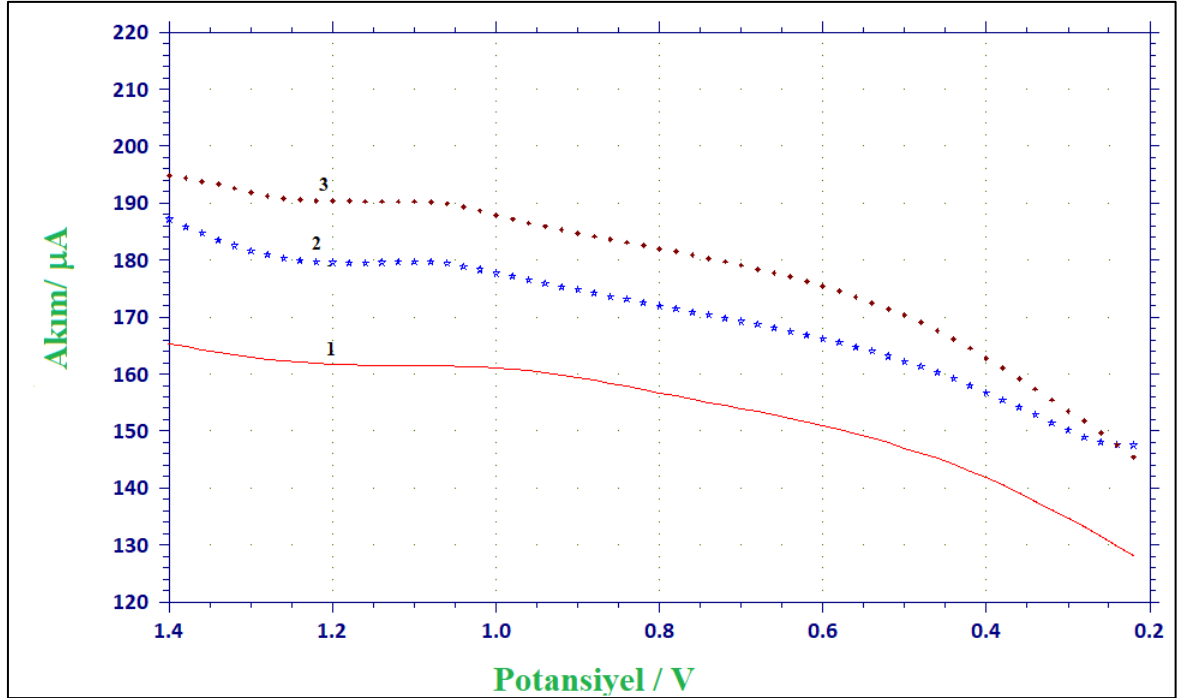
Şekil 5.10. Çizelge 5.4’den elde edilen verilere göre çizilen kalibrasyon grafiği

5.6. Girişim Çalışması

Tez çalışmasının bu kısmında D₃ vitamininin tayinine, D₃ vitamini ile aynı ortamda bulunabilecek bazı vitaminlerin girişim yapıp yapmadıkları araştırıldı. Bu amaçla E vitamini, C vitamini, B vitamini, ürik asit ve askorbik asidin D₃ vitamini tayinine girişim etkileri araştırıldı.

5.6.1. D₃ vitamini tayinine askorbik asidin girişim etkisi

Laboratuvarında hazırladığımız $1,0 \times 10^{-2}$ M askorbik asidin D vitamini tayini üzerine girişim etkisi incelendi. Hücre içerisinde bulunan $7,29 \times 10^{-5}$ M D₃ vitamini üzerine $1,45 \times 10^{-4}$ M askorbik asit ilavesi yapıldı. Ve girişim etkisi gözlenmedi.

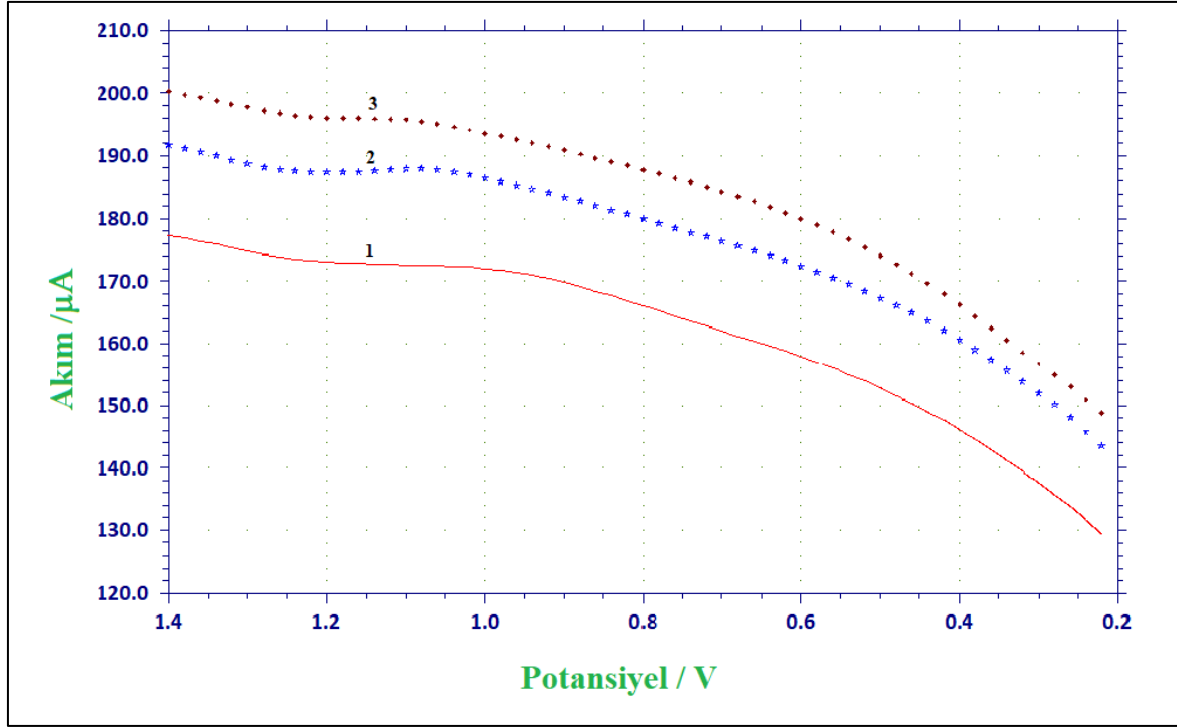


Şekil 5.11. $1,0 \times 10^{-2}$ M askorbik asit ile yapılan girişim çalışmasının kare dalga voltametrisine ait voltamogramları

1. 5,00 mL DE
2. 1+0,4 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
3. 2+0,08 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M askorbik asit

5.6.2. D₃ vitamini tayinine ürik asitin girişim etkisi

Laboratuvarıda hazırladığımız 1×10^{-4} M ürik asitin, D vitamini tayini üzerine girişim etkisi incelendi. Hücre içerisinde bulunan $7,29 \times 10^{-5}$ M D₃ vitamini üzerine $1,45 \times 10^{-6}$ M ürik asit ilavesi yapıldı. Ve girişim etkisi gözlenmedi.

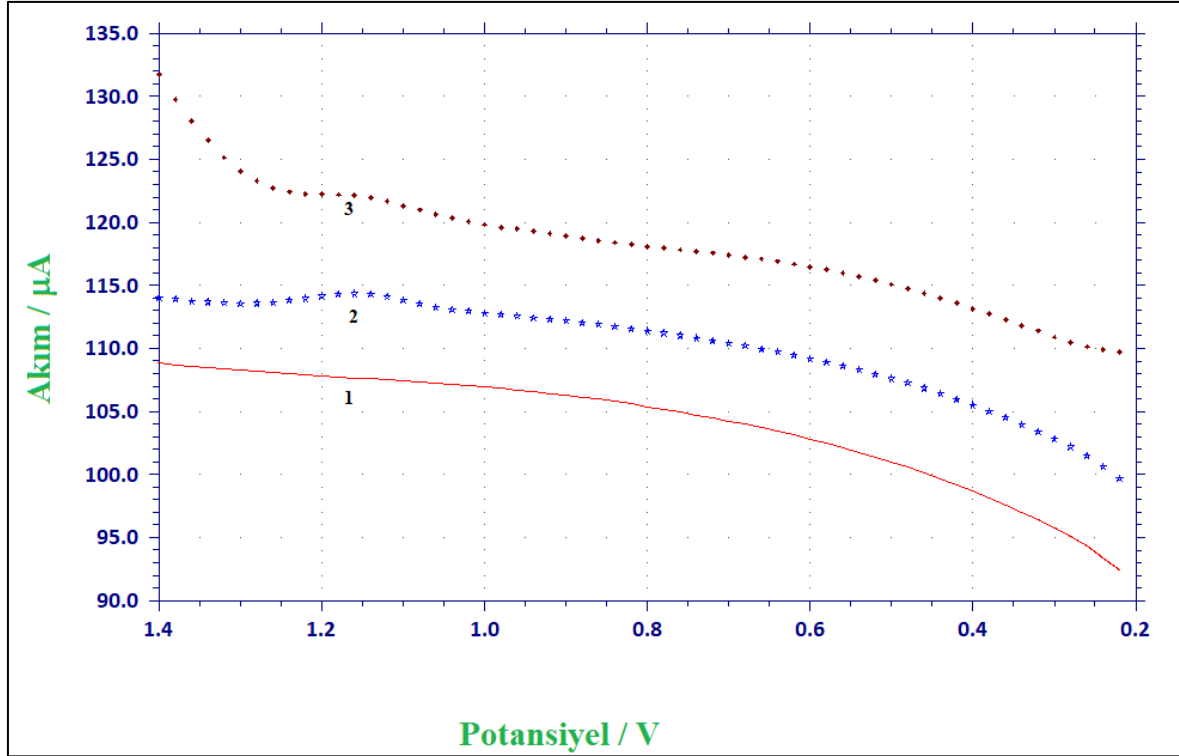


Şekil 5.12. $1,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit ile yapılan girişim çalışmasının kare dalga voltametrisine ait voltamogramları

1. 5,00 mL DE
2. 1+0,4 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
3. 2+0,08mL $1,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit

5.6.3. D₃ vitamini tayinine B₁, B₂, B₆ vitaminlerinin girişim etkileri

Eczaneden, içerisinde 25 mg B₁, 2 mg B₂, 5 mg B₆ vitamini bulunan, vitamin kompleksi alındı. D vitamini tayinine girişim etkisi incelendi. Hücre içerisinde bulunan $7,29 \times 10^{-5}$ M D₃ vitamini üzerine yapılan (hücre içerisinde) $5,40 \times 10^{-4}$ M B₁, $3,87 \times 10^{-5}$ M B₂, B₆ $2,153 \times 10^{-4}$ M ilaveler yapıldı. B vitamini kompleksinin (BK) D₃ vitamini pikinden farklı yerde çıktığı, için D₃ vitamini pikine girişim yapmayacağı görüldü (Şekil 5.13).

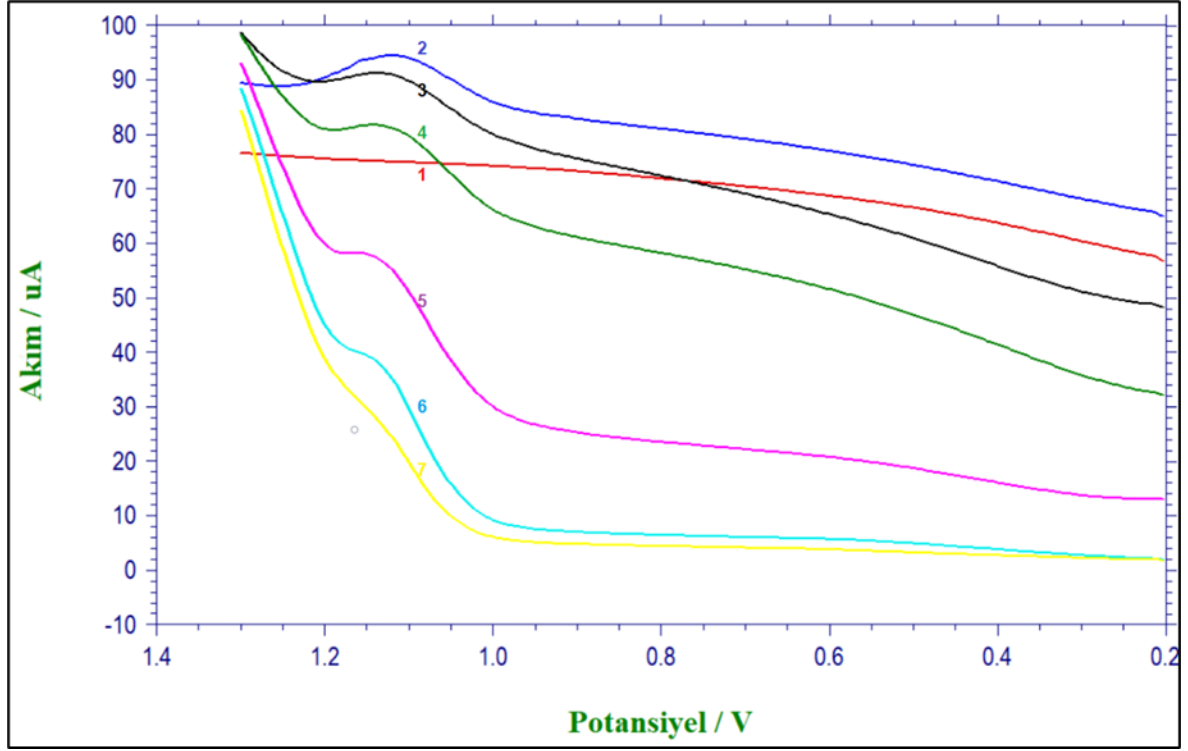


Şekil 5.13. $5,40 \times 10^{-4}$ M B₁, $3,87 \times 10^{-5}$ M B₂, $2,153 \times 10^{-4}$ M B₆ vitamini ile yapılan girişim çalışmasının kare dalga voltametrisine ait voltamogramları

1. 5,00 mL DE
2. 1+0,4 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
3. 2+0,08 mL $5,40 \times 10^{-4}$ M B₁, $3,87 \times 10^{-5}$ M B₂, $2,153 \times 10^{-4}$ M B₆ vitamini

5.6.4. D₃ vitamini tayinine E vitamininin girişim etkisi

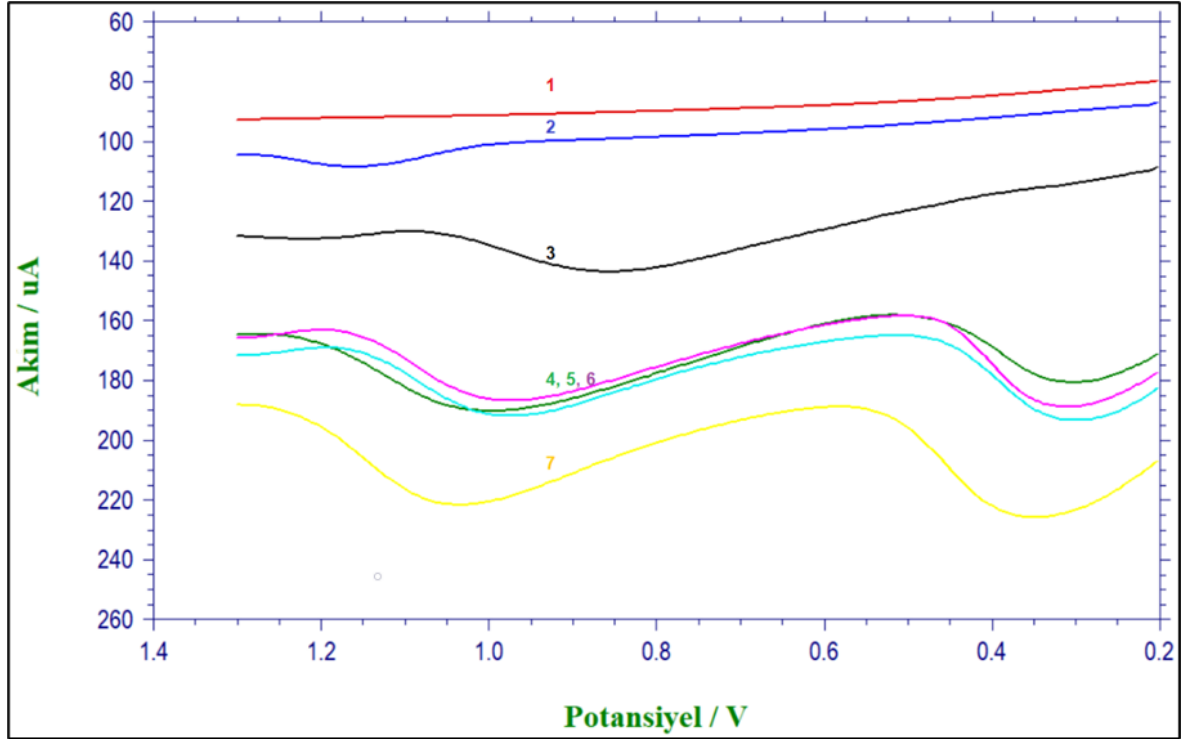
D₃ vitamini tayinine E vitamininin girişim etkisini incelemek için eczaneden 2,0 mL sinde 300 mg E vitamini (DL-Alfa Tokoferol) bulunan ampul şeklinde vitamini alındı. Çalışma hücresi içerisine destek elektrolit alındıktan sonra kare dalga voltamogramı alındı. Üzerine hücre içerisinde $7,29 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde D₃ vitamini ilave edildi ve yeniden kare dalga voltamogramı alındı. Üzerine yapılan ilaveler ile D₃ vitamini pikinin küçülerek kaybolduğu görüldü (Şekil 5. 14)



Şekil 5.14. 0,317 M E vitamini ile yapılan girişim çalışmasının kare dalga voltametrisine ait voltamogramları

1. 5,00 mL DE
2. 1+0,4 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M D₃ vitamini
3. 2+0,02 mL 0,317 M E vitamini
4. 3+0,02 mL 0,317 M E vitamini
5. 4+0,02 mL 0,317 M E vitamini
6. 5+0,02 mL 0,317 M E vitamini
7. 6+0,02 mL 0,317 M E vitamini

5.6.5. D₃ vitamini tayinine C vitamininin girişim etkisi



Şekil 5.15. $8, 17 \times 10^{-5}$ M C vitamini ile yapılan girişim çalışmasının kare dalga voltametrisine ait voltamogramları

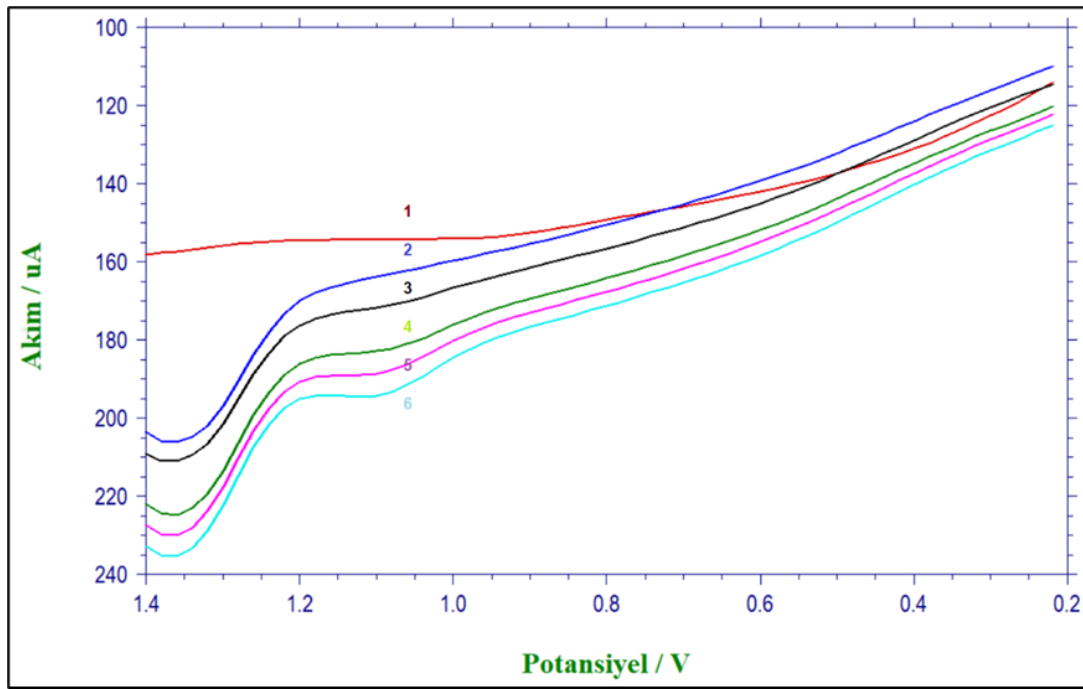
1. 5,00 mL DE
2. 1+0,6 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M D₃ vitamini
3. 2+0,02 mL 1×10^{-5} M C vitamini
4. 3+0,02 mL 1×10^{-5} M C vitamini
5. 4+0,02 mL 1×10^{-5} M C vitamini
6. 5+0,02 mL 1×10^{-5} M C vitamini
7. 6+0,02 mL 1×10^{-5} M C vitamini

5.7. Sentetik Numune Analizi

D₃ vitaminin kantitatif tayinine diğer bazı organik bileşiklerin girişim etkisini incelemek için çalışma hücresi içerisine önce 5,00 mL destek elektrolit alındı ve anodik yönde kare dalga voltamogramı çekildi. Destek elektrolitin temiz olduğu görüldükten sonra üzerine D₃ vitaminine girişim yapan ve girişim yapmayan vitaminlerden oluşan sentetik bir karışım ilave edilerek (0,02 mL BK vitamini + 0,02 mL (10^{-4} M) ürik asit + 0,02 mL (10^{-2} M) askorbik

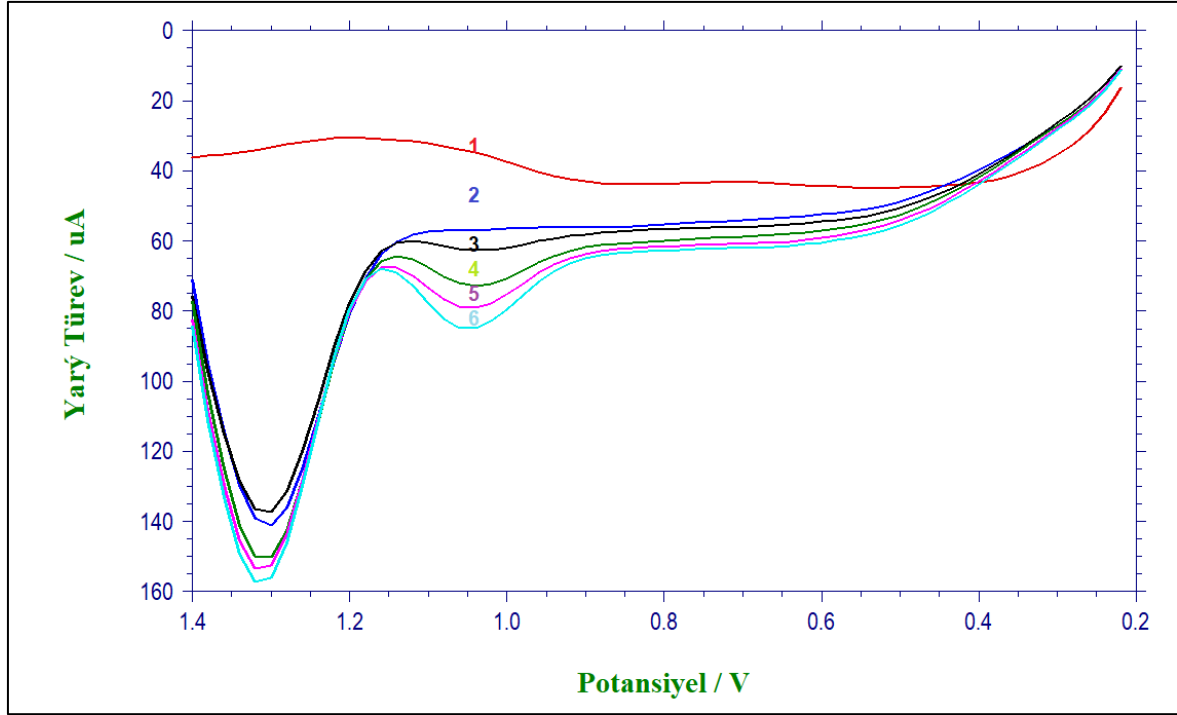
asit + 0,02 mL 0,317 M E vitamini + 0,02 mL $8,1 \times 10^{-5}$ M C vitamini) yeniden voltamogram alındı. +1,2 V civarında herhangi bir pik gözlenmedi. Üzerine hazırlanan 0,4 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini (Bilinmeyen) olarak ilave edilerek yeniden voltamogram alındı. +1,2 V' da çok küçük de olsa bir pik gözlendi, devamında bu karışım üzerine üç kez standart 0,2 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini ilave edildi. Her ilaveden sonra alınan voltamogramlarda pikde büyüme görüldü (Şekil 5.16)

1,2 V' daki pikin oldukça küçük olması nedeniyle cihaz yazılımı içerisinde bulunan yarı türev alma işlemi kullanılarak voltamogramların yarı türevleri alındığında şekil 5.16'daki piklerin oldukça büyük bir hale geldiği Şekil 5.17'de görülmektedir.



Şekil 5.16. Sentetik örnekteki 65,5 µM D₃ vitamininin anodik kare dalga voltametrisi kullanılarak standart ekleme metodu ile tayini

1. 5,00 mL DE
2. 1+0,02 mL BK vit+ 0,02 mL C vit + 0,02 mL E vit +0,02 mL (10^{-4} M) Ürik asit+ 0,02 mL (10^{-2} M) Askorbik asit
3. 2+0,400 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini (Bilinmeyen)
4. 3+0,200 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
5. 4+0,200 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
6. 5+0,200 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini

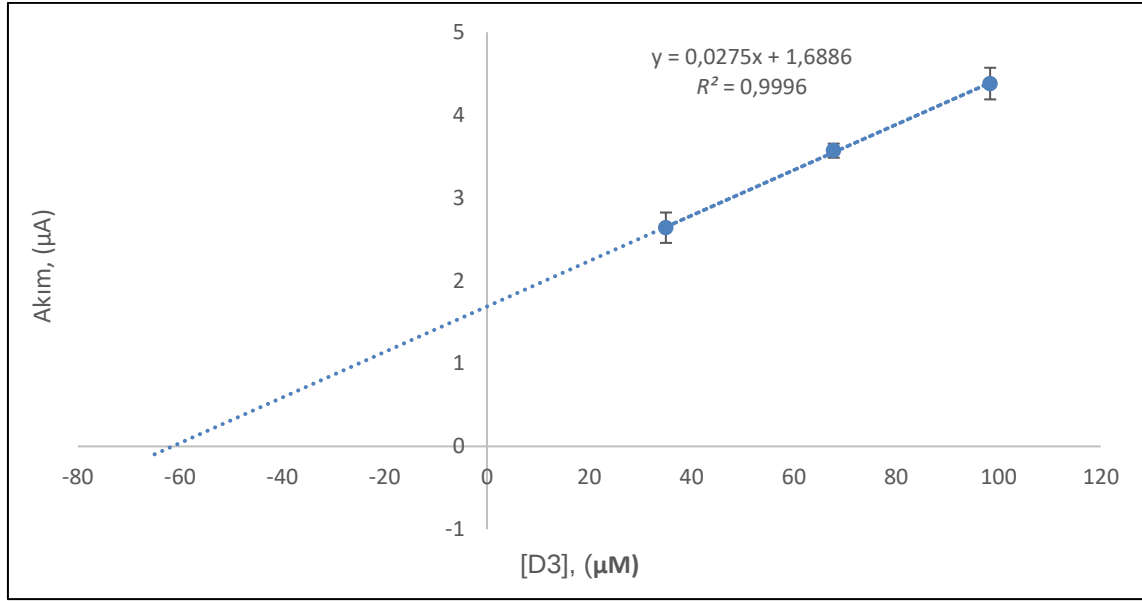


Şekil 5.17. Şekil 5.16 deki voltamogramların yarı türevlerinin alınmış hali

Çalışma üç kez tekrarlandı. Çalışmada kullanılan standart D₃ vitamini ilavelerine karşı difüzyon akımları okunarak çizelgeye geçirildi (Çizelge 5.5). Bu çizelgedeki verilerden faydalanılarak standart ekleme metodu grafiği çizildi (Şekil 5.16). Bilinmeyen olarak ortama ilave ettiğimiz 65,5 μ M lık D₃ vitamini % -6, 2 bağıl hata ile 61,4 μ M olarak bulundu.

Çizelge 5.5. Şekil 5.16'deki voltamogramlardan derişimlere karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar

Eklenen D ₃ Vitamini hacmi, (mL)	Hücre içi [D ₃ Vitamini], (μ M)	Çalışma no ve okunan difüzyon akımları (μ A)				
		1	2	3	Ortalama akım (μ A)	Std. Sapma
0,4 (Bilinmeyen)	65,5 (Bilinmeyen)	1,71	1,49	1,40	1,6	0,15
0,2	35,0	2,48	2,84	2,60	2,64	0,18
0,4	67, 7	3,48	3,64	3,61	3,74	0,085
0,6	98, 5	4,20	4,58	4,36	4,38	0,19



Şekil 5.18. Çizelge 5.5' e göre çizilen standart ekleme grafiği

Bu çalışmaya göre grafiğin denkleminde y 'ye 0 verirse ve x 'i çekersek D₃ vitamininin sentetik örnekteki derişimi;

$0 = 0,0275x + 1,6886$ $x = 61,4 \mu\text{M}$ bulunur.

% Bağıl hatayı hesaplırsak $Er = \frac{61,4 - 65,5}{65,5} \times 100 = \% -6,2$ olarak bulunur. Bu değerin analitik çalışma için makul bir değer olarak kabul edilebilir olduğu düşünüldü.

5.8. Gerçek Numune Analizi

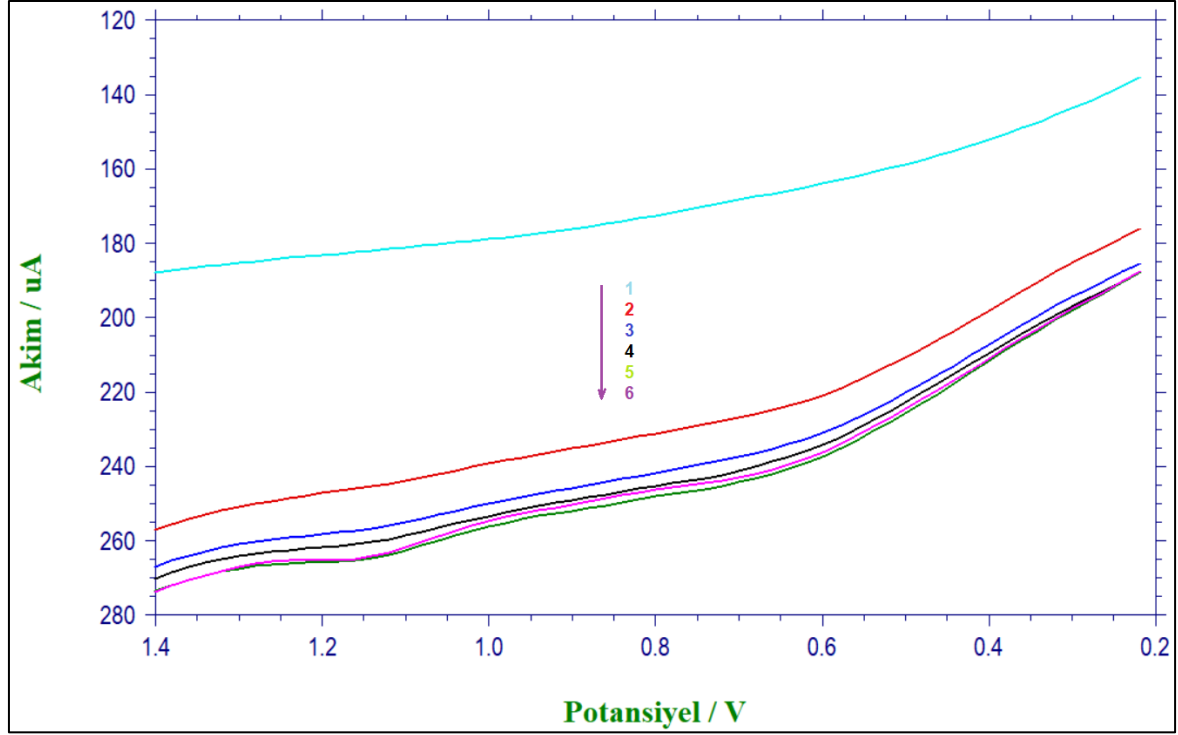
5.8.1. Ton balığı

Gerçek numune olarak konserve ton balığı alındı, konserve balık rondodan geçirilerek öğütüldü, üzerine sıcak su eklenerek ton balığı yağının üstte toplanması sağlandı. Yüzeye çıkan yağ ($v=5,0 \text{ mL}$) pipetle çekilerek cam behere alındı ve deneyde kullanıldı.

Çalışma hücresi içerisine $5,00 \text{ mL}$ destek elektrolit alındı anodik yönde kare dalga voltamogramı çekildi. Üzerine $1,5 \text{ mL}$ ton balığı yağı ilave edildi ve yeniden voltamogram alındı. Üzerine $0,400 \text{ mL}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ standart D₃ vitamini bilinmeyen olarak ilave edildi yeniden voltamogram alındı. Sonrasında ise üzerine üç kez $0,200 \text{ mL}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ standart

D₃ vitamini ilave edilerek ton balığı numune çözeltisindeki D₃ vitamini standart ekleme yöntemi ile tayin edildi.

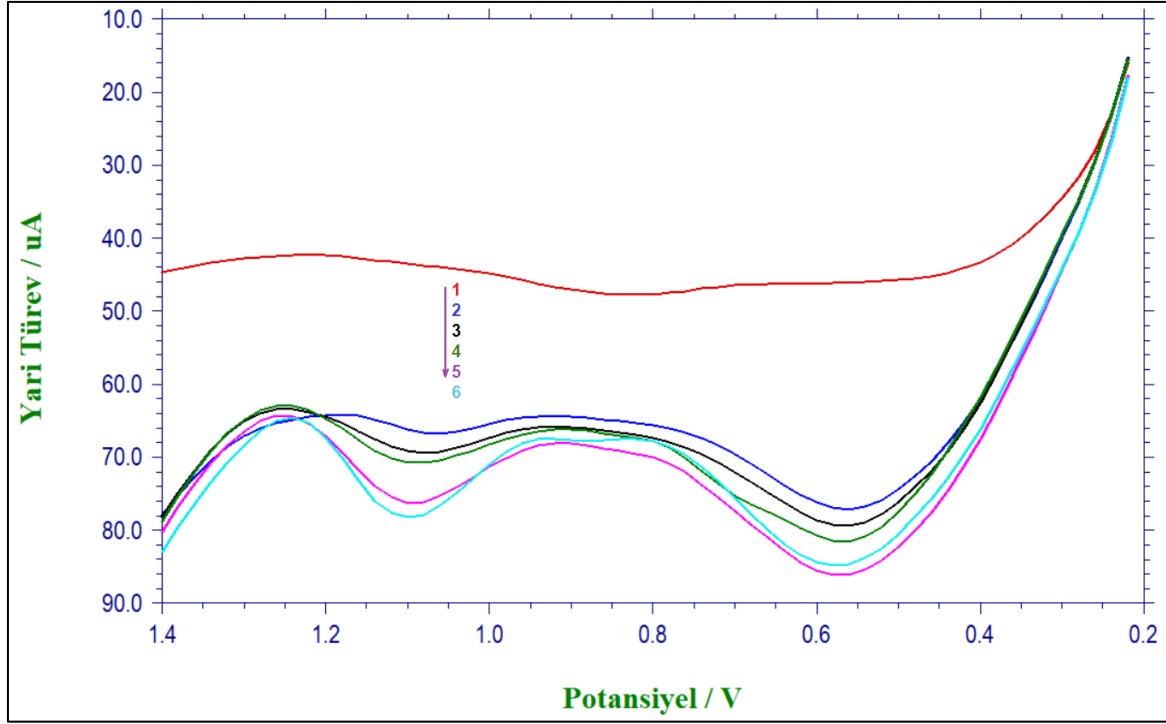
Sonuçlar şekil 5.19-5.20-5.21 ve Çizelge 5.6 da görülmektedir.



Şekil 5.19. Ton balığı örneğindeki D₃ vitamininin anodik kare dalga voltametrisi kullanılarak standart ekleme metodu ile tayini

1. 5,00 mL DE
2. 1+1,5 mL Ton balığı numune çözeltisi
3. 2+0,4 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ (Bilinmeyen)
4. 3+0,2 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
5. 4+0,2 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini
6. 5+0,2 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M D₃ vitamini

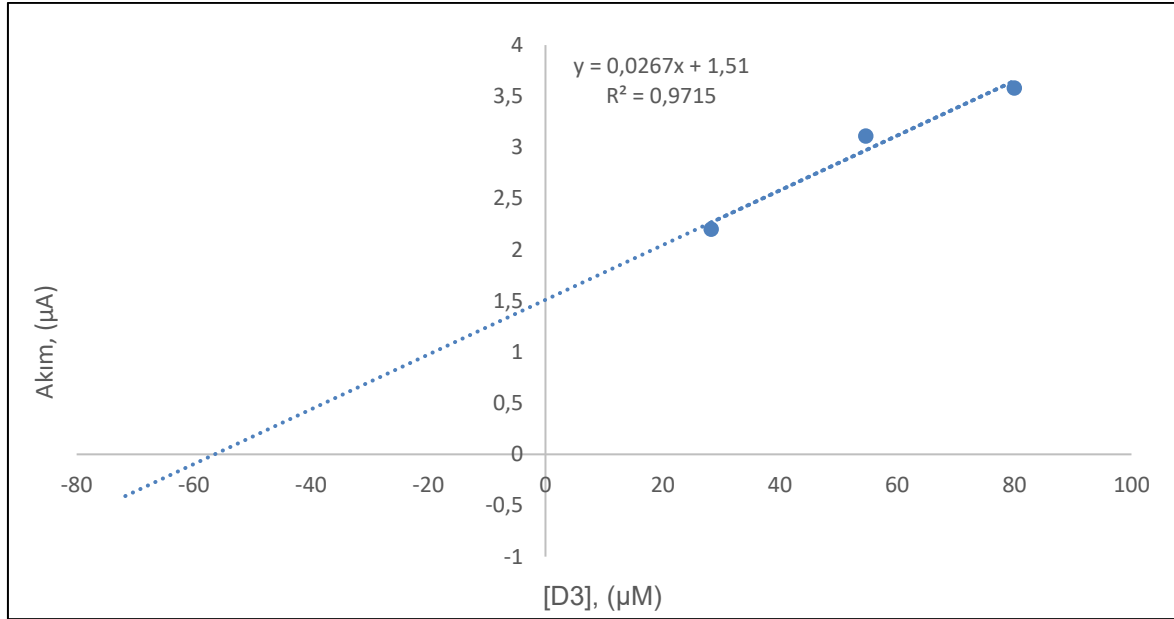
Şekil 5.19'e bakıldığında piklerin oldukça küçük oldukları görülmektedir. Bu nedenle cihaz yazılımında bulunan yarı türev alma işlevi kullanılarak voltamogramların yarı türevleri alındığında piklerin çok daha belirgin bir hale geldiği görülmektedir.



Şekil 5.20. Şekil 5.19'deki voltamogramların yarı türevlerinin alınmış hali

Çizelge 5.6. 5,00 mL DE ve ton balığı yağı içerisinde 1×10^{-3} M D_3 vitamini ilavelerine karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar

Eklenen D_3 hacmi, (mL)	Hücre içi $[D_3]$, (μM)	Akım (μA)
0,4 (Bilinmeyen)	53,3 (Bilinmeyen)	1,47
0,2	28, 1	2,20
0,4	54,7	3,11
0,6	80	5,82



Şekil 5.21. Çizelge 5.6'a göre çizilen standart ekleme grafiği

Bu çalışmaya göre grafiğin denkleminde y 'ye 0 verirse ve x 'i çekersek D_3 vitamininin sentetik örnekteki derişimi;

$$0 = 0,0267x + 1,51$$

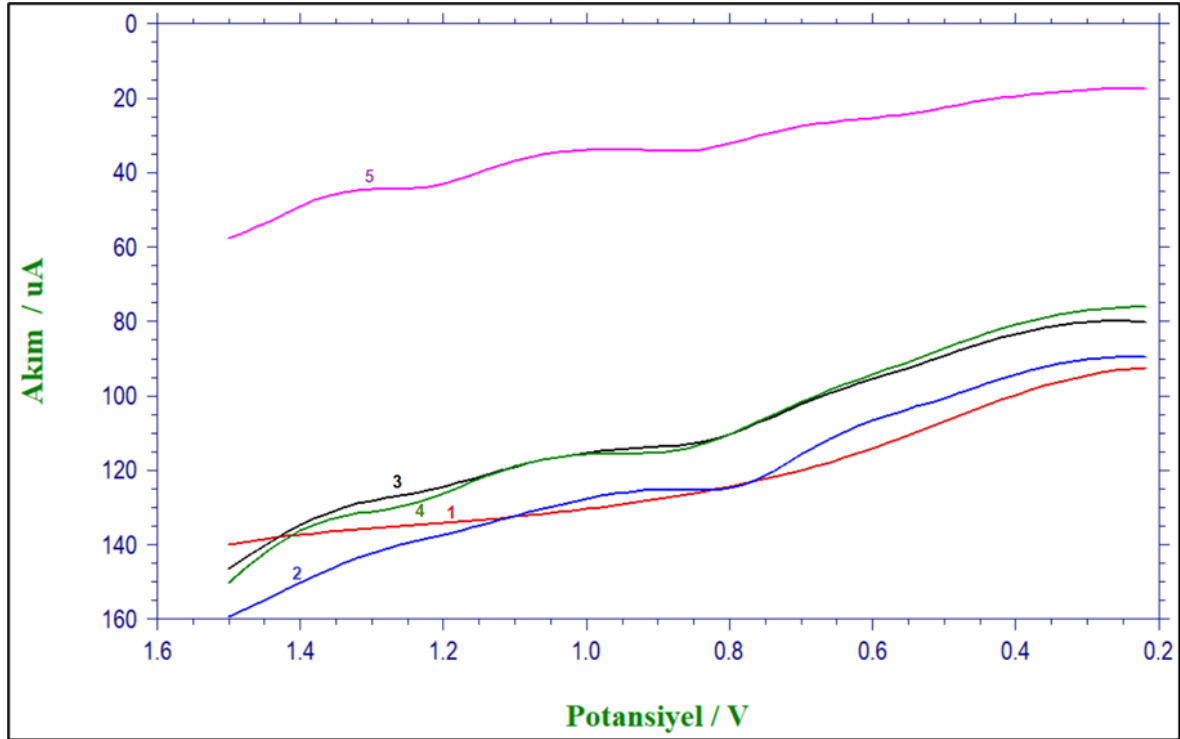
$x = 56,5 \mu M$ bulunur.

Bilinmeyen derişimi $53,3 \mu M$, aradaki fark ton balığına aittir.

İlgili hesaplamalar yapılarak 100 mg da 8, 13 μg D_3 vitamini olduğu tespit edildi.

5.8.2. D vitamini numunesi

Sağlık için kullanılan d vitamini numunesi gerçek numune olarak kullanıldı. Çalışma hücresi içerisine 5,00 mL destek elektrolit alındı anodik yönde kare dalga voltamogramı çekildi. Daha sonra sıvı formda olan ve D vitamini içeriği bilinen örnekten çalışma hücresi içerisine 0,5 mL D vitamini numunesi bilinmeyen olarak eklendi ve yeniden voltamogram alındı. Sonrasında ise üzerine üç kez 0,05 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M standart D_3 vitamini ilave edilerek D vitamini numunesindeki D_3 vitamini standart ekleme yöntemi ile tayin edildi.

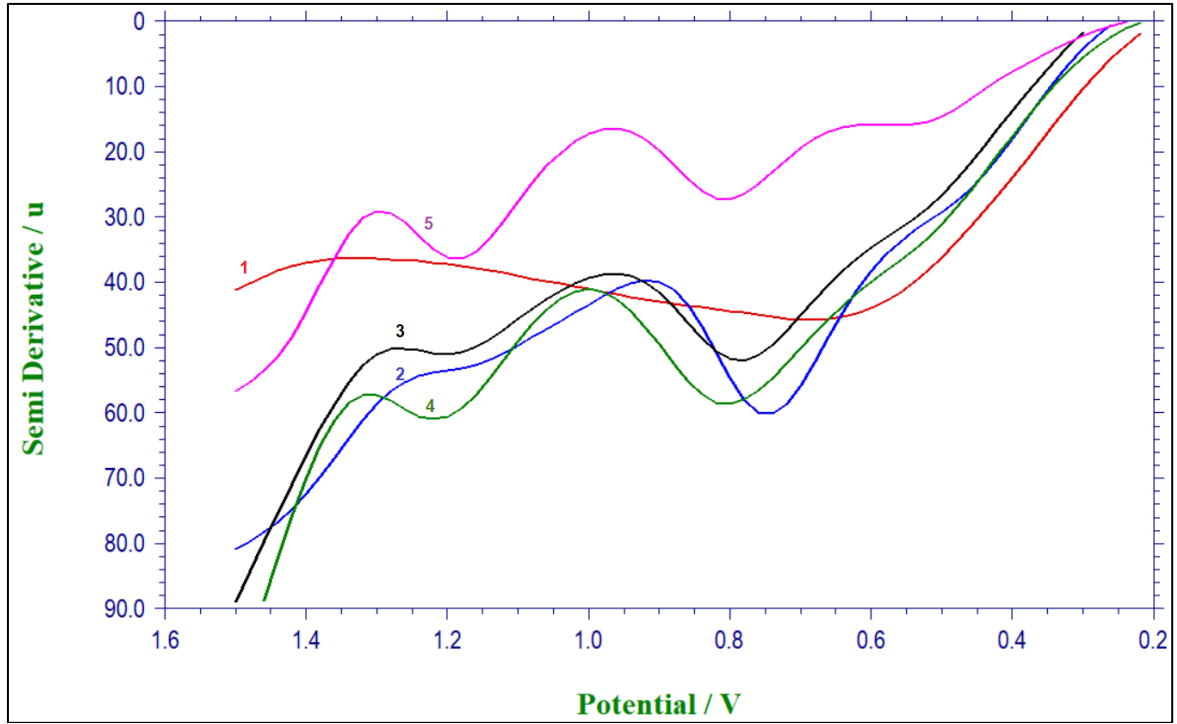


Şekil 5.22. D vitamini numunesindeki D₃ vitamininin anodik kare dalga voltametrisi kullanılarak standart ekleme metodu ile tayini

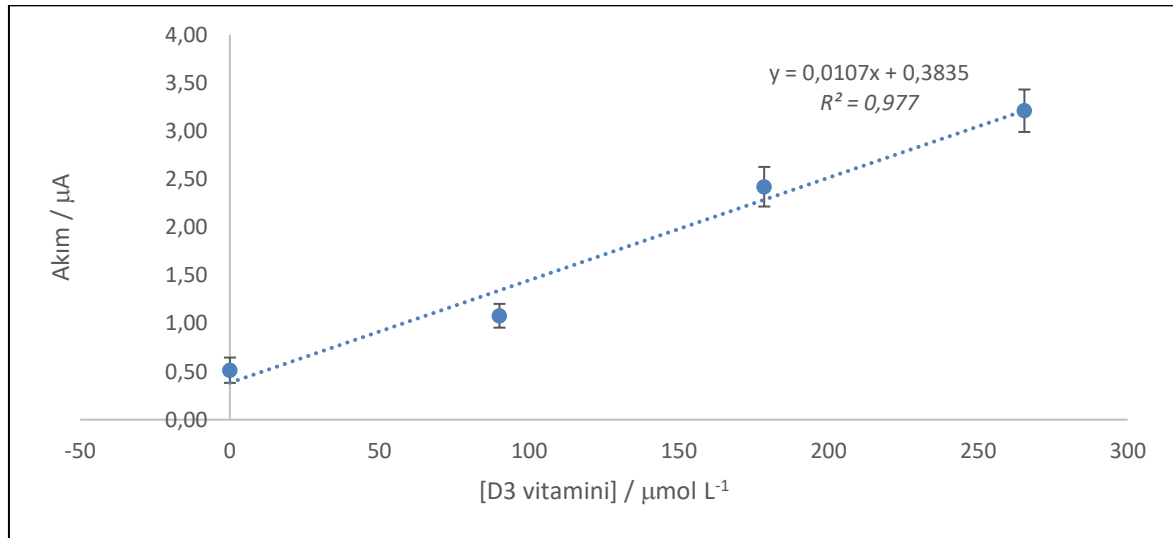
1. 5,00 mL DE
2. 1+0,5mL D vitamini numunesi (Bilinmeyen)
3. 2+0,05 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M D₃ vitamini
4. 3+0,05 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M D₃ vitamini
5. 4+0,05 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M D₃ vitamini

Çizelge 5.7. 5,00 mL DE ve D vitamini numunesi içerisinde $1,0 \times 10^{-2}$ M D₃ vitamini ilavelerine karşı okunan difüzyon akımları ve ilgili hesaplamalar

Eklenen D ₃ hacmi, (mL)	Hücre içi [D ₃], (μM)	Çalışma no ve okunan difüzyon akımları (μA)			
		1	2	Ortalama akım (μA)	Std. Sapma
0,5	44 (Bilinmeyen)	0,42	0,60	0,51	0,13
0,05	90	0,99	1,17	1,08	0,12
0,10	178	2,28	2,53	2,42	0,20
0,15	265	3,05	3,37	3,21	0,22



Şekil 5.23. Şekil 5.22'deki voltamogramların yarı türevlerinin alınmış hali



Şekil 5.24. Çizelge 5.7'ye göre çizilen standart ekleme grafiği

Bu çalışmaya göre grafiğin denkleminde y 'ye 0 verirse ve x 'i çekersek D₃ vitamininin sentetik örnekteki derişimi;

$$0 = 0,0107x + 0,3835$$

$x = 35,8 \mu\text{M}$ bulunur.

6. YORUM VE ÖNERİLER

D₃ vitamini tayininde ilk adım olarak en iyi destek elektrolitin belirlenmesi için çalışmalar yapıldı. Bu amaçla D₃ vitamini yağda çözünen bir vitamin olduğu için susuz ortamda çalışıldı. LiClO₄, TETFB, TBATFB tuzlarını içeren çözeltiler DMSO ve C₂H₅OH kullanılarak hazırlandı. D₃ vitaminin bu çözeltilerdeki davranışı CV ile incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda D₃ vitaminin 0,100 M TBATFB çözeltisinde bir tane anodik pik verdiği görüldü. Bu nedenle D₃ vitamin tayini için 0,100 M TBATFB çözeltisi destek elektrolit olarak seçildi.

Çalışma elektrodu olarak ise nikel elektrot, KGE, GCE, altın elektrot ve platin elektrotlar denendiğinde D₃ vitamini tayini için en iyi elektrodun KGE olduğu görüldü.

D₃ vitamininin elektrokimyasal tayininde en iyi destek elektrolitin 0,100 M TBATFB çözeltisi ve çalışma elektrodunun 07 KGE olduğu görüldükten sonra kalitatif tayine geçildi. Bunun için SWV kullanıldı. +0,200 ile +1,600 V aralığında anodik yönde voltomogram alındığında D₃ vitamininin +1,200 V civarında bir anodik pik verdiği görüldü. Üzerine yapılan standart D₃ vitamini eklemelerine bu pikin akımında artış olduğu gözlemlendi(Şekil 3).

D₃ vitamininin +1,200 V civarındaki pikine askorbik asit, ürik asit, $5,40 \times 10^{-4}$ M B₁, $3,87 \times 10^{-5}$ M B₂, $2,153 \times 10^{-4}$ M B₆ Vitamini, E Vitamini ve C Vitamininin girişim etkileri incelendi. Askorbik asit, ürik asit, $5,40 \times 10^{-4}$ M B₁, $3,87 \times 10^{-5}$ M B₂, $2,153 \times 10^{-4}$ M B₆ vitaminlerinin tek başlarına girişiminin olmadığı, E vitamini ve C vitaminlerinin ise tek başlarına girişim etkilerinin olduğu görüldü.

İçerisinde D₃ vitamini ve 0,02 mL BK vit + 0,02mL $1,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit + 0,02 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M) askorbik asit vitamini 0,02mL $8,17 \times 10^{-5}$ M C vitamini + 0,02mL 0,317 M E vitaminlerinden oluşan sentetik bir karışım hazırlandı. Bu karışım içerisindeki D₃ vitamini % -6, 2 bağıl hata ile (n=3) tayin edildi. Ayrıca D₃ vitamini için geliştirilen bu yöntem gerçek örneğe (balık yağın numunesi) uygulandığında, balık yağı numunesinde D₃ vitamini ile 8, 13 µg/100 g tayin edildi. Yine gerçek numune olarak D vitamini içeren ilaç temin edildi. Bu ilaç içerisindeki D₃ vitamini %. 20 bağıl hata ile tayin edildi.

Sonuç olarak 0,100 M TBATFB çözeltisi destek elektrolit ortamında ve çalışma elektrodunun 07 KGE olduğu şartlarda D₃ vitamini hiçbir ön işlem yapılmadan ve çok hızlı, seçici, düşük maliyetli, tekrarlanabilir ve duyarlılığı yüksek olarak tayin edilebileceğini gösterdi. Geliştirilen metodun literatürde bulunan az sayıda elektrokimyasal çalışmaya göre yukarıda bahsedilen üstünlükleri nedeniyle daha çok tercih edileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ardeniz, Ö. (2008). Vitamin D ve immün sistem. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 28(2), 198-205
- Adams, JS. (2010). Update in vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(2), 8-471.
- Aguado, P., Garces, M. V., Bernad, M., Martinez, M. E., Torrijos, A. ve Mola, E. M.(2000). Low vitamin D levels in outpatient postmenopausal women from a rheumatology clinic in Madrid, Spain: their relationship with bone mineral density. *Osteoporosis International*, 11, 739-744.
- Balcı, C. ve Toktaş, N.(2021). D vitamini sentezi, metabolizması sağlık üzerine etkileri, *Gazi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(1), 33-47.
- Bard, A. J. ve Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical methods: fundamentals and application (2nd Edition)*. New York: John Wiley and Sons, Inc.,15-25
- Bayraktar, N. (2017). *Pankreas Hormonlar, Temel/Klinik Biyokimya*. Ankara: Pelikan Kitabevi, 528-529.
- 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, 118-136.
- Buğrul F. (2011). *Süt Çocukluğu Dönemindeki Bebeklerin Annelerine Verilen D Vitamininin Düzeyine Etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Çocuk Sağlığı Enstitüsü, İstanbul, 13-14 ,
- Canevari, T. C., Cincotto, F. H., Landers, R. ve Machado, S. A. S. (2014). Synthesis and characterization of α -nickel (II) hydroxide particles on organic-inorganic matrix and its application in a sensitive electrochemical sensor for vitamin D determination. *Electrochimica Acta*, 147, 688-695.
- Carlucci, L., Favero, G., Tortolini, C., Di Fusco, M., Romagnoli, E., Minisola, S. ve Mazzei, F. (2013). Several approaches for vitamin D determination by surface plasmon resonance and electrochemical affinity biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1), 350-355.
- Chan, Y. Y., Yue, Y.ve Webster, R. D. (2014). Voltammetric studies on vitamins D2 and D3 in organic solvents. *Electrochimica Acta*,138, 400-409.
- Cincotto, F. H., Canevari, T. C. ve Machado, S. A. (2014). Highly Sensitive Electrochemical Sensor for Determination of Vitamin D in Mixtures of Water-Ethanol. *Electroanalysis*, 26(12), 2783-2788.

- Engelsen, O. (2010). The relationship between ultraviolet radiation exposure and vitamin D status. *Nutrients*, 2(5), 482-495.
- Glerup, H., Mikkelsen, K., Poulsen, L., Hass, E., Overback, S., Thomsen, J., Charles, P. ve Eriksen E. F. (2000). Commonly recommended daily intake of Vitamin D is not sufficient if sunlight exposure is limited. *Journal of Internal Medicine*, (247), 260-268.
- Güleken, N. (2012). *Kanser Hastalarında D Vitamini, Kalsiyum ve Fosfor Düzeyleri ile D Vitamini Reseptörü Polimorfizminin Araştırılması*. Yüksek lisans tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep, 21-23
- Hart, J. P., Norman, M. D. ve Lacey, C. J. (1992). 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*, 117(9), 1441-1445.
- Hatun, Ş., Bereket, A., Çalıkoğlu, A. S. ve Özkan, B. (2003). Günümüzde D vitamini yetersizliği ve nutrisyonel rikets. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 46, 224-41.
- Holick, M. F., Chen, T. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *The American Journal of Clinical Nutrition* 87(4), 1080-1086.
- Holick, M. F. (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6), 1678-1688.
- Holick, M. F. (2005). The Vitamin D epidemic and its health consequences. *The Journal of Nutrition*, 135, 2739-2747.
- Holick, M. F. (2008). Sunlight, UV-radiation, vitamin D and skin cancer: How much sunlight do we need? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 624:1-15.
- Jahnsen, J., Falch, J. A., Mowinckel, P. ve Aadland, E. (2002). Vitamin D status, parathyroid hormone and bonemineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterol*, 37(2), 192-199.
- Javorsky, B. R., Maybee, N. (2006). Vitamin D deficiency in gastrointestinal disease. *Nutrition Issues in Gastroenterology*, 36, 52-72.
- Kulie, T., Groff, A., Hounshell, J. ve Schrager, S. (2009). Vitamin D:an evidence-based review. *Journal of the American Am Board of Family Medicine*, 22(6), 698-706.
- Lips, P. (2010). Worldwide status of vitamin D nutrition. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121(1-2), 297-300.

- Mahmoodani, F., Perera, C. O., Fedrizzi, B., Abernethy, G. ve Chen, H. (2017). Degradation studies of cholecalciferol (vitamin D3) using HPLC-DAD, UHPLC-MS/MS and chemical derivatization. *Food Chemistry*, 219, 373-381.
- Masuda, S., Okano, T., Kamao, M., Kaneda, Y. ve Kobayashi, T. (1997). A novel high-performance liquid chromatographic assay for vitamin D metabolites using a coulometric electrochemical detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15(9-10), 1497-1502.
- Mendez, J. H., Perez, A. S., Zamarreño, M. D. ve Garcia, M. L. H. (1988). Voltammetric determination of vitamin D3 with a rotating glassy carbon electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 6(6-8), 737-741.
- Nallbani, A., Holubová, J., Sýs, M., Arbnesi, T. ve Vytrás, K. (2018). Voltammetric determination of cholecalciferol at glassy carbon electrode performed in water-ethanol mixture. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 12(1), 166-172.
- Ozbakir, H., Sambade, D., Linday, L. A. ve Banta, S. (2015). Detection of 25-hydroxyvitamin D3 with an enzyme modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 7(1), 2-8.
- Özbal, A. (2020). *Dietilstilbestrol Ve Propranolol Tayini İçin Voltametric Ve Akışa Enjeksiyon Temelli Yöntem Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Eskişehir, 24-25.
- Özkan, B. ve Döneray, H. (2011). D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 54(2), 99-119.
- Rockell, J. E. ve Green, T. (2005). Season and ethnicity are determinants of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in New Zealand children aged 5-14 y. *The Journal of Nutrition*, 135(11), 2602-2608.
- Scott, K. (2016). Electrochemical principles and characterization of bioelectrochemical systems. *Microbial Electrochemical and Fuel Cells*, 29-66.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. ve Crouch, S. R. (2004). Fundamentals of Analytical Chemistry (8th Edition). Belmont, CA: Brooks–Cole–Thomson Learning, 630-640
- Sutton, A. L. M. ve MacDonald, P. N. (2003). Vitamin D: more than a “bone-a-fide” hormone. *Molecular Endocrinology*, 17(5), 777-791.
- Uslu, B. ve Özkan, S. A. (2011). Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals; a review of recent trends and developments. *Analytical Letters*, 44 (16), 2644-2702.

Wang, J. (2006). *Analytical Electrochemistry (3rd Edition)*. New York: John Wiley ve Sons Inc. Publication, 29-60

Webb, A.R., Kline, L. ve Holick, M. F. (1988). Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* ,67(2), 373-378.



GAZİ GELECEKTİR . .