

Liyofilize Serumda  
25-Hidroksi Vitamin D<sub>2</sub> ve 25-Hidroksi Vitamin D<sub>3</sub>  
UME CRM 1308

Raporu Hazırlayanlar

Gökhan BİLSEL

Dr. Kevser TOPAL

Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN

Dr. Alper İŞLEYEN

Dr. Bilgin VATANSEVER

Seda Damla HATİPOĞLU

Tarih  
31/08/2016

  
Dr. Mustafa ÇETİNTAŞ  
Enstitü Müdürü

**İÇİNDEKİLER**

İÇİNDEKİLER.....	2
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	3
ÖZET.....	4
GİRİŞ.....	5
KATILIMCILAR.....	6
MALZEME İŞLEME.....	7
HOMOJENLİK.....	7
KARARLILIK.....	11
Kısa Dönem Kararlılık Sonuçları.....	11
Uzun Dönem Kararlılık Sonuçları.....	17
KARAKTERİZASYON.....	20
EK ÖLÇÜMLER.....	21
ÖZELLİK DEĞERLERİ VE BELİRSİZLİKLERİNİN ATANMASI.....	22
İZLENEBİLİRLİK.....	23
DEĞİŞTİRİLEBİLİRLİK (COMMUTABILITY).....	23
KULLANIM TALİMATI.....	23
Kullanım Amacı.....	23
Uygulama Kapsamı.....	23
Güvenlik Uyarıları.....	23
Malzemenin Kullanıma Hazırlanması.....	24
En Az Örnek Alım Miktarı.....	24
Sertifika Değerinin Kullanımı.....	25
TEŞEKKÜR.....	25
KAYNAKLAR.....	25
REVİZYON TARİHÇESİ.....	26
EK 1: ID-LC-MS Tekniğine ait Detaylar.....	26
EK 2: ID-LC-MS/MS Tekniğine ait Detaylar.....	27
EK 3: HPLC-UV Tekniğine ait Detaylar.....	29
EK 4: Laboratuvarlar Arası Ortak Çalışma Sonuçları.....	29

### SEMBOLLER VE KISALTMALAR

$\Delta_m$	Ölçüm sonucu ile sertifikalandırılan değer arasındaki fark
ANOVA	Varyans Analizi ( <i>Analysis of Variance</i> )
APCI	Atmosfer Basıncı Kimyasal İyonlaşma ( <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> )
CRM	Sertifikalı Referans Malzeme ( <i>Certified Reference Material</i> )
$df / v_{MS_{within}}$	Serbestlik Derecesi
HPLC	Yüksek Başarımli Sıvı Kromatografisi ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
ID-LC-MS/MS	İzotop Seyreltme Sıvı Kromatografi Sıralı Kütle Spektroskopisi ( <i>Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectroscopy</i> )
ID-LCMS	İzotop Seyreltme Sıvı Kromatografi Kütle Spektroskopisi
IS	İç Standart
ISO	Uluslararası Standartlar Örgütlenmesi ( <i>International Standards Organisation</i> )
$k$	Kapsam Faktörü
$MS_{between}$	Gruplar Arası Kareler Ortalaması
$MS_{within}$	Grup İçi Kareler Ortalaması
NIST	Ulusal Standartlar ve Teknoloji Kurumu-ABD ( <i>National Institute for Standards and Technology- USA</i> )
NIST SRM	NIST tarafından üretilen Standart Referans Malzeme
$RSD_{stab}$	Kararlılık Verisine ait Bağlı Standart Sapma
$s$	Standart Sapma
$s_{bb}$	Üniteler Arası Standart Sapma
SI	Uluslararası Birimler Sistemi
SRM	Sertifikalı Referans Malzeme
SS	Karelerin Toplamı
$u_{\Delta}$	Ölçüm sonucu ile sertifikalandırılan değer arasındaki farka ait bileşik standart belirsizlik
$U_{\Delta}$	Ölçüm sonucu ile sertifikalandırılan değer arasındaki farka ait genişletilmiş belirsizlik
$u_{bb}$	Olası üniteler arası heterojenliğe bağlı standart belirsizlik
$u_{bb}^*$	Metot tekrarlanabilirliği tarafından gizlenmiş olabilecek heterojenliğin standart belirsizliği
$u_{char}$	Karakterizasyon çalışmasına ait belirsizlik
$u_{CRM}$	SRM'ye ait bileşik standart belirsizlik
$u_{sts}$	Kısa Dönem Kararlılık Çalışmasına ait bileşik standart belirsizlik
$u_{lts}$	Uzun Dönem Kararlılık Çalışmasına ait bileşik standart belirsizlik
$u_{meas}$	Ölçüm belirsizliği
$U_{CRM}$	SRM'ye ait genişletilmiş belirsizlik
$X_i$	Her bir tekrara ait zaman dilimi
$\bar{X}$	Tüm zaman değerlerinin ortalaması
$x$	Raf ömrü

## ÖZET

Sertifikalı Referans Malzeme (SRM) kullanımı izlenebilirlik sağlanmasının araçlarından biri olarak ölçüm kalitesinin artmasına katkı sağlar. Serumda vitamin D miktar tayini tanı amacıyla sıklıkla yapılmakta, tespit edilen derişime göre tedavi uygulanmaktadır. D vitamini eksikliği/fazlalığı, kandaki vitamin D metabolitleri; 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> miktarı ölçümü ile tespit edilir.

Dünyada, bu ölçümlerde kullanılacak, serum matrisinde vitamin D metabolitleri sertifikalı referans malzemesi sınırlı sayıda bulunmaktadır. Projenin amacı, UME CRM 1308; "Liyofilize Serumda 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> Derişimi" SRM'si üretimi ve sertifikalandırılmasıdır. Üretilen SRM ile klinik laboratuvarlarda serumda vitamin D ölçümlerinin SI birimlerine izlenebilirliği sağlanabilmektedir.

Bu sertifikalandırma raporu, ISO Guide 34'e <sup>[1]</sup> göre UME CRM 1308 kodlu SRM'nin üretimi, sertifikalandırılması ve bu süreçte yapılan çalışmalara ait detayları içermektedir. Raporda, UME CRM 1308 üretim ve analiz süreçleri, homojenlik, kararlılık ve karakterizasyon çalışmalarına ait bulgular, istatistiksel değerlendirmeler ve yorumlar sunulmuş, ölçüm belirsizliği bütçesi ISO/IEC Guide 98-3 "Uncertainty Measurement-Part 3: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM:1995)" dokümanına <sup>[2]</sup> uygun olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** UME CRM 1308 için sertifikalandırılan değerler ve belirsizlik değerleri

Ölçülen Büyüklük	Kütle Kesri <sup>[1]</sup> [ng/g]	$U_{CRM}$ <sup>[2]</sup> [ng/g]	Derişim <sup>[3]</sup> [ng/mL]	$U_{CRM}$ <sup>[2,3]</sup> [ng/mL]
Liyofilize serumda 25-hidroksi vitamin D <sub>2</sub> Derişimi	49,97	2,86	51,00	2,92
Liyofilize serumda 25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub> Derişimi	48,76	2,59	49,76	2,65

- [1] Sertifikalandırılmış değerler iki ünite CRM'den iki farklı günde ID-LCMS tekniği ile elde edilen 6 ölçüm sonucunun ortalamasıdır. Ölçüm sonuçları ve belirsizlikleri Uluslararası Birimler Sistemi'ne (SI) izlenebilirlerdir.
- [2] Sertifikalandırılmış değere ait belirsizlik homojenlik, kararlılık ve karakterizasyon bileşenlerini içermektedir. Sertifikalandırılan değerler için belirsizlik, standart belirsizliğin normal dağılım için yaklaşık % 95 güvenilirlik seviyesini sağlayan  $k = 2$  kapsam faktörü ile çarpımının sonucudur. Standart ölçüm belirsizliği GUM "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement" dokümanına uygun olarak belirlenmiştir.
- [3] Sertifikalandırılan değerler ve belirsizlikleri malzemenin 22 °C'de ölçülmüş yoğunluğu (1,0206 g/mL) kullanılarak kütle kesri'nden (ng/g) hesaplanmıştır.

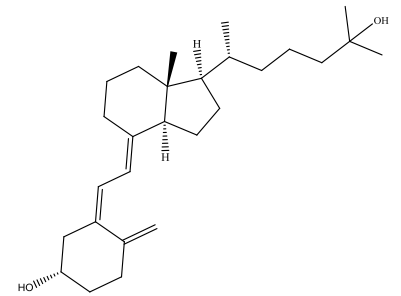
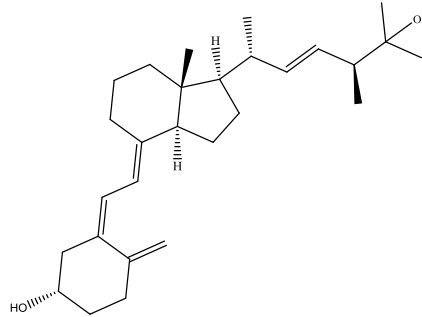
## GİRİŞ

Vitamin D'nin aktif formu vücutta kalsiyum seviyesinin kontrolüne yardımcı olur. Bilindiği gibi kalsiyum ve fosfat vücutta kemik ve diş yapımında kullanılır. Vitamin D, süt, balık vb. gibi çeşitli besinler yoluyla alınabileceği gibi güneş ışığı yoluyla vücutta da sentezlenebilir. Hem eksikliği (örneğin kemik erimesi), hem fazlalığı, (örneğin böbrek taşı oluşumu) her yaş grubunda gözlenebilen çeşitli sağlık sorunlarına neden olmaktadır [3,4]. Vitamin D'nin yeterli oranlarda alınmasının çeşitli kanser türlerine yakalanma riskini azaltabileceği raporlanmıştır [5-8]. Serumda vitamin D metabolitleri miktar tayini sıklıkla kullanılan tıbbi tanı araçlarından biridir ve bu alanda ölçümlerin kalitesi çok önemlidir.

UME CRM 1308 SRM'sinde, liyofilize at serumunda 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> derişimleri sertifikalandırılmıştır. Bu raporda UME CRM 1308 SRM'sinin üretim ve sertifikalandırma süreçleri sunulmuş ve yapılan çalışmalara ait teknik bilgi, veri ve istatistiksel analizler detaylı bir şekilde verilmiştir. UME CRM 1308 LC-MS, LC-MS/MS ve HPLC-UV ölçümlerinin izlenebilirliği ve kalite kontrolünü sağlamak için üretilmiştir.

UME CRM 1308'in ISO 15194 standardına göre sistematik tanımlaması "Sertifikalı Referans Malzeme UME CRM 1308 – Liyofilize At Serumunda 25-hidroksi Vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi Vitamin D<sub>3</sub>"tür.

### Kimyasal Yapısı



### Kısa İsmi

25-hydroxy vitamin D<sub>2</sub>

25-hydroxy vitamin D<sub>3</sub>

### IUPAC İsmi

(1S,3Z)-3-[(2E)-2-[(1R,3aS,7aR)-1-[(E,2R,5S)-6-hydroxy-5,6-dimethylhept-3-en-2-yl]-7a-methyl-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-ylidene]ethylidene]-4-methylidenecyclohexan-1-ol

(1S,3Z)-3-[(2E)-2-[(1R,3aS,7aR)-1-[(2R)-6-Hydroxy-6-methylheptan-2-yl]-7a-methyl-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-ylidene]ethylidene]-4-methylidenecyclohexan-1-ol

### Kimyasal Formül

C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>

C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>

**Şekil 1.** Vitamin D metabolitlerinin belirli özellikleri

## KATILIMCILAR

İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde gerçekleştirilen malzeme işleme faaliyeti haricinde UME CRM 1308'in tüm üretim ve sertifikalandırma aşamaları TÜBİTAK UME'de gerçekleştirilmiştir. İlave veri oluşturmak amacıyla alanında uzman laboratuvarlara da (Tablo 2) üretilen malzemenin analizleri yaptırılmış ve ölçüm sonuçları bu raporda bilgi amaçlı olarak verilmiştir (Ek 4, Tablo 29).

**Tablo 2.** Projede yer alan katılımcı kuruluşlar ve iş tanımları

<b>Katılımcı</b>	<b>İş Tanımı</b>
Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarı Küçük Çamlıca Mah. Ord. Prof. Fahrettin Kerim Gökay Cad. No: 49 Üsküdar İSTANBUL/TÜRKİYE	Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma Çalışması
Düzen Laboratuvarları Tunus Cad. No:95 Kavaklıdere ANKARA/TÜRKİYE	Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma Çalışması
Ghent University Laboratory of Analytical Chemistry, Faculty Pharmaceutical Sciences Ghent University Harelbekestraat 72 9000 GHENT/BELÇİKA	Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma Çalışması
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fikret Biyal Merkez Araştırma Laboratuvarı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yerleşkesi Kocamustafapaşa Cad. No: 53 Cerrahpaşa 34098 İSTANBUL/TÜRKİYE	Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma Çalışması
Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü Batı Mah. Erol KAYA Cad. No:1 34890 İSTANBUL/TÜRKİYE	Malzeme İşleme
TÜBİTAK UME TÜBİTAK Gebze Yerleşkesi, Dr. Zeki Acar Cad. No.1, 41470 KOCAELİ/TÜRKİYE	Proje Yönetimi ve Sertifikalandırma

Sayfa 7 / 29	<b>TÜBİTAK</b> <b>ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ</b>	<b>UME CRM</b> <b>1308</b>
--------------	---	-------------------------------

## **MALZEME İŞLEME**

UME CRM 1308, endojen olarak 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> içeren at serumuna 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> eklenerek hazırlanmıştır. At serumu Biochrom AG (Almanya), 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> analitleri Sigma-Aldrich (ABD) firmalarından temin edilmiştir.

Elde edilen serum çözeltisi, hacmi yaklaşık 2 mL olacak şekilde amber cam ünitelere şişelenmiştir. Dolum sırası etiketleme yapılarak kayıt altına alınmıştır. Toplam 500 ünite üretilmiştir. Tüm üniteler aynı anda liyofilize edilmiştir. Şişelerin önce vakum altında iç kapakları kapatılmış ve liyofilizatörden çıkarıldıktan sonra vida kapakları takılmıştır.

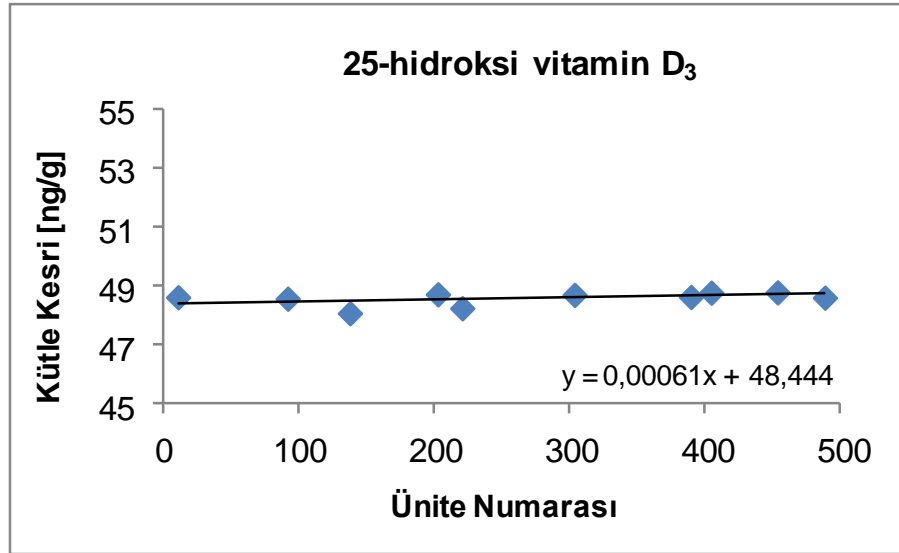
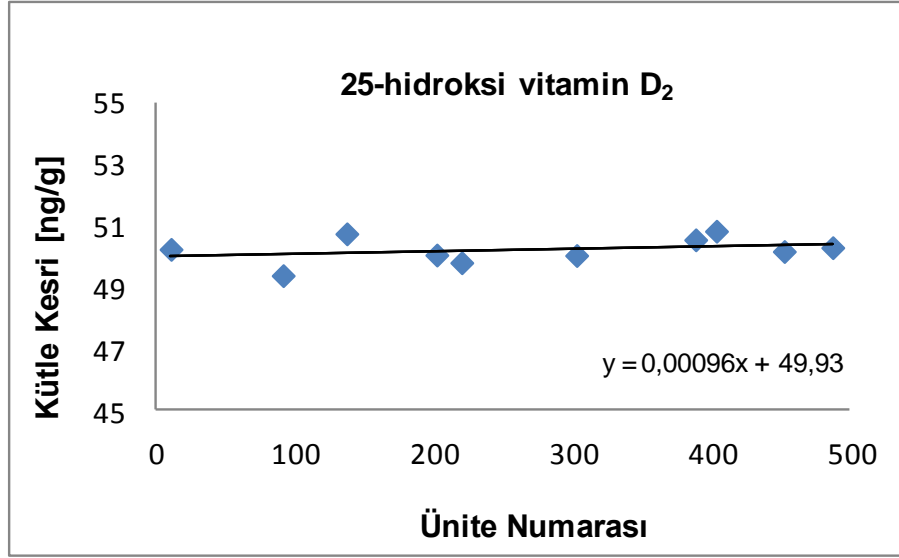
Üniteler içerisinde, homojenlik değerlendirmesi, kararlılık çalışmaları ve karakterizasyon gibi üretim sürecinin farklı aşamaları için kullanılacak olan üniteler, kullanılacağı sürecin gerektirdiği koşullarda saklanmak üzere tabakalı rastgele numune seçimi (TRaNS)<sup>[9]</sup> yazılımı kullanılarak seçilmiş ve düzenli sıcaklık kontrolü yapılarak muhafaza edilmiştir.

## **HOMOJENLİK**

25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>'ün sertifikalandırılmasında üniteler arası heterojenliğin belirlenebilmesi için toplam ünite sayısının küp kökü alınarak belirlenen sayının 10'dan küçük olması dolayısıyla 10 ünite UME CRM 1308 TRaNS<sup>[9]</sup> yazılımı kullanılarak seçilmiştir.

Homojenlik analizi ID-LC-MS/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 3). Yöntem detayları Ek 1'de verilmiştir. Homojenlik tespiti için yapılan ölçümler, tekrarlanabilirlik koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Grafik 1'de verilmiştir. Homojenlik çalışmasına ait ölçüm sonuçları ile bağlanım (regresyon) analizi yapılmıştır (Tablo 4). Bağlanım eğrisinin eğimi t-testi ile % 95 güvenilirlik seviyesinde incelendiğinde dolum veya analiz sırasından kaynaklı herhangi bir istatistiksel anlamlılığa rastlanmamıştır (Tablo 5).

Aykırı değer için Grubbs' Testi yapılmış ve herhangi bir aykırı değere rastlanılmamıştır.

**Grafik 1.** Homojenlik çalışması sonuçları



**Tablo 3.** Homojenlik çalışması sonuçları

Ünite Numarası	Kütle Kesri [ng/g]	
	25-hidroksi vitamin D <sub>2</sub>	25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub>
10	50,22	48,66
137	50,73	48,11
220	49,79	48,28
303	50,02	48,74
404	50,81	48,81
453	50,15	48,82
488	50,28	48,64
91	49,37	48,61
202	50,04	48,76
389	50,53	48,67

**Tablo 4.** 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> analiti için homojenlik ölçüm sonuçlarına ait ANOVA bulguları

Ünite Numarası	Tekrar Sayısı	Ortalama [ng/g]	Varyans [ng <sup>2</sup> /g <sup>2</sup> ]
10	2	50,22	0,01
137	2	50,73	0,86
220	2	49,79	0,00
303	2	50,02	0,25
404	2	50,81	0,03
453	2	50,15	0,16
488	2	50,28	0,01
91	2	49,37	0,00
202	2	50,04	0,02
389	2	50,53	0,17

ANOVA					
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	F <sub>krit</sub>
Gruplar Arasında	3,39	9	0,38	2,51	3,02
Gruplar İçinde	1,50	10	0,15		

**Tablo 5.** 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> analiti için homojenlik ölçüm sonuçlarına ait ANOVA bulguları

Ünite Numarası	Tekrar Sayısı	Ortalama [ng/g]	Varyans [ng <sup>2</sup> /g <sup>2</sup> ]		
10	2	48,66	0,36		
137	2	48,11	0,67		
220	2	48,28	0,01		
303	2	48,74	0,01		
404	2	48,81	0,87		
453	2	48,82	0,02		
488	2	48,64	0,11		
91	2	48,61	0,05		
202	2	48,76	0,06		
389	2	48,67	0,00		
<b>ANOVA</b>					
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	F <sub>krit</sub>
Gruplar Arasında	0,97	9	0,11	0,50	3,02
Gruplar İçinde	2,17	10	0,22		

$MS_{between} < MS_{within}$ , olduğu durumlarda üniteler arası rastgele dağılım ( $s_{bb}$ ) hesaplanamaz. Bunun yerine yöntem tekrarlanabilirliğince gizlenmiş üniteler arası standart belirsizlik ( $u^*_{bb}$ ) aşağıdaki gibi hesaplanır<sup>[10]</sup>:

$$u^*_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \sqrt{\frac{2}{v_{MS_{within}}}}$$

Bu çalışma bulgularına ait  $u^*_{bb}$  değeri 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> için 0,52 ng/g ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> için 0,47 ng/g olarak tespit edilmiştir.

ANOVA bulguları dolımdan gelen bir eğilimin olmadığına işaret etmektedir (25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> için  $F = 2,51 < F_{krit} = 3,02$  ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> için  $F = 0,50 < F_{krit} = 3,02$ ).

Sayfa 11 / 29	<b>TÜBİTAK</b> <b>ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ</b>	<b>UME CRM</b> <b>1308</b>
---------------	---	-------------------------------

## KARARLILIK

UME CRM 1308 için iki farklı kararlılık çalışması yürütülmüştür. Kısa dönem kararlılık nakliye şartlarını ve uzun dönem kararlılık depolama koşullarını temsil etmek üzere gerçekleştirilmiştir.

### Kısa Dönem Kararlılık Sonuçları

Kısa dönem kararlılık testi için 52 (26'sı yedek) ünite UME CRM 1308 ve uzun dönem kararlılık testi için 36 (18'i yedek) ünite UME CRM 1308 kullanılarak yapılmıştır. Numuneler TRaNS yazılımı ile belirlenmiştir.

Kısa dönem kararlılık çalışmaları için test edilen sıcaklıklar: -20 °C, 4 °C ve 25 °C ve süreler: 1, 2, 3 ve 4 hafta olarak belirlenmiştir. Her bir sıcaklık ve zaman noktası için 4 ünite, test sıcaklığına, referans nokta için ise 4 ünite, referans sıcaklık olarak seçilen (-80 ± 3) °C'ye yerleştirilmiştir. Her hafta CRM'den 4 ünite referans sıcaklığa aktarılmıştır. 4 haftalık süre tamamlandığında referans sıcaklığa transfer edilen bütün üniteler, referans olarak kullanılacak üniteler ile birlikte tekrarlanabilirlik koşulları altında analiz edilmiştir. Analizler detayları Ek 2'de verilen ID-LCMS/MS yöntemi ile yapılmıştır. Kısa dönem kararlılık çalışmasında kullanılan ünitelerin numaraları, test sıcaklıkları ve test süreleri Tablo 6'da her iki analit için verilmiştir. Sonuçlar (Tablo 7) her bir test sıcaklığı için ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Tablo 8 ve Tablo 10). Elde edilen sonuçlara "Grubbs' Testi" uygulanmış ve aykırı değer olmadığı gözlenmiştir.

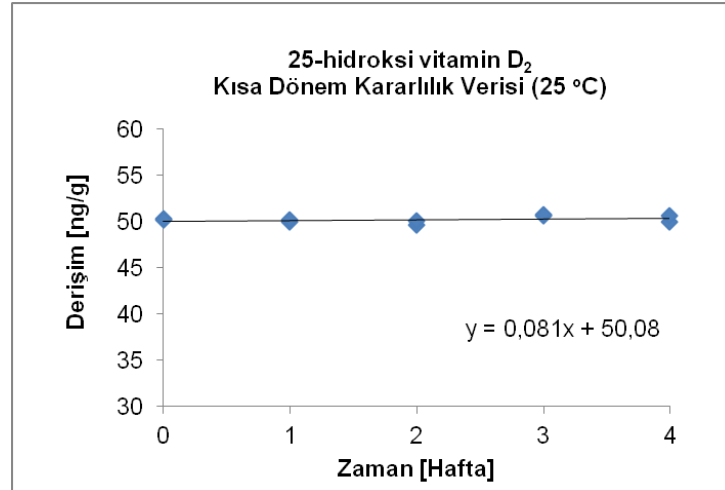
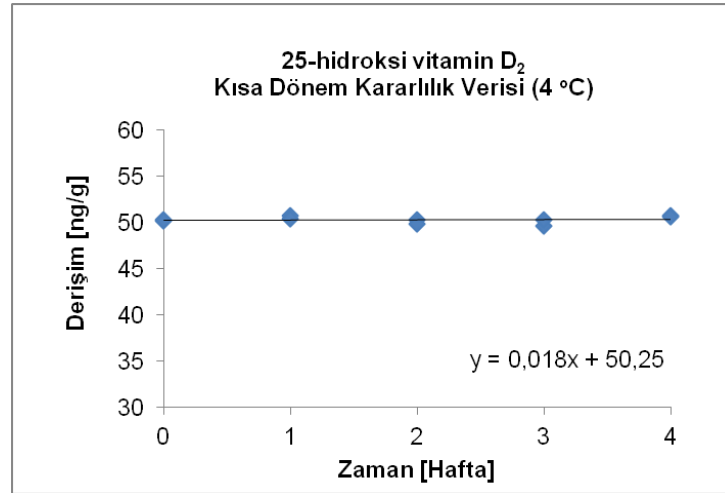
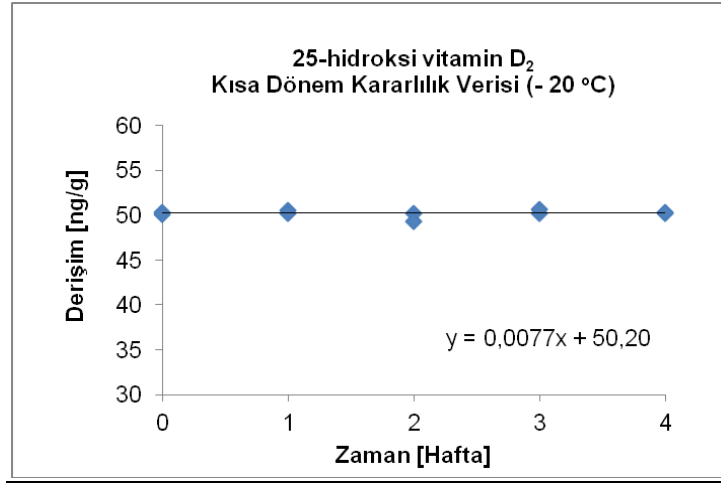
Buna ek olarak, derişimin sıcaklık ile değişimini incelemek için her bir sıcaklık için ayrı ayrı değerlendirme yapılmıştır. Bağlanım eğrileri istatistiksel anlamlılık ağısından incelendiğinde, tüm seçilen sıcaklıklar için bağlanım eğrisine ait eğimin sıfırdan çok farklı olmadığı gözlenmiştir (% 95 güvenilirlik seviyesinde 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> için Tablo 9 ve Grafik 3, 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> için Tablo 11 ve Grafik 4).

**Tablo 6.** Kısa dönem kararlılık çalışmasına ait eş zamanlı izleme (isochronous setup) verisi

Ünite Numarası	Sıcaklık [°C]	Zaman [Hafta]
402	-80	0
464	-80	0
492	-20	1
6	-20	1
15	-20	2
288	-20	2
301	-20	3
25	-20	3
31	-20	4
305	-20	4
46	4	1
322	4	1
61	4	2
327	4	2
335	4	3
69	4	3
75	4	4
352	4	4
90	25	1
361	25	1
370	25	2
103	25	2
383	25	3
104	25	3
388	25	4
116	25	4

**Tablo 7.** Kısa dönem kararlılık çalışması sonuçları

Zaman [Hafta]	Kütle Kesri [ng/g]					
	25-hidroksi vitamin D <sub>2</sub>			25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub>		
	-20 °C	4 °C	25 °C	-20 °C	4 °C	25 °C
0	50,33	50,33	50,33	48,95	48,95	48,95
0	50,14	50,14	50,14	48,28	48,28	48,28
1	50,59	50,76	50,19	48,82	49,01	48,49
1	50,23	50,39	50,01	48,14	48,24	49,03
2	50,23	50,29	49,65	48,95	49,03	48,43
2	49,33	49,83	50,07	48,23	49,21	48,75
3	50,17	49,61	50,66	49,14	48,37	48,26
3	50,66	50,24	50,75	48,75	48,21	48,80
4	50,17	50,71	50,00	48,66	48,69	47,82
4	50,37	50,59	50,67	48,92	48,34	48,78



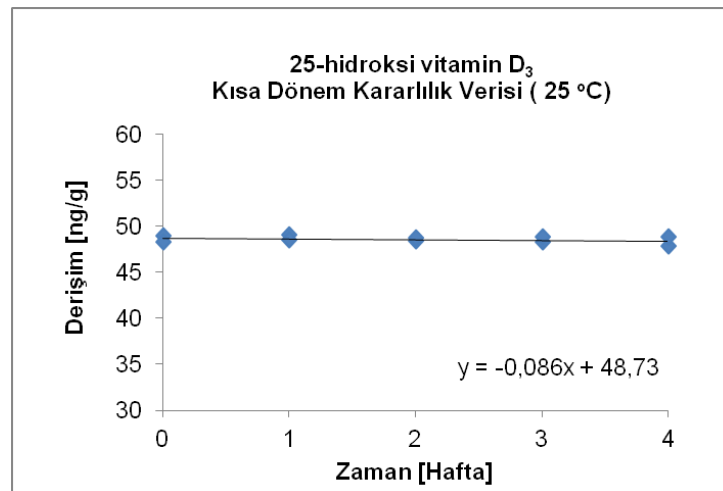
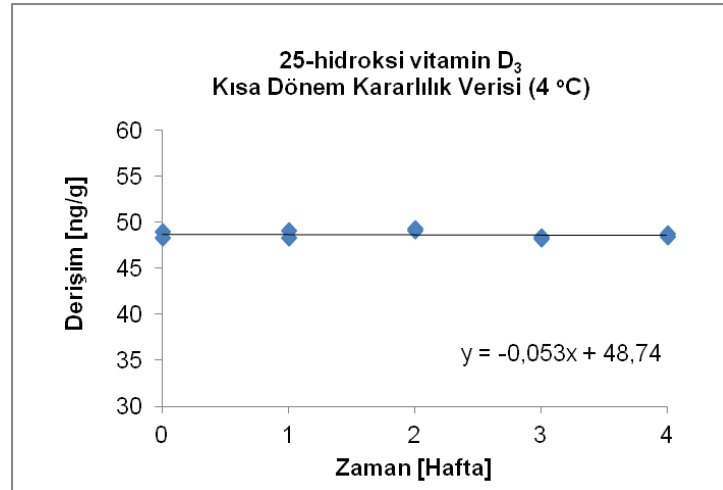
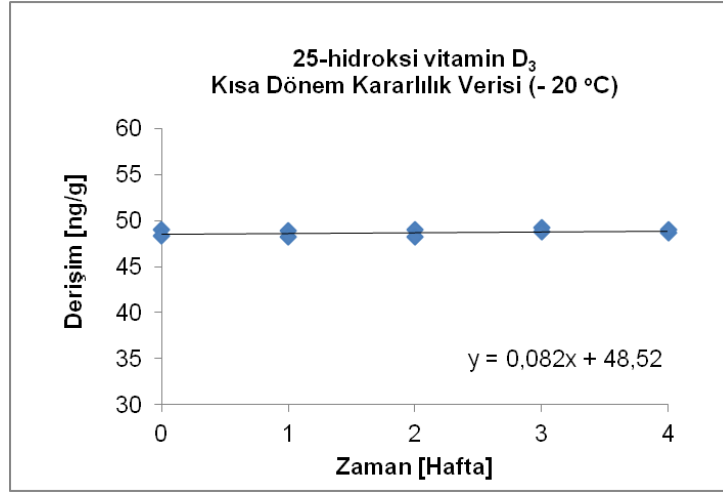
**Grafik 2.** 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> kısa dönem kararlılık verisi ile farklı sıcaklıklar için hazırlanmış bağlanım eğrileri

**Tablo 8.** 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> kısa dönem kararlılık ölçüm sonuçlarına ait ANOVA bulguları

Saklama Sıcaklığı [°C]	Tekrar Sayısı	Ortalama [ng/g]	Varyans [ng <sup>2</sup> /g <sup>2</sup> ]		
-80	2	50,23	0,02		
-20	8	50,22	0,16		
4	8	50,30	0,17		
25	8	50,25	0,16		
<b>ANOVA</b>					
Varyans Kaynağı	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F<sub>krit</sub></i>
Grup içi	0,03	3	0,01	0,064	3,05
Gruplar arası	3,46	22	0,16		

**Tablo 9.** 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> kısa dönem kararlılık çalışmasına ait istatistiksel analiz bulguları

İstatistiksel Parametreler	-20 °C	4 °C	25 °C
Eğim	0,0078	0,018	0,081
Eğim / <i>s<sub>b</sub></i>	0,086	0,086	0,079
İstatistiksel anlamlılık (%95 güvenilirlik seviyesi)	-	-	-
<i>u<sub>sts</sub></i> [ng/g]	0,0017	0,0017	0,0017



**Grafik 3.** 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> kısa dönem kararlılık verisi ile farklı sıcaklıklar için hazırlanmış bağlanım eğrileri



**Tablo 10.** 25-hidroksivitamin D<sub>3</sub> kısa dönem kararlılık ölçüm sonuçlarına ait ANOVA bulguları

Saklama Sıcaklığı [°C]	Tekrar Sayısı	Ortalama [ng/g]	Varyans [ng <sup>2</sup> /g <sup>2</sup> ]		
-80	2	48,61	0,22		
-20	8	48,70	0,12		
4	8	48,64	0,16		
25	8	48,54	0,15		
<b>ANOVA</b>					
<b>Varyans Kaynağı</b>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F<sub>krit</sub></i>
<b>Gruplar Arasında</b>	0,10	3	0,03	0,23	3,05
<b>Gruplar İçinde</b>	3,23	22	0,15		

**Tablo 11.** 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> kısa dönem kararlılık çalışmasına ait istatistiksel analiz bulguları

İstatistiksel Parametreler	-20 °C	4 °C	25 °C
<b>Eğim</b>	0,082	-0,053	-0,086
<b>Eğim / s<sub>b</sub></b>	0,078	0,090	0,083
<b>İstatistiksel anlamlılık (%95 güvenirlilik seviyesi)</b>	-	-	-
<b>u<sub>sts</sub> [ng/g]</b>	0,0017	0,0019	0,0026

UME CRM 1308 örnekleri sıcaklığın 25 °C'yi, sürenin 4 haftayı geçmemesi ve ışığa maruz kalmaması koşulu ile son kullanıcıya herhangi bir soğuk uygulama yapmadan sağlıklı bir şekilde ulaştırılabilir.

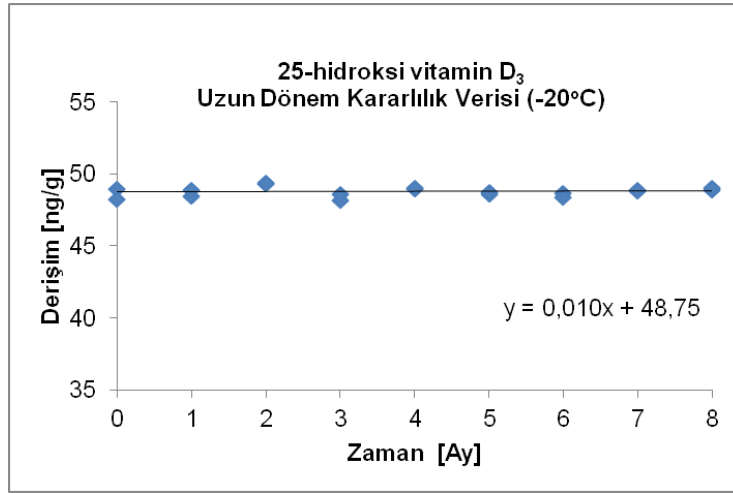
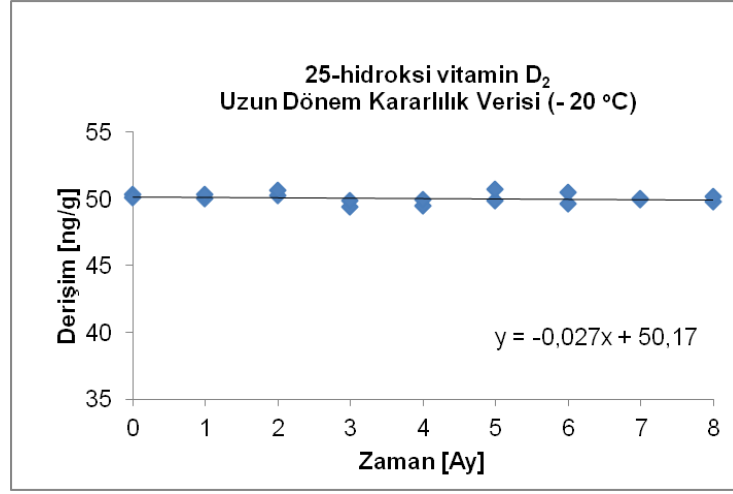
### **Uzun Dönem Kararlılık Sonuçları**

Uzun dönem kararlılık çalışmaları için, toplam 36 (26'sı yedek) ünite UME CRM 1308 TRaNS yazılımı ile seçilmiştir. Eş zamanlı izleme (isochronus) yöntemi doğrultusunda, bu çalışma için seçilen örnekler uzun dönem kararlılık test sıcaklığı olarak belirlenmiş olan (-20 ± 4) °C'ye konmuştur. 8 ay boyunca her ay 4 ünite referans sıcaklığa (-80 ± 3) °C aktarılmış ve süre sonunda bütün ünitelerin analizi tekrarlanabilirlik koşulları altında yapılmıştır. Ölçümler, dolum sırasından farklı bir sıralama ile gerçekleştirilmiştir. Analizler, Ek 2'de raporlanan deney ve cihaz parametreleri kullanılarak, ID-LC-MS/MS tekniği gerçekleştirilmiştir. Bu teknikte her bir üniteden iki paralel örnek hazırlanarak ölçüm alınmıştır. Sonuçlar Tablo 12'de verilmiştir.

Elde edilen veri istatistiksel olarak incelenmiştir (Tablo 13). Aykırı değer tespiti için Grubbs' testi uygulanmış ve herhangi bir aykırı değere rastlanılmamıştır.

**Tablo 12.** Uzun dönem kararlılık çalışması ölçüm sonuçları

Ünite Numarası	Zaman [ay]	Kütle Kesri [ng/g]	
		25-hidroksi vitamin D <sub>2</sub>	25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub>
283	0	50,33	48,95
53	0	50,14	48,28
380	1	50,00	48,49
20	1	50,37	48,92
468	2	50,23	49,40
336	2	50,65	49,31
68	3	49,39	48,17
434	3	49,87	48,59
119	4	49,51	48,98
204	4	49,96	49,05
258	5	49,86	48,64
310	5	50,70	48,79
225	6	49,66	48,72
156	6	50,47	48,38
351	7	49,94	48,83
139	7	49,99	48,89
474	8	49,83	48,92
56	8	50,22	49,03



**Grafik 4.** Uzun dönem kararlılık verisi ile hazırlanmış bağlanım eğrileri

**Tablo 13.** Uzun dönem kararlılık verisinin istatistiksel değerlendirilmesi

İstatistiksel Parametreler	Değer	
	25-hidroksi vitamin D <sub>2</sub>	25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub>
<b>Eğim</b>	-0,027	0,010
<b>Eğim / s<sub>b</sub></b>	0,033	0,035
<b>İstatistiksel anlamlılık (% 95 güvenilirlik seviyesi)</b>	-	-
<b>u<sub>ts</sub> [3 yıl] [ng/g]</b>	1,19	1,08

Zamana karşı çizilen derişim grafiğinin eğiminin sıfırdan çok farklı olmadığı (Grafik 4) görülmüştür. İstatistiksel olarak % 95 güvenilirlik seviyesinde değerlendirildiğinde eğimde istatistiksel anlamlılık olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 13).

Üç yıllık raf ömrü için uzun dönem kararlılık ölçümlerinden gelen belirsizlik  $u_{lts}$  aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır <sup>[12]</sup>.

$$u_{lts} = \frac{RSD_{stab}}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2}} \cdot x$$

Veri, malzeme için (-20 ± 4) °C saklama sıcaklığının uzun dönem muhafaza için uygun olduğunu göstermektedir. Sertifikalandırma sonrası izleme yapılarak malzemenin kararlılığı düzenli olarak izlenecek ve sertifikasının geçerliliği belirtilen raf ömrü sonrası için doğrulanacaktır.

## KARAKTERİZASYON

UME CRM 1308 SRM'sinin karakterizasyonu, SI birimlerine izlenebilirlik sağlayan birincil ID-LCMS tekniği ile yapılmıştır.

CRM adayının 2 ünitesi ID-LCMS tekniği ile ölçülmüştür. İç standart olarak ID-LCMS metodu için izotop etiketli 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub>-d<sub>3</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>-d<sub>3</sub> (Medical Isotope Laboratories, Inc., USA) kullanılmıştır. Liyofilize numune 2 mL deiyonize su içinde çözülmüştür. Cihaz ve kullanılan yöntemle ilişkin ayrıntılar Ek 1'de sunulmuştur. İki farklı günde her bir ünite için üç tekrarlı ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar tablo 14'te verilmiştir.

**Tablo 1.** Karakterizasyon çalışmaları sonucu elde edilen ID-LCMS ölçüm sonuçları

Ünite Numarası	Kütle Kesri [ng/g]	
	25-hidroksi vitamin D <sub>2</sub>	25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub>
100-1	49,66	49,27
100-2	50,18	48,49
100-3	49,93	48,51
70-1	50,13	48,74
70-2	49,47	49,21
70-3	50,44	48,36
<b>Ortalama</b>	49,97	48,76

## EK ÖLÇÜMLER

Ek ölçümler ID-LCMS/MS ve HPLC-UV yöntemleri ile de gerçekleştirilmiştir, ancak elde edilen sonuçlar değer ataması için kullanılmamıştır.

Her iki teknik ile 10 ünite analiz edilmiştir. İç standart olarak sırasıyla ID-LCMS/MS ve HPLC-UV metotları için izotop etiketli 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub>-d<sub>3</sub> (Medical Isotope Laboratories, Inc., USA) ve dodecanophenone (Sigma-Aldrich, USA) kullanılmıştır. Liyofilize numune 2 mL deiyonize su içinde çözülmüştür. Cihazlar ve kullanılan yöntemlere ilişkin ayrıntılar Ek 2 ve Ek 3'de sunulmuştur. Her iki yöntemle, her bir üniteden iki tekrarlı ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 15 ve Tablo 16'da sunulmaktadır.

**Tablo 15.** ID-LCMS / MS ile elde edilen ölçüm sonuçları

Ünite Numarası	Kütle Kesri [ng/g]	
	25-hidroksi vitamin D <sub>2</sub>	25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub>
152	49,85	49,34
202	50,04	48,76
389	50,86	48,53
455	50,23	49,04
41	49,78	49,09
208	48,95	48,81
282	50,02	48,56
344	51,09	49,15
368	50,58	48,87
499	49,50	48,33
<b>Ortalama</b>	50,09	48,85

**Tablo 16.** HPLC-UV ile elde edilen ölçüm sonuçları

Ünite Numarası	Kütle Kesri [ng/g]	
	25-hydroxy vitamin D <sub>2</sub>	25-hydroxy vitamin D <sub>3</sub>
379	48,73	48,49
71	48,52	47,76
142	48,57	49,05
377	48,50	48,74
334	48,68	49,22
19	49,17	48,56
180	48,64	48,75
470	48,18	48,58
130	48,66	48,47
426	48,23	48,64
<b>Ortalama</b>	48,59	48,63

Aday sertifikalı referans malzemesi aynı zamanda laboratuvarlar arası çalışma kapsamında yetkin laboratuvarlarca da analiz edilmiştir. Bu çalışmada ISO 34 kılavuzuna uygun olarak akredite ya da referans yöntem kullanan laboratuvarlar seçilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları Ek 4, Tablo 29'da sunulmaktadır.

Kalibreli pipet ve terazi ile çözülmüş malzemenin yoğunluğu 22 °C'de ölçülmüştür. Yoğunluk ölçüm sonucu 1,0206 g/mL'dir.

### ÖZELLİK DEĞERLERİ VE BELİRSİZLİKLERİNİN ATANMASI

Sertifikalandırılan değer, SI'ya izlenebilir birincil metot olarak kabul edilen ID-LC-MS tekniği ile elde edilmiş sonuçların ortalamasından belirlenmiştir. Kullanılan metot TÜBİTAK UME kalite sistemi gereklilikleri doğrultusunda geçerli kılınmıştır.

Sertifikalandırılan değere ait belirsizlik,  $u_{bb}$ ,  $u_{lts}$  ve  $u_{char}$  değerlerinin ağırlıksız istatistiksel ortalamasıdır. Kısa dönem kararlılık testlerinden elde edilen belirsizlik değeri ihmal edilebilir seviyede olduğundan hesaplamalarda ihmal edilmiştir. Birleştirilmiş ve genişletilmiş  $U_{CRM}$  aşağıda verilen formül kullanarak hesaplanmıştır.

$$U_{CRM} = k \cdot \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2}$$

**Tablo 14.** UME CRM 1308 için belirsizlik bileşenleri

Ölçülen Büyüklük	Belirsizlik Bileşeni [ng/g]			
	$u_{bb}$	$u_{lts}$	$u_{Char}$	$U_{CRM}$
Liyofilize serumda 25-hidroksi vitamin D <sub>2</sub> kütle kesri	0,52	1,19	0,59	2,86
Liyofilize serumda 25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub> kütle kesri	0,47	1,08	0,53	2,59

UME CRM 1308 serumda 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> için sertifikalandırılmış değer;

$$(49,97 \pm 2,86) \text{ ng/g } (k = 2, \text{ norm})$$

UME CRM 1308 serumda 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> için sertifikalandırılmış değer;

$$(48,76 \pm 2,59) \text{ ng/g } (k = 2, \text{ norm})$$

olarak raporlanmıştır.

UME CRM 1308'in sistematik tanımlaması "Sertifikalı Referans Malzeme (At Serumu; UME CRM 1308 – Liyofilize Serumda 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>)"tür. 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> derişimi (rekonstüte edilmiş)  $c = 49,97 \text{ ng/g}$  ( $U = 2,86 \text{ ng/g}$ ;  $k = 2$ ), 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> derişimi (rekonstüte edilmiş)  $c = 48,76 \text{ ng/g}$  ( $U = 2,59 \text{ ng/g}$ ;  $k = 2$ ),  $U$ ; SRM'nin kapsam faktörü,  $k=2$  kullanılarak genişletilmiş ölçüm belirsizliğidir.

**İZLENEBİLİRLİK**

TÜBİTAK UME tarafından gerçekleştirilen tüm UME CRM 1308 ölçümlerde NIST SRM 2972 “25-Hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> Calibration Solutions” ve NIST SRM 972a Level 3 “Vitamin D Metabolites in Frozen Human Serum” kullanılmıştır.

**DEĞİŞTİRİLEBİLİRLİK (COMMUTABILITY)**

Bu referans malzeme insan serumda 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>'ün LC-MS, LC-MS/MS ve HPLC-UV yöntemleri ile ölçümleri için metot performansının kontrolü ve metot geçerli kılma (validasyonu) amacıyla kullanım için üretilmiştir.

Malzemenin rutin *in vitro* teşhis immünolojik test yöntemleri ile değiştirilebilirliğini (commutability) gösteren çalışma yapılmamıştır. Kullanıcının UME CRM 1308'i rutin *in vitro* teşhis immünolojik test yöntemlerinde kalibratör olarak kullanabilmesi için malzemenin değiştirilebilir olduğunu gösteren çalışmayı yapması gerekmektedir.

**KULLANIM TALİMATI****Kullanım Amacı**

Bu malzeme serumda 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> tayininde kullanılan LC-MS, LC-MS/MS ve HPLC-UV metotlarının performansının kontrolü ve metot geçerli kılma çalışmalarında kullanım amacıyla üretilmiştir.

**Uygulama Kapsamı**

UME CRM 1308, insan serumunda LC-MS, LC-MS/MS ve HPLC-UV metotları ile 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>'ün derişimlerinin tayininde kullanıma uygundur.

UME CRM 1308 insan serumunda 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>'ün immünolojik test yöntemlerinin kalibrasyonu için kullanıma malzemenin değiştirilebilirliği (commutability) kullanıcı tarafından ispatlanmadığı takdirde uygun değildir.

**Güvenlik Uyarıları**

Ham madde: at serumu (kaynağı: Almanya) üretici (Biochrom) tarafından mikoplazma için test edilerek steril süzölmüştür (0,1µm). Bu malzeme 67/548/EEC direktifine göre tehlikeli malzeme olarak sınıflandırılmamaktadır. Toksikite testi yapılmamıştır. Genel laboratuvar güvenlik önlemleri geçerlidir. Malzeme yalnızca in-vitro kullanıma uygundur. Kullanım öncesi Güvenlik Bilgi Formu (GBF) okunmalıdır.

**Saklama koşulları**

Malzeme -20 °C ve altındaki sıcaklıklarda, kuru ve ışıksız bir ortamda saklanmalıdır. Sulandırılmış UME CRM 1308 doğrudan gün ışığına veya UV ışığına maruz bırakılmamalıdır. Kullanıcı buharlaşma veya süblimleşme ile su kaybına karşı önlem almalıdır. TÜBİTAK UME, müşteriye ait tesislerde

Sayfa 24 / 29	<b>TÜBİTAK</b> <b>ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ</b>	<b>UME CRM</b> <b>1308</b>
---------------	---	-------------------------------

depolanmaları sırasında özellikle kapakları açılmış olan referans malzemelerde meydana gelen değişikliklerden sorumlu tutulamaz.

### **Malzemenin Kullanıma Hazırlanması**

Tüm ünite içeriği, bir seferde aşağıda verilen protokol doğrultusunda deiyonize su ile çözülerek kullanılmalıdır:

- UME CRM 1308 ve eklenecek deiyonize su oda sıcaklığında olmalıdır ve ekleme öncesinde bir saat terazi ile aynı ortamda tutulmalıdır.
- Şişe açılmadan önce içeriğin dibe inmesi için şişe tabanı masa veya tezgâh üzerine nazikçe vurulur.
- Vidalı dış kapak açılır, şişe lastik iç tıpa ile birlikte teraziye yerleştirilir ve darası alınır. Şişe dik tutularak, lastik iç tıpa yukarıya doğru yavaşça çekilir. Tıpa hava olukları görünür olduğunda ünite içi basınç ile dış basıncın dengelenmesi için kısa bir süre beklenir ve tıpa nazikçe çıkarılır. Tıpa üzerine ve eldivene yapışma ve tezgâh üzerine dökülme gibi kayıpları önlemek için dikkatli olunmalıdır. 2 mL su, kalibre edilmiş bir pipet ile yavaşça üniteye temas ettirilmeden eklenir ve tıpa kapatılır.
- Su eklenip tıpası kapatılmış darası alınmış şişe tartılarak ağırlığı ( $m$ ) kaydedilir.
- TÜBİTAK UME'de analizi gerçekleştirilen ünitelere eklenen ortalama su miktarı aşağıda verilmiştir

$$m_{ort} = (1,9787 \pm 0,0200) \text{ g } (k = 2, \text{ norm})$$

Eğer  $m$ ,  $m_{ort}$ 'dan çok farklı ise analit derişimi için düzeltilmiş değer aşağıdaki şekilde hesaplanabilir:

$$\text{Düzeltilmiş analit derişimi} = \text{Sertifikalandırılmış değer} \times \frac{m_{ort}}{m}$$

Çözme ve homojenleştirme için şişe, tıpası ve kapağı kapalı şekilde nazikçe çalkalanmalı, tıpa yüzeyine yapışık malzeme mevcut ise çözünebilmesi için ünite alt üst pozisyona çevrilmeli, karışım içinde çözünmemiş katı malzeme kalıp kalmadığı kontrol edilmelidir. Görünür katı malzeme kalmayınca kadar karıştırma işlemine devam edilmelidir. Sulandırılarak kullanıma hazırlanmış malzeme mümkün olan en kısa süre içinde kullanılmalıdır. Sulandırılmış örneğin saklanması zorunlu olması durumunda, amaca uygun miktarlarda alt örnekler bölünerek -20 °C ve altındaki sıcaklıklarda saklanması uygundur. Alt örneklerin konulacağı kaplar, buharlaşma ve süblimleşme ile su kaybına neden olmayacak ve ışık geçirgenliği düşük olacak şekilde seçilmelidir.

### **En Az Örnek Alım Miktarı**

Çözülmüş malzeme için önerilen minimum örnek alım miktarı 400 µL'dir.



**Sertifika Değerinin Kullanımı**

Metot başarımının tespiti için ölçülen değerler, sertifikalandırılan değer ile kıyaslanabilir<sup>[13]</sup>. Kıyaslama yöntemi kısaca aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Ölçülen değerlerin ortalaması ile sertifikalandırılan değer arasındaki fark hesaplanır ( $\Delta_m$ ).
- Ölçüm belirsizliği ( $u_{meas}$ ) ile sertifikalandırılmış değer ( $u_{CRM}$ ) belirsizliği birleştirilir:

$$u_{\Delta} = \sqrt{u_{meas}^2 + u_{CRM}^2}$$

- Genişletilmiş ölçüm belirsizliği ( $U_{\Delta}$ ), standart ölçüm belirsizliğinin ( $u_{\Delta}$ ), normal dağılım için yaklaşık % 95 güvenilirlik seviyesini sağlayan  $k = 2$  kapsam faktörü ile çarpılarak belirlenir.

Eğer  $\Delta_m \leq U_{\Delta}$  ise, ölçülen büyüklük ile sertifika değeri arasında % 95 güvenilirlik seviyesinde anlamlı bir fark olmadığı sonucuna ulaşılır.

**TEŞEKKÜR**

Laboratuvarlar arası karşılaştırma çalışmasına katılım sağlayan laboratuvarlara verdikleri destek için teşekkür ederiz.

**KAYNAKLAR**

1. ISO Guide 34, General requirements for the competence of reference materials producers, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2009.
2. ISO/IEC Guide 98-3, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, (GUM 1995), International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2008.
3. Özkan B., Döneray H., *Çocuk sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 54(2011), 99.
4. Holick, M. F.; Chem, T. C.; AM. *Journal of Clinical Nutrition* (2008), 87.
5. Thorne J, Campbell MJ. *Proceedings of the Nutrition Society*. 67,2 (2008), 115.
6. Moreno J, Krishnan AV, Feldman D. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 97(1–2) (2005), 31.
7. Holt PR, Arber N, Halmos B, et al. *Cancer Epidemiology, Biomarkers, and Prevention*, 11(1) (2002); 113.
8. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. *Nature Reviews Cancer*, 7(9) (2007), 684.
9. TRaNS, sürüm 1-Tabakalı Rastgele Numune Seçim yazılımı, UME 2012.
10. Linsinger, T.P., Pauwels, J., Van der Veen, A.M.H., Schimmel H., Lamberty, A., *Accreditation and Quality Assurance*, 6 (2001), 20.
11. Lamberty, A., Schimmel, H., Pauwels, J. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 361 (1998), 395.

Sayfa 26 / 29	<b>TÜBİTAK</b> <b>ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ</b>	<b>UME CRM</b> <b>1308</b>
---------------	---	-------------------------------

- Linsinger, T.P., Pauwels, J., Lamberty, A., Schimmel, H., Van der Veen, A.M.H., Siekmann, L., *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 370 (2001), 183.
- Linsinger, T.P.J. ERM Application Note1, July 2005

## REVİZYON TARİHÇESİ

Tarih	Açıklama
05.03.2015	İlk yayın.
31.08.2016	Malzeme yeni bir karakterizasyon çalışması ile yeniden sertifikalandırıldı. "Değiştirilebilirlik" ve "Uygulama Kapsamı" bilgileri eklendi. Yoğunluk bilgisi eklendi, ng/mL biriminde hesaplanmış sertifikalandırılmış değerler ve belirsizlikleri ilave edildi.

## EK 1: ID-LC-MS Tekniğine ait Detaylar

Örnek 2 mL saf su ( $\geq 18 M\Omega$ ) ile çözülmüştür. Bu numuneden 400  $\mu$ L alınarak bir Eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra üzerine 500  $\mu$ L doymuş tuz çözeltisi ve 0,5 mg/L 25 hidroksi vitamin D<sub>2</sub>-d<sub>3</sub> (IS) ve 25 hidroksi vitamin D<sub>3</sub>-d<sub>3</sub> (IS) çözeltisinden sırasıyla 400  $\mu$ L ilave edilmiştir. 10 s süreyle vorteks ile karıştırmanın ardından örnek 4 dakika süre ile 12000xg ile santrifüj edilmiştir. Üst fazdan 200  $\mu$ L alınarak 200  $\mu$ L saf su ile seyreltilip, vorteks ile karıştırılmış ve bu karışımdan 100  $\mu$ L LC-MS sistemine enjekte edilmiştir.

**Tablo 15.** LC-MS Cihazı Özellikleri

Cihaz Adı	Üretici Firma	Model
HRMS	Thermo	Q Exactive Orbitrap
HPLC	Thermo	Ultimate 3000
HPLC column	Phenomenex	Luna PFP (150 mm x 2 mm i.d., 5.0 $\mu$ m)

**Tablo 16.** LC Parametreleri

Değişken	Değeri
Kolon Sıcaklığı	30° C
Mobil Faz	Metanol:Su (% 0,1 Formik asit) (82:18)
Akış Hızı	0,35 mL/min, İzokratik

**Tablo 20.** MS Tarama Parametreleri

Analit	Alıkonma Zamanı [dakika]	MH+
25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub>	7,64	383,3302
25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub> -d <sub>3</sub>	7,64	386,3486
25-hidroksi vitamin D <sub>2</sub>	8,33	395,3302
25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub> -d <sub>3</sub>	8,33	398,3484

**Tablo 21.** MS Parametreleri

Parametre	Değer
Ionization Mode	APCI +
Sheath Gas Flow Rate	35
Aux Gas Flow	10
Sweep Gas	0
Discharge Current (µA)	5

## EK 2: ID-LC-MS/MS Tekniğine ait Detaylar

Örnek 2 mL saf su ( $\geq 18$  M $\Omega$ ) ile çözülmüştür. Bu numuneden 400 µL alınarak bir Eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra üzerine 500 µL doymuş tuz çözeltisi ve 0,5 mg/L, 26,26,26,27,27,27, 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>-d<sub>6</sub> (IS) 400 µL çözeltilerinden sırasıyla ilave edilmiştir. 10 s süreyle vorteks ile karıştırmanın ardından örnek 4 dakika süre ile 12000xg ile santrifüj edilmiştir. Üst fazdan 200 µL alınarak 200 µL saf su ile seyreltilip, vorteks ile karıştırılmış ve bu karışımdan 100 µL LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir.

**Tablo 22.** LC-MS/MS Cihazı Özellikleri

Bileşen Adı	Üretici	Model
Triple Quadrupole LC-MS/MS	ZIVAK Technologies®	Tandem Gold
Dual HPLC pump	ZIVAK Technologies®	Tandem Gold
HPLC column	Phenomenex	Luna PFP (150 mm x 2 mm i.d., 5.0 µm)
Degasser	ZIVAK Technologies®	Tandem Gold
Autosampler	ZIVAK Technologies®	Tandem Gold

**Tablo 23. LC Parametreleri**

İsim	Değer
Kolon Sıcaklığı	Oda Sıcaklığı
Mobil Faz	Metanol: Su (0,1% Formik asit) (82:18)
Akış Hızı	0,35 mL/dak, İzokratik

**Table 24. MS/MS Tarama Parametreleri**

Analit	Alıkonma Zamanı [dakika]	MH+	MS/MS	CE [V]	Dwell [s]
25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub>	7,09	383,2	257,1	16	0,075
25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub> -d <sub>6</sub>	7,09	389,3	263,1	16	0,075
25-hidroksi vitamin D <sub>2</sub>	7,78	395,3	269,0	18	0,075

**Tablo 25. MS/MS Parametreleri**

Parametre	Değer
Ionization Mode	APCI +
API Nebulizer Gas Pressure	50 psi
Dryer Gas Temperature, Pressure	300 °C, 20 psi
Vaporizer Gas Temperature, Pressure	350 °C, 12 psi
Scan Time	0.450 s
Shield Voltage	+ 600 V
Corona Voltage	10 V
Capillary Voltage	60 V
Detector	+ 1600 V
Collision Gas Pressure	2.25 mTorr
Chamber Temperature	65 °C
Mass Peak width	1.5 amu
Quad 1	1,5 amu
Quad 3	1,5 amu

### EK 3: HPLC-UV Tekniğine ait Detaylar

Çözünmüş örnekten 400 µL tartılarak Eppendorf tüpe alındı. Üzerine 500 µL doymuş tuz ve 400 µL dodecanophenone (IS) çözeltileri tartılarak eklendi. 10 s süre ile vorteksle karıştırılan örnek 12000xg, 4 dakika süre ile ortam sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 200 µL üst faz enjeksiyon vialine alındı ve 50 µL'si HPLC UV sistemine enjekte edildi.

**Tablo 26.** HPLC-UV Cihazı Özellikleri

Cihaz Adı	Üretici Firma	Model
Dedektör	Thermo	FINNIGAN® Surveyor
Örnekleyici	Thermo	FINNIGAN® Surveyor
Pompa	Thermo	FINNIGAN® Surveyor
Kolon	ZIVAK Technologies®	Vitamin D2/D3 (100 mm x 3 mm, 5,0 µm)

**Tablo 27.** HPLC Oto örnekleyici Şartları

Oto Örnekleyici Sıcaklığı	4 °C
Enjeksiyon Hacmi	50 µL
Enjeksiyon Haznesi Hacmi	100 µL

**Tablo 28.** LC Parametreleri

Kolon Sıcaklığı	Oda Sıcaklığı
Mobil Faz	Metanol:Asetonitril (70:30)
Dalga Boyu	264 nm
Akış Hızı	1 (mL/min), İzokratik

### EK 4: Laboratuvarlar Arası Ortak Çalışma Sonuçları

**Tablo 29.** Laboratuvarlar arası çalışmada LC-MS veya LC-MS/MS ile raporlanan ölçüm sonuçları

Laboratuvar Kodu	Değer [ng/g]	
	25-hidroksi vitamin D <sub>2</sub>	25-hidroksi vitamin D <sub>3</sub>
1	47,42	46,29
1	49,85	47,75
2	49,42	46,94
2	50,76	46,87
3	46,38	44,14
4	51,93	49,97
4	49,56	47,08
<b>Ortalama</b>	<b>49,33</b>	<b>47,01</b>