

# Sıvı Kromatografi-Ardışık Kütle Spektrometresi ile Vitamin D Analizinde Örnek Stabilitesi

## Sample Stability in Vitamin D Analysis by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Evren Akgöl\*      Sedat Abuşoğlu\*\*      Hüseyin Tuğrul Çelik\*\*\*      Cevdet Züngün\*\*\*\*  
Sevilay Sezer\*\*\*\*      Turan Turhan\*\*\*\*\*      Muhittin Serdar\*\*\*\*\*      Metin Yıldırım\*\*\*\*

- \* Birecik Devlet Hastanesi, Biyokimya Bölümü, Urfa  
\*\* Selçuk Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya  
\*\*\* Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara  
\*\*\*\* Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Bölümü, Ankara  
\*\*\*\*\* Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA), Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara  
\*\*\*\*\* Ankalab Laboratuvarı, Biyokimya Bölümü, Ankara

**Başvuru Tarihi:** 07.06.2013

**Kabul Tarihi:** 31.07.2013

### ÖZET

**Amaç:** Vitamin D, hücre büyümesinde, bağışıklık sisteminde ve metabolizmada çeşitli işlevlere sahiptir. Vitamin D eksikliği, rikets ile ilişkili olup bunun yanında immun sistem hastalıkları, kanser, kalp krizi (MI), diyabet ve bulaşıcı hastalıkların riskini artırmaktadır. Bu çalışmanın amacı, analiz edilmek üzere alınan plazma örneğine ait saklama şartlarının sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile tayin edilen vitamin D testi üzerine etkilerini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi (A.N.E.A.H) polikliniklerine başvuran hastalardan rastgele alınan kan örnekleri K2-EDTA içeren tüplere (n=35) konulup 30 dakika içerisinde santrifüj edildikten sonra plazmaları üç porsiyona ayrıldı. Çalışma için üç grup oluşturuldu. Grup 1 oda sıcaklığında saklanan 35 örnek, grup 2 buzdolabında 2-8°C'de saklanan 35 örnek ve grup 3, -80°C'de dondurulmuş halde saklanan 35 örnek olarak ayrılıp vitamin D analizleri bir gün sonra sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi ile Ankalab Laboratuvarında gerçekleştirildi.

**Bulgular:** Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versiyon 15 ile Wilcoxon testi kullanılarak yapılan istatistiksel analizde Grup 3'e ait vitamin D değerleri Grup 1 ve 2 ye kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunurken (her ikisi için  $p < 0.001$ ) Grup 1 ve 2'nin Vitamin D değerleri arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ( $p = 0.051$ ).

**Sonuç:** Buna göre sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi ile gerçekleştirilen vitamin D analizlerinde aynı gün içerisinde çalışma yapılmayacaksa plazma örneklerinin analizin gerçekleştirileceği zamana dek dondurulması elde edilen sonuçlar açısından daha anlamlı olacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Vitamin D; ardışık kütle spektrometresi

## ABSTRACT

**Objective:** Vitamin D has several functions in cell growth, immunity, and metabolism. Vitamin D deficiency has been associated with rickets. In deficient states, there is a higher risk for autoimmune diseases, cancers, myocardial infarction, diabetes, and infectious diseases. The aim of the present study was to investigate the effect of storage conditions for vitamin D analysis by liquid-chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

**Materials and Methods:** Blood samples (n=35) were randomly obtained on K2-EDTA containing tubes from the subjects referred to Ankara Numune Training and Education hospital polyclinics. Plasma was obtained by centrifugation and three aliquots were stored. According to the study design, three different groups were constituted. Group 1 consisted of plasma samples stored at room temperature (n=35), Group 2 consisted of plasma samples stored at 2-8°C (n=35) and group 3 consisted of plasma samples stored at -80°C (n=35). Vitamin D analysis was performed by liquid-chromatography tandem mass spectrometry at Ankalab Laboratory on the next day.

**Results:** Statistical analysis was performed by Wilcoxon test with SPSS v15. Group 3 vitamin D results were significantly higher than both Group 1 and 2 (for both  $p < 0.001$ ). There was no statistically difference between Group 1 and 2 vitamin D results ( $p = 0.051$ ).

**Conclusion:** According to these results, if the plasma samples are not to be analyzed on the same day, vitamin D analysis by liquid-chromatography tandem mass spectrometry will be more reliable by freezing plasma samples immediately after centrifugation.

**Key Words:** Vitamin D; tandem mass spectrometry

## GİRİŞ

Vitamin D, kalsiyum ve fosfor metabolizması ile ilişkili olan lipid yapıda bir vitamindir (1). Vitamin D'nin iki ana şekli hayvani kaynaklardan gelen kolekalsiferol (vitamin D<sub>3</sub>) ve bitkisel kaynaklardan gelen ergokalsiferol (vitamin D<sub>2</sub>) dür. Kolekalsiferol, temel olarak deride, morötesi (Ultraviyole (UV)) ışığın etkisi ile (295-315 nm) dalga boyunda üretilir.

Vitamin D, dolaşımında bağlayıcı proteine bağlanır ve 25-hidroksi şekline dönüştürüldüğü karaciğere taşınır. 25-OH vitamin D<sub>3</sub>'nin %85'i vitamin D bağlayıcı proteine, %15'i albumine bağlı olup %0.03'ü serbest şekildedir. Temel vitamin D formundan farklı olarak 25-OH vitamin D, depo şekli olup besinlere bağlı durumun değerlendirilmesinde bir belirteç olarak kabul edilmektedir (2).

Vitamin D eksikliği yetişkinlerde osteoporoz ve osteomalazi, çocuklarda rikets ile ilişkilidir (1). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, vitamin D'nin tip 1 diyabet, kan basıncı yüksekliği ve bazı kanserlerin önlenmesindeki rolünü ortaya koymuştur (2).

Genel toplum kesiminin %30-50'sinde vitamin D eksikliği tespit edilmiştir (3). 12 ng/mL

altındaki serum vitamin D değerleri eksiklik, 32 ng/mL'nin altındaki vitamin D değerleri ise yetersizlik olarak bildirilmektedir (4). Vitamin D ölçümlerinin doğru olarak yapılması klinik açıdan önem taşımaktadır.

İnsan serumunda 25-OH vitamin D<sub>3</sub>'ün dayanıklılığına ilişkin laboratuvar şartlarında yapılmış çok az sayıda çalışma bulunmakta olup genellikle don-çöz işleminin etkisini inceleyen çalışmalar mevcuttur (5).

Vitamin D analizlerinde sıvı kromatografi ardışık kütle spektrometresi yöntemi kesin sonuçlar veren bir teknik olup bu yöntem ile yapılan ölçümlerde sıcaklık gibi analiz öncesi bir değişkenin analiz sonuçlarına etkisi net olarak bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı klinik laboratuvarlarda sıcaklık değişkeninin LC-MS/MS yöntemi ile 25-OH vitamin D<sub>3</sub> analiz sonuçlarına etkisini araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Kullanılan Malzemeler ve Çözeltiler

Metanol (HPLC Grade, Merck, Katalog No: 26301108-914 Almanya), Asetonitril (gas chromatography SupraSolv® Merck Katalog No: 1000172500, Almanya), 25-OH vitamin

D<sub>3</sub> (≥98.0% (HPLC) Sigma Katalog No: H4014, Almanya), (2H6)- 25-OH vitamin D<sub>3</sub> (Medical Isotopes Katalog No: D21706, A.B.D), 25-OH vitamin D<sub>2</sub> (≥98.0% (HPLC) Sigma Katalog No: 17937, Almanya), Formik Asit (98-100% Suprapur® Merck Katalog No: 1116701000, Almanya), Phenomenex Luna C8 50 x 2.1 mm (5 µm) kolon (HPLC Brand Katalog No: 00A-4040-B0 A.B.D).

### Vakaların Seçimi

Bu çalışmaya, 2011 Ekim-2011 Aralık tarihleri arasında Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinin çeşitli polikliniklerine başvuran hastalardan rastgele 35 hasta dahil edilmiştir. Bu hastalardan K<sub>2</sub>-EDTA içeren 3 ayrı tüpe kan alındı. Çalışma için 3 ayrı grup belirlendi.

Grup 1: Oda sıcaklığında bekletilmiş örnekler (n=35)

Grup 2: Buzdolabında 2-8°C'de bekletilen örnekler (n=35)

Grup 3: -80°C'de dondurulmuş örnekler (n=35)

### Örnek hazırlanması

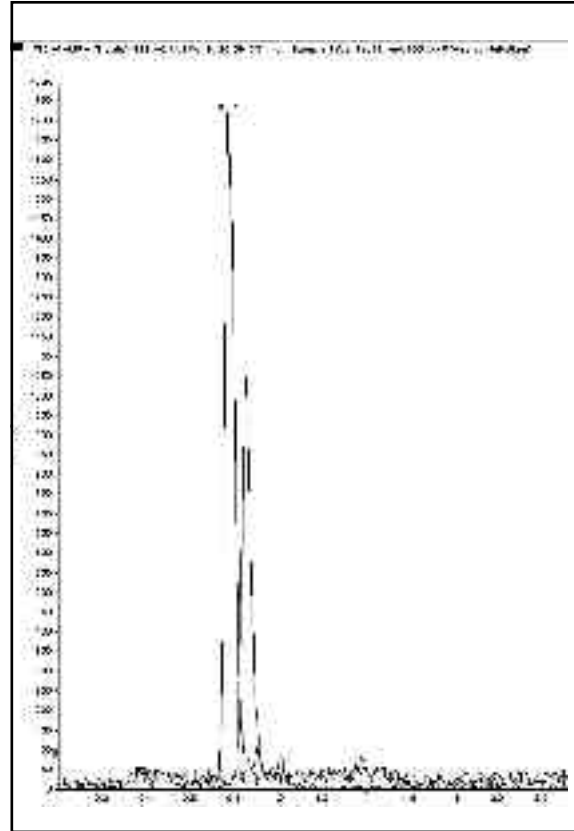
Kan örnekleri alındıktan hemen sonra alüminyum folyo ile sarılıp 4000 devirde 10 dakika santrifüj işlemi sonrası plazma örnekleri ayrıldı. Bu ayırma işlemi 30 dakika içerisinde tamamlanmış olup gruplarda belirtilen şartlara uygun olarak analiz zamanına kadar (bir gün sonra) saklama işlemi gerçekleştirildi. Etik kurul onayı, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulundan 14.09.2011 başvuru tarih ve 236-2011 sıra numarası ile alındı.

### Sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi

25-OH vitamin D<sub>3</sub> analizi, Ankalab Laboratuvarlarında Sahillioğlu ve ark. bildirdiği yöntemle yapılmıştır (6). Kısaca, ABSCIEX marka API 3200 üçlükuadropol kütle spektrometresi (A.B.D) cihazında 5kV voltajında

ve 300°C sıcaklığında çalışan "atmospheric pressure chemical ionisation" (APCI) kaynaklı bir pozitif durum kullanıldı. Sprey gaz basıncı=60, Kurutucu gaz basıncı=0, "Declustering Potential" (DP)=40, "Collision Energy" (CE)=50, "Collision Cell Exit Potential" (CXP)=4, "Nebulizer Current" (NC)=5, "Collisionally Activated Dissociation" (CAD)=5, "Curtain Gas"=10, "Dwell time"=400 ms olarak ayarlandı. Analizi yapılacak maddelerin tesbiti için "multiple reaction monitoring" (MRM) durumu kullanıldı ve pikler elde edildi (Şekil 1).

Her madde için bir MRM geçişi ve iç standart izlendi. 25-OH vitamin D<sub>3</sub> için m/z 383.4/211,1; 25-OH vitamin D<sub>2</sub> için 395.4/209,1; (2H6)- 25-OH vitamin D<sub>3</sub> için 407.2/389,4 MRM durumu kullanıldı. Ayırma işlemi için Shimadzu Prominence SIL LC-20 (Japonya) marka kromatografi ünitesi ve



Şekil 1. Bir hasta serumunda elde edilen kromatogramlar (Solda 25-OH Vitamin D<sub>3</sub>, sağda 25-OH Vitamin D<sub>2</sub>).

2.1 mm ve 50 mm uzunluğunda 5 µm çapında Phenomenex Luna marka C8 ters faz kolonu kullanıldı. Hareketli faz için iki farklı yıkama çözeltisi kullanıldı. Hareketli faz A olarak su ve hareketli faz B olarak ise içerisinde %1 oranında formik asit eklenmiş asetonitril kullanıldı. Akış hızı 300 µL/dakika ve her numune için 50 µL örnek sisteme verildi. Analizi yapılmak istenen maddeleri kolondan yıkamak için metanol aşamalı değişimi kullanıldı. İlk 3 dakika hareketli fazın %70'i A'dan %30'u B'den gidecek şekilde ayarlandı. Bu akış şeması, 25-hidroksi metabolitlerinin kolonda tutulması için yapıldı. 1 dakika içerisinde hareketli faz A'nın derişimi %95'e çıkartıldı ve 1 dakika boyunca bu derişim sabit tutuldu. Sonraki 2 dakikada ise tekrardan hareketli fazın %70'i A'dan %30'u B'den gidecek şekilde ayarlandı. Her örnek için toplam çalışma zamanı 4 dakika idi. Örnekleri hazırlamak için ilk olarak ependorflara 200 µL serum (kalibratör, kontrol ve hasta serumu) ve 75 µL iç standart konulur. Daha sonra üzerlerine 1000 µL asetonitril (ACN) ilave edildi ve numuneler 30 saniye karıştırıldıktan sonra +4°C'de 10 dakika bekletildi. Bekleme işleminin ardından tüpler 13000 devirde 5 dakika çevrildi. Tüplerin üzerinde kalan sıvı kısım borosilikat tüplere aktarıldı ve azot gazı altında uçuruldu. Daha sonra örnekler 100 µL %50'lik ACN ile çözüldü ve numuneler 15 saniye karıştırıldı. Tüpteki örneklerin tamamı "insert"lere aktarıldı ve bu "vial" lere konularak cihaza analiz için verildi.

Sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometrisi ile 25-OH vitamin D<sub>3</sub> ölçümünde doğruluk 240 ng/mL için %100, 7.5 ng/mL için %94 olarak, gün-içi kesinlik %5, günler arası kesinlik %6,7 ng/mL; geri elde %94-98 civarında olup hemoliz ve lipemi girişimine rastlanmamıştır.

Çalışmanın sonuçları Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v 13 programında kutu grafiği ile gösterilmiştir.

## BULGULAR

Üç gruba ait 25-OH vitamin D<sub>3</sub> sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 1' de verilmiştir.

**Tablo 1.** Gruplara ait ortalama 25- OH vitamin D<sub>3</sub> sonuçları.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Ortalama (±SD) (µg/L)	10.1(±2.15)	6.87(±2.89)	28.6(±3.16)
% Fark	64.6	75.9	0

% Fark D eğeri -80°C'de saklanan örnekler baz alınarak hesaplanmıştır.

Grup 1: Oda sıcaklığında bekletilmiş örnekler (n=35)

Grup 2: Buzdolabında 2-8°C' de bekletilen örnekler (n=35)

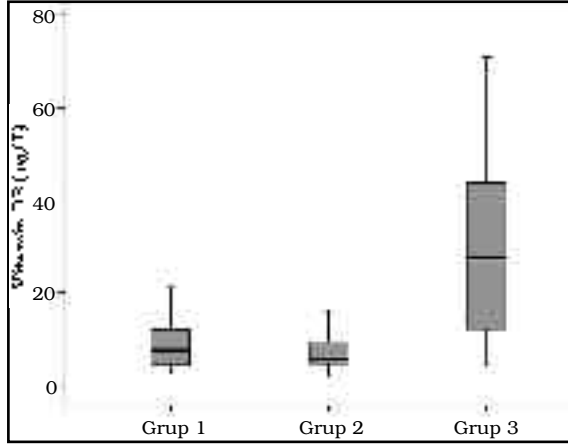
Grup 3 :- 80°C' de dondurulmuş örnekler (n=35)

Gruplara ait ölçülen değerler grafik halinde Şekil-2' de verilmiştir.



**Şekil 2.** Gruplar arasında 25-OH vitamin D<sub>3</sub> değerlerinin çubuk grafiği.

SPSS v 15 ile Wilcoxon testi kullanılarak yapılan istatistiksel analizde Grup 3'e ait vitamin D değerleri Grup 1 ve 2 ye kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunurken (her ikisi için p<0.001) Grup 1 ve 2'ye ait Vitamin D değerleri arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir (p=0.051) (Şekil 3).



**Şekil 3.** Gruplar arasında vitamin D<sub>3</sub> düzeylerine ilişkin box-plot grafiği.

### TARTIŞMA

İnsan kanında 25-OH vitamin D<sub>3</sub>'ün analiz öncesindeki aşamada dayanıklılığı ile ilgili bilgi bulmak zordur. Tıbbi laboratuvar örnek alım önermeleri, örneğin dondurulması, suni ışıktan ve tekrarlayan don-çöz işlemlerinden uzak tutulmasını istemektedirler. Öte yandan besin endüstrisi, vitamin D<sub>3</sub>'ün yağ ve süt gibi doğal kaynaklardaki dayanıklılığının çok yüksek olduğunu bildirmektedirler. Wielders ve ark. 8 farklı kan örneğini 6°C'de ve oda sıcaklığında ışıktan koruyarak bekletmişler, oda sıcaklığında suni ışığa maruz bırakmışlar ve 4 kez don-çöz işlemi gerçekleştirerek antikor temelli yöntem ile analiz yapan ticari kit (Roche Cobas E601 25-OH vitamin D<sub>3</sub>) ile 25-OH vitamin D<sub>3</sub> düzeylerini ölçmüşlerdir (7).

Bu çalışmada vitamin D<sub>3</sub> ölçümü için alınan serum örneğinin 4°C de 7 güne kadar saklanabileceğini ve 4 kez don-çöz işlemine kadar düzeylerinin değişmeyeceğini rapor etmişlerdir. Bu antikor temelli yöntem ile yapılan çalışma sonucu oda sıcaklığında D vitamini dayanıklılığını "kaya gibi sağlam" ifadesiyle editöre mektup şeklinde bildirmişlerdir (7).

Remijn ve ark. yaptığı bir çalışma da ise tek bir bireyden 200 mL kan alınmış, serum ayrılıp -20°C de saklanmış, 5 kez don-çöz işlemi yapılmış, suni ve UV ışığa maruz bırakılmış, dolapta ve oda sıcaklığında bekle-

tilmiş ve total 25-OH vitamin D düzeyleri (25-OH vitamin D<sub>3</sub> ve D<sub>2</sub>) kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Oda sıcaklığında ve buzdolabında ışıktan korunarak saklanan örneklerin vitamin D düzeylerinin değişmediği, doğrudan güneş ışığına maruz bırakmanın ise değerleri düşürdüğünü bildirmişlerdir (8).

Bizim çalışmamızda da grup 1 ve 2'deki numuneler oda sıcaklığında ve buzdolabında saklanmış ve 2-8°C'de örneklerin muhafaza edilmesinin oda sıcaklığında saklama koşuluna göre istatistiksel olarak bir farklılık ortaya koymadığı anlaşılmıştır (p=0.051).

Bağlayıcı yöntem ile vitamin D<sub>3</sub> düzeylerini ölçüldüğü diğer bir çalışmada 11 kez don-çöz işlemi yapılmış olup ölçüm sonuçlarında ciddi bir değişim olmadığı rapor edilmiştir (5).

Drammeh ve ark. yaptığı diğer bir çalışmada ise 35 adet tam kan örneği, serum örneği ayrılmadan 3 gün 32°C'de ve kan alındıktan 2 saat içinde serumu ayrılacak şekilde saklanmıştır. Bu örneklerden biyokimyasal parametreler çalışılmıştır. Vitamin D düzeyleri, "Radyoimmunanaliz (RIA)" ile tayin edilmiştir. Serumun ayrılıp 7 gün dondurulmaması vitamin D değerlerinde %7 oranında artışa yol açmıştır (9).

Bu çalışmada örnek alımını takiben örneği -80°C'de dondurmak düzeylerin korunması için gerekli olarak bulunmuştur.

Vitamin D ile ilgili uzman görüşleri, örnek alınmasını takiben özütleme işlemi gerçekleştirilmediği takdirde vitamin D'nin tam kan halinde proteinlere bağlı kaldığını ve dayanıklılığını koruduğu yönündedir (10).

Vitamin D, 9-10 numaralı karbonlarla gösterilen bir sekosteroid vitamin yapısındadır. Vitamin D<sub>2</sub> formu, bitki sterolü olan ergosterolden köken alan 28 karbonlu bir molekül yapısına sahip olup Vitamin D<sub>3</sub> kolesterolden oluşan 27 karbonlu yapıdadır. Vitamin D<sub>2</sub>, ekstra metil grubu ve 22. ve 23. karbon

arasında çift bağ içermesi ile yapısal olarak Vitamin D<sub>3</sub>'ten ayrılır. Vitamin D kimyasal yapısının merkezinde cis-triene yapısı yer alır. Vitamin D'ye ait bu eşsiz yapı molekülün; UV ışınları, sıcaklık artışı ve serbest radikaller gibi çeşitli dış etkenler ile oksidasyona duyarlı hale gelmesine yol açmaktadır (11). 25. karbona ait yan zincirlerde hidrosilasyon ve halka yapısındaki 1. karbondaki değişim sonucu Vitamin D'nin aktivasyonu gerçekleşirken 23, 24, 26 numaralı karbon atomlarında oluşan bir seri oksidatif reaksiyonlar sonucunda, Vitamin D metabolik aktivitesini kaybedip farklı sterol türevlerine dönüşmektedir. Bu çalışmada Grup 1 ve 2 deki düşük olarak ölçülen sonuçların nedeni bu moleküler yapının bozulması olabilir (12). Örneklerin -80°C dışında, oda sıcaklığı veya 2-8°C'de saklanması, steroid yapının halkasal özelliğinin değişerek farklı sterol türevlerine dönüşmesi ve analizi yapılmak istenen maddenin kütlesinin değişmesi sonucu LC-MS/MS sisteminde saptanamaması ile sonuçlanabilir.

Bu çalışmada bulunan sonuca göre vitamin D analizlerinde dayanıklılığın sağlanması için alınan numunenin uygun işlemlerden sonra dondurulması gereklidir.

D vitamini analizinde ideal ölçüm şartların sağlanması için analizin her safhasında ölçüm sonuçlarını etkileyen değişkenlerin saptanması ve daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

### **Teşekkür**

Bu çalışma Ankara Ankalab Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

### **KAYNAKLAR**

1. Kushnir M, Ray J, Rockwood A, Roberts W, Sonia L, JoDell E, Whittington et al. Rapid Analysis of 25-Hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Association of Vitamin D and Parathyroid Hormone Concentrations in Healthy Adults. *Am J Clin Pathol* 2010; 134 (1):148-56.

2. Hollis BW. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(2): 507-10.
3. Hekimsoy Z, Dinç G, Kafesçiler S, Onur E, Güvenç Y, Pala T, et al. Vitamin D status among adults in the Aegean region of Turkey. *BMC Public Health* 2010; 10: 782.
4. Christina V. Oleson MD, Payal H, Wuermsler L. Influence of Season, Ethnicity, and Chronicity on Vitamin D Deficiency in Traumatic Spinal Cord Injury. *J Spinal Cord Med* 2009; 33(3): 202-13.
5. Lissner D, Mason RS, Posen S. Stability of vitamin D metabolites in human blood serum and plasma. *Clin Chem* 1981; 27(5): 773-4.
6. Sahillioğlu B, Serdar M, Erkal N, Erden G, Bakir F, Yıldırımkkaya MM et al. 25-OH-Vitamin D Hormon için Tandem Kütle Spektrometrede Yöntem Geçerli Kılma Çalışması ve Bu Yöntemin Farklı Yöntemlerle Karşılaştırılması. *Turk J Biochem* 2011; 36 (1): 73-9.
7. Jos P, M. Wielders, Ferdinand A. Wijnberg. Preanalytical Stability of 25(OH)-Vitamin D<sub>3</sub> in Human Blood or Serum at Room Temperature: Solid as a Rock. *Clinical Chemistry* 2009; 55(8): 1584-5.
8. Remijn J, Lucas S, Bertil Wildeboer Jeroen DE. van Suijlen Henk, Adriaansen J. Serum 25-OH Vitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> are Stable under Exaggerated Conditions. *Clinical Chemistry* 2008; 54(11): 1931-2.
9. Drammeh BS, Schleicher RL, Pfeiffer CM, Jain RB, Zhang M, Nguyen PH. Effects of Delayed Sample Processing and Freezing on Serum Concentrations of Selected Nutritional Indicators. *Clinical Chemistry* 2008; 54(11): 1883-91.
10. Rosemary L. Schleicher, John Eisman, Roger Bouillon, Ravinder J. Singh, Michael F. Holick Clinical Applications for Vitamin D Assays: What Is Known and What Is Wished for. *Clinical Chemistry* 2011; 57(9): 1227-32
11. Armas LAG, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D<sub>2</sub> is much less effective than vitamin D<sub>3</sub> in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; (89): 53 87-91.
12. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin endocrine system. *Endocrine Rev* 1995; (16): 200-57.

### **Yazışma adresi:**

Dr. Evren Akgöl  
Birecik Devlet Hastanesi, Birecik/Şanlıurfa  
Tel : +90 232 243 43 43  
Fax : +902322431530  
GSM : 0 505 765 67 75  
E-posta: akgolevren@yahoo.com