

Farklı Sabunlaştırma Yöntemleri Kullanarak Kan Serumunda ve Sütte Karotin ve Vitamin A Tayini Üzerinde Çalışmalar *

Nurhayat ATASOY¹Hayati ÇAMAŞ²

Özet

Bu çalışmada, soğuk ve sıcak sabunlaştırma yöntemleri kullanılarak kan serumunda ve sütte vitamin A ile total karotinlerin miktarları tayin edildi.

Yirmi koyundan alınan kan serumunda, sabunlaştırma işlemi uygulanmaksızın yapılan tayinde ortalama vitamin A değeri $37.92 \pm 2.31 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, total karotin değeri $51.57 \pm 2.49 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$; soğuk sabunlaştırmada vitamin A $37.31 \pm 2.39 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, total karotin $50.91 \pm 2.59 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$; sıcak sabunlaştırmada ise vitamin A $37.87 \pm 2.28 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, total karotin de $51.06 \pm 2.59 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ olarak bulundu.

Sütteki değerler ise 20 inek sütünün analizi sonunda ortalama vitamin A değerleri soğuk sabunlaştırma ile $54.09 \pm 5.20 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, sıcak sabunlaştırma ile $54.15 \pm 5.17 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$; total karotin değerleri de soğuk sabunlaştırmada $71.87 \pm 6.71 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, sıcak sabunlaştırmada $71.89 \pm 6.72 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ olarak tesbit edildi.

Yapılan istatistikî hesaplamalar sonunda değişik işlemlerle elde edilen değerler arasında herhangi bir fark bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: Vitamin A, Total karotin, Sıcak sabunlaştırma, Soğuk sabunlaştırma, Süt ve serum.

Summary

Studies on Vitamin A and Carotene Levels in Blood Serum and Milk by Using Different Saponification Methods

In this study, by using cold and hot Saponification methods, the amounts of vitamin A and the total carotene in blood serum and milk has been determined.

The total vitamin A value in blood serums taken from 20 sheep, without using saponification method, was $37.92 \pm 2.31 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, the total carotene value was $51.57 \pm 2.49 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$; the vitamin A value in cold saponification was $37.31 \pm 2.39 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, the total carotene value was $50.91 \pm 2.59 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$; as to the hot saponification, the vitamin A value was $37.87 \pm 2.28 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, and the total carotene was $51.06 \pm 2.59 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

As to the values in milk; the average vitamin A values in milk taken from 20 cows, was $54.09 \pm 5.20 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ in cold saponification, was $54.15 \pm 5.17 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ in hot saponification, the total carotene values was $71.87 \pm 6.71 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ in cold saponification, was $71.89 \pm 6.72 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ in hot saponification.

There were not found any statistically difference between values.

Key Words: Vitamin A, Total carotene, Cold saponification, Hot saponification, Milk and serum

Giriş

Çağımız modern yaşam biçiminin getirdiği bir değişim içindedir. Bu değişimin etkileri sağlıkta ve sağlığın ayrılmaz bir parçası olan beslenmede de görülmektedir. Bir taraftan gelişen teknoloji, laboratuvar olanakları, yeni durumların belirlenmesini gerçekleştirirken, öte yandan hızlı yaşam nedeniyle uygulamalar ve alışkanlıkların değişmesi beslenmede

yeni sorunlar ortaya çıkarmaktadır.

Vitaminler vucuttaki büyüme-gelişme ve enerji harcama olaylarını düzenleyen, yeni dokuların yapımı

için şart olan maddelerdir (1). Ülkemiz, en önemli proteini ve vitaminleri sağlayan değişik hayvan gruplarına sahiptir. Böyle olmasına rağmen hayvan yetiştiriciliğinde yeterli bilgiye sahip olunmadığı için

* Bu çalışma Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

¹ Y.Y.Ü., Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, VAN.

² K.A.Ü., Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KARS.

bakım ve beslemede aksaklıklar ortaya çıkmaktadır. Sonuçta vitamin eksikliği hayvanlarda açıkça gözlenmekte ve bu durum onların et ve sütlerine olumsuz yönde yansımaktadır. Hayvanların aldıkları besin maddelerine göre verimlerinde farklı özellikler belirir. Nitekim tereyağında A vitamininin ve karotinin fazla oluşuna göre yağın rengi değişik olur. Karotin fazlalığının yağı sarı renge, A vitamini fazlalığının ise yağı beyaz renge dönüştürdüğü bariz olarak görülür. Vitamin A yağda çözünebilir ve 4 isopren molekülünden kurulmuş çok sayıda doymamış bağa sahip bir alkoldür. Amprik formülü $C_{20}H_{30}O$, molekül ağırlığı 286.46'dır (2).

Vitamin A'nın retinol, retinal ve retinoik asit olmak üzere üç biyolojik aktif şeklinde oluştuğu bildirilmektedir (3). A vitamini bileşiklerinin hepsi bir trimetilsikloheksinil grup ve dört çift bağlar ile alltrans polien zinciri ihtiva ederler (4).

A vitamini sadece insan ve hayvanlarda bulunur (3, 5). İnsan ve hayvanların besini olan bitkilerdeki provitaminler barsak yolu ile kana geçer ve oradan da karaciğere gider. Burada karotiniz enzimini yardımıyla aktifleşip vitamin A olur (2). Bitkisel gıdalarda bulunan vitamin A biyolojik olarak aktif değildir (6). Bitkisel kaynaklı besinler, vitamin A'nın provitamini olan β -karotin, hayvansal kaynaklılar ise vitaminin uzun zincirli yağ asitleri ile verdiği retinil esterlerini içerirler (7).

Büyüyen ve gelişen hayvanlarda hücreler farklılaşma yeteneklerini korurlar ve birden fazla yöne doğru farklılık gösterirler. Farklılaşma üzerine vitamin A etkisinin genel bir gözlemi, vitaminin büyük çoğunlukla hareketini bipotansiyel hücreler üzerine yoğunlaştırmış olmasıdır. Vitamin A eksikliğinin hücresel düzeydeki etkileri, gastro-intestinal bölge, üriner bölge, solunum ve ağız bölgesi epiteli olarak hızla farklılaşan dokularda görülür (8, 9, 10, 11).

Ayrıca vitamin A'nın farklılaşma üzerine olan etkisi, kemik ve dişlerin gelişimi (12, 13) ve embriyonal gelişimdeki etkileri, spermatogenesis'in korunması (14, 15) olarak açıklanmıştır. Dünyada ve ülkemizde farklı yıllarda, değişik yöre ve gruplarda yapılan araştırmalar, çeşitli nedenlerden organizmanın alması gereken günlük besin maddelerinin daha az miktarda alındığını göstermektedir. Türkiye'de 1974 yılının Kasım-Temmuz aylarında beslenme konusunda yapılan araştırmanın sonuçları, vitaminlerin tüketiminin yeterli olmadığını göstermiştir. Egemen (1) 'in araştırmalarına göre halkın % 3.3'ü günde 3000-4000 İÜ vitamin A alırken, % 96.7 gibi büyük bir çoğunluğunun bu miktardan çok daha az aldığı tesbit edilmiştir.

Beslenmeadaki bu eksiklik, kişi sağlığında ciddi olumsuzluklar yaratmaktadır. Bu nedenle hangi vitaminlerin hangi gıda maddelerinde ne oranda var olduğunun tespit edilip insanların bilgisine sunulması, halk sağlığı yönünden önem taşımaktadır. Ancak bu amaçla kullanılan tayin metodlarının hassas ve güvenilir olması da ayrıca çok önem taşıyan diğer bir husustur.

Kan serumunda vitamin A tayini için çok çeşitli metodlar vardır (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,

26). Vitamin A tayinlerinde laboratuvarından laboratuvara büyük farklılıklar olduğu gibi, aynı analiz tekniğinin uygulanmasında bile farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu farklılıkların çoğunluğu araç ve gereçte kendisini göstermektedir. Vitamin A'nın tayininde kullanılan metodlar genellikle şunlardır: Vitamin A antimon triklorür ile fotometrik tayini (17, 20), trifloroasetik asit (18), trikloroasetik asit (19), gliseroldiklorohidrin (21) ayırıcıları ile verdiği reaksiyonlara dayanan tayinlerdir. Ayrıca retinolün trimetilsil esterlerini yapıp, gaz kromatografisine vererek Gas chrom Q' üzerinde SE30 kolonu ile tayini de mümkündür (27). Diğer tayin yöntemlerinde ise, ayırma kromatografisi ile Sephadex LH 20'de vitamin A, karotin, vitamin D ve vitamin E'den ayrılır ve UV spektrofotometresinde konsantrasyonu tayin edilir. Biyolojik metodlar da ekseriya belli bir besinin ihtiva ettiği belli bir vitamini tayin etmek için kullanılır. Biyolojik metod zaman alıcı, pahalı ve masraflı bir metod olduğundan dolayı günümüzde sadece kontrol metodu olarak kullanılmaktadır (28).

Serumda β -karotin tayininde metodların çoğunda, β -karotin diğer karotinoidlerle birlikte ekstrakte edilir ve bu karışımın, vizibl sahadaki absorbansının β -karotinin absorbansını temsil ettiği kabul edilir. Aslında kan serumunda total karotinoidlerle β -karotin arasında yüksek pozitif korelasyon ($r=0.99$) mevcut olduğundan, genellikle tayin prosedürü güç olan β -karotin yerine total karotinoidlerin tayini yapılmaktadır (29).

Materyal ve Metot

Materyal:

Van ili Bardakçı köyünden yaşları 3-10 arasında değişen 20 baş yerli sığırdan alınan süt örnekleri ile, Van ili Belediye Mezbahasında yaşları 2-5 arasında değişen 20 baş koyundan alınan kan serumu örnekleri araştırmanın materyalini oluşturdu. Kan numuneleri V. jugularisten alındı. Alınan kanlar, santrifüj cihazında 3000 rpm'de 10 dakika döndürülerek serumlar ayrıldı. Daha sonra serumlar, ağız kapaklı steril tüplere alınarak analizler gerçekleştirildi. Süt numuneleri ise steril şartlarda alınarak $-15^{\circ}C$ 'de dipfrizde muhafaza edildi. İki haftalık sürede aynı süt örneklerine farklı sabunlaştırma yöntemleri uygulandı.

Metot:

Kan serumunda vitamin A ve karotin tayini: Serum ya da serum proteinleri alkol ile çöktürüldü. Karotin ve vitamin A petrol eteriyle ekstrakte edildi. Plazma ya da serumda vitamin A'nın büyük bir bölümü alkol formunda (retinol) bulunduğundan sabunlaştırmaya gerek duymaksızın doğrudan doğruya ekstrakte edildi. Ekstraktın absorpsiyonu 450 nm dalga boyunda okunarak karotin konsantrasyonu tayin edildi. Petrol eteri, azot gazı altında buharlaştırıldı. Geride kalan tortu üzerine kromojen çözelti, yani Carr-Price ayırıcı ilave edildi. Meydana gelen mavi rengin intensitesi 650 nm dalga

boyunda okunarak vitamin A'nın miktarı hesaplandı. Ancak kromojen çözelti ile karotinde renk reaksiyonuna katıldığından burada bir karotin düzeltmesi yapıldı (29).

Sütte ve kan serumunda soğuk sabunlaştırma ile vitamin kan serumunda A ve karotin tayini: Sütte ve serumda vitamin A ve karotin tayini için Çamaş (29) tarafından bildirilen Willstaedt metodu uygulandı. Buna göre süt yağı, potasyum hidroksit ile soğuk olarak sabunlaştırıldı. Sabunlaşmayan kısım ekstrakte edildi. Daha sonra sarı rengin 460 nm dalga boyunda; Carr-Price ayırıcın ilavesi ile meydana gelen mavi rengin de 620 nm dalga boyunda okunması ile spektrofotometrik olarak karotin ve vitamin A tayini yapıldı.

Sütte ve kan serumunda sıcak sabunlaştırma ile vitamin kan serumunda A ve karotin tayini: Süt yağı ve kan serumu potasyum hidroksit ile sıcak olarak

Tablo 1: Soğuk ve sıcak sabunlaştırma yöntemleri sonunda sütte tayin edilen ortalama vitamin A ve total karotin değerleri.

| Vitamin A | | Total karotin | |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Soğuk sabunlaştırma | Sıcak sabunlaştırma | Soğuk sabunlaştırma | Sıcak sabunlaştırma |
| $X \pm Sx : 54.09 \pm 5.2$ | $X \pm Sx : 54.15 \pm 5.17$ | $X \pm Sx : 71.87 \pm 6.71$ | $X \pm Sx : 71.89 \pm 6.72$ |
| $T_{1,2} : 0.0$ | $T_{2,1} : 0.0$ | $T_{1,2} : 0.0$ | $T_{2,1} : 0.0$ |
| n: 20 | n: 20 | n: 20 | n: 20 |

Tablo 2: Sabunlaştırmadan, Soğuk ve sıcak sabunlaştırma yöntemleri sonunda kan serumunda tayin edilen ortalama vitamin A değerleri.

| Vitamin A | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Sabunlaştırmadan | Soğuk sabunlaştırma | Sıcak sabunlaştırma |
| $X \pm Sx : 37.92 \pm 2.31$ | $X \pm Sx : 37.31 \pm 2.39$ | $X \pm Sx : 37.87 \pm 2.28$ |
| $T_{1,2} : 0.0$ | $T_{2,3} : 0.0$ | $T_{1,3} : 0.0$ |
| n: 20 | n: 20 | n: 20 |

Tablo 3: Sabunlaştırmadan, Soğuk ve sıcak sabunlaştırma yöntemleri sonunda kan serumunda tayin edilen ortalama total karotin değerleri.

| Total karotin | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Sabunlaştırmadan | Soğuk sabunlaştırma | Sıcak sabunlaştırma |
| $X \pm Sx : 51.75 \pm 2.49$ | $X \pm Sx : 50.91 \pm 2.59$ | $X \pm Sx : 51.06 \pm 2.59$ |
| $T_{1,2} : 0.1$ | $T_{2,3} : 0.0$ | $T_{3,1} : 0.1$ |
| n: 20 | n: 20 | n: 20 |

Tartışma ve Sonuç

Kan serumunda sabunlaştırma işlemi uygulanmaksızın elde edilen vitamin A değerlerinin ortalaması $37.92 \pm 2.31 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, total karotin değerlerinin ortalaması ise $51.57 \pm 2.49 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ olarak bulunmuştur.

Kan serumunda soğuk sabunlaştırma yönteminin uygulanmasından sonra elde edilen vitamin A değerlerinin ortalaması $37.31 \pm 2.39 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, karotin değerlerinin ortalama değerleri ise $50.91 \pm 2.59 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ olarak tesbit edilmiştir. Kan serumunda sıcak sabunlaştırma işleminden sonra saptanan vitamin A değerlerinin ortalaması $37.87 \pm 2.28 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, karotinki de $51.06 \pm 2.59 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ olarak

sabunlaştırıldı. Sabunlaşmayan kısım ekstrakte edildi. Sarı rengin 460 nm dalga boyunda; ekstinsiyonun okunması ile karotin; Carr-Price ayırıcının ilavesiyle oluşan mavi rengin ekstinsiyonun okunması suretiyle spektrofotometrik olarak vitamin A tayini yapıldı (29).

Bulgular

Süt ve kan serumlarına ait vitamin A ve total karotin değerleri Tablo 1,2,3'te gösterilmiştir.

bulunmuştur.

Her üç yöntem ile elde edilen ortalama vitamin A ve total karotin miktarlarının istatistiki açıdan değerlendirilmesinde, gerek vitamin A yönünden ve

gerekse total karotin yönünden önemli bir fark tesbit edilmemiştir.

Sütteki Vitamin A ve total karotin değerlerine gelince, soğuk sabunlaştırma yönteminin uygulanmasından sonra ölçülen ortalama vitamin A değeri $54.09 \pm 5.20 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, karotin değeri $71.87 \pm 6.75 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ olarak bulunmuştur. Sıcak sabunlaştırmadan sonra ise ortalama $54.15 \pm 5.17 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ vitamin A, $71.89 \pm 6.72 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ total karotin değerleri saptanmıştır.

Kan serumunda olduğu gibi sütte de, her iki yöntemle elde edilen ortalama vitamin A ve total karotin

değerlerinin istatistiki olarak karşılaştırılmasında, gerek vitamin A yönünden ve gerekse total karotin yönünden önemli bir fark bulunmamıştır. Tablo 2 ile Tablo 3 incelendiğinde, sabunlaştırma işlemi uygulanmadan, soğuk ve sıcak sabunlaştırma işleminin uygulanmasından sonra elde edilen vitamin A değerleri ile total karotin değerleri arasında istatistiki açıdan önemli bir farkın bulunmadığı gözlenmiştir. Kromatografi yöntemine başvurulmasının da elde edilen sonuçları etkilemediği görülmüştür.

Total karotin değerlerinin her üç yöntem sonunda benzer olarak ortaya çıkması esasen beklenen bir sonuçtur. Zira kullanılan analiz materyalinde karotinler serbest olarak bulunmaktadır. Oksitlenmeye karşı korunduğunda materyalin içerdiği karotinlerin hemen hemen tümü ekstrakte edilebilmektedir. Ancak vitamin A için aynı şey söylenemez. Çünkü kan serumunda az da olsa vitamin A'nın % 20 kadarı esterleşmiş formda bulunmaktadır (17). Bu nedenle retinol esterlerinin hidrolizi ile sonucun etkilenip etkilenmeyeceği düşünülmüş ve sabunlaştırma yöntemlerine baş vurulmuştur. Ancak sonuçta, sabunlaştırılarak elde edilen değerlerin, sabunlaştırılmadan elde edilen değerlerden farklı olmadığı görülmüştür. Gerek sabunlaştırmadan ve gerekse sabunlaştırılarak tayin edilen değerlerin farksız olarak ortaya çıkması, kan serumundaki % 20 kadar esterleşmiş formda vitamin A'nın akıbetini düşündürülebilir. Sabunlaştırma işlemlerinin oldukça uzun ve zaman alıcı olduğu, vitamin A'nın okidasyona dayalı bulunduğu dikkate alınır, uzun süren işlemler sonunda her türlü koruma önlemlerine rağmen bir miktar vitamin A kaybının söz konusu olabileceği şeklinde bu durumun açıklanması mümkün gözükmemektedir.

Kaynakların incelenmesinde de kan serumunda vitamin A tayini yapılırken, sabunlaştırma yöntemlerine ender olarak baş vurulduğu gözlenmektedir (30).

Tıpkı kan serumunda olduğu gibi, sütte de sabunlaştırma yöntemlerinin farklı oluşu, kromatografi uygulamasının yapılıp yapılmaması gibi farklı işlemlerin gerek vitamin A değerleri açısından ve gerekse total karotin açısından sonuçları etkilemediği gözlenmektedir.

Sütte vitamin A büyük oranda esterleşmiş formda bulunduğu için, sabunlaştırma işlemlerinin uygulanması gereklidir (17, 31, 32). Ancak gerek zaman ve kimyasal madde sarfiyatı açısından en ekonomik ve gerekse güvenilirlik açısından da en hassas ve laboratuvar olanaklarına en uygun metodun seçilmesi en büyük sorunu oluşturmaktadır.

Bu araştırmada, her türlü ihtimal göz önünde bulundurularak doğrudan doğruya sabunlaştırılmadan, sıcak ve soğuk sabunlaştırma ile, kromatografi işlemi uygulanarak değişik prosedürler tatbik edilmiştir.

Sonuç olarak kan serumunda sabunlaştırma işlemine baş vurulmadan, sütte ise soğuk sabunlaştırma ile vitamin A ve total karotin tayinlerinin ekonomik ve güvenilir olduğu, kromatografi işlemlerine gerek bulunmadığı kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

- 1.Egemen A.: Vitaminlerin Sağlığımızdaki Önemi. Ankara, (1986).
2. Adam R.C.: Vitaminler ve Antivitaminler. E.Ü. Ziraat Fak. Yay. 33, İzmir, (1960).
3. Ersoy E., Bayşu N.: Biyokimya. A. Ü. Vet.Fak.Yay., Ankara, (1986).
4. Kaplan A., Pesce J.: Clinical Chemistry. Medical Research Laboratories. Ohio, 411- 550, (1989).
5. Marks J. The Vitamines in Health and Diseases a Modern Reapracial. 42-49, (1968).
6. Bingöl G. Biyokimya. A. Ü. Eczacılık Fak. Yay., Ankara, (1978).
7. Martin D., Mayes P., Rodwel V.: Harper's Review of Biochemistry. 114, Lange Medical Publication, California, (1983).
8. Moore T.: Vitamin A. 18, 114-215, (1957).
9. Wolf G.: Vitamin A in; RB Alfin-Slater. Human Nutrition. 3B, 97-203, (1980).
10. Parnell JP, Sharman BS. Effect of vitamin A on keratinization in the rat. Am.Ass.Adv.Sci., 114-131, (1962).
11. Mellanby EA.: A Story of Nutritional Research. Baltimore, 74, (1950).
12. Hayes KC, Cousins RJ.: Vitamin A Deficiency and Bone Growth. 130-132, (1970).
13. Thompsson JN: Vitamin A in development of the embryo. Am. J. Clin. Nutr., 22, 1063, (1969).
14. Langman J, Welsch GW.: Excess Vitamin A and development of the cerebral cortex. J. Comp. Neurol., 131, 15, (1967).
15. Niazi IA, Saxena S.: Relationship between inhibiting influence of vitamin A and developmental stage of regeneration tail in toad tadpoles. I.J.Exp.Biol., 17, 866-868, (1979).
16. Thompson J.: Problems of official methods and new techniques for analysis of foods and feeds for vitamin A. 8, (1986).
17. Carr PH and Price E.: Colour reactions attributed to vitamin A. Biochem. J., 20, 497, (1926).
18. Dugan R., Frigerio N. and Siebert J.: Colorimetric determination of vitamin A and it's derivatives with trifluoroaceticacide. Anal. Chem., 36, 114, (1964).
19. Bayfield RF.: Colorimetric determination of vitamin A with trichloroaceticacide. Anal. Chem., 39, 282, (1971).
20. Caldwell MJ, Parrish DB and Schrenk W.: The response of different photometers to the color produced by vitamin A and carotene with antimony trichloride. Trans. Cans. Acad. Sci., 49, (197, (1946).
21. Sobel A and Werbin H.: Activated glycerol dichlorohydrin. A new colorimetric reagent for vitamin A. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., (1946).
22. Sobel A. and Snow S.: The estimation of serum vitamin A with activated glycerol dichlorohydrin. J. Biol. Chem., (1947).
23. Bayer J., Toro G. and Ackerman P.: Bray's Clinical Laboratory Methods. (1962).
24. Brochmann H. and Schotter H.: Alumina oxides with graded adsorbition powerful chromatographic adsorbition. Chem. Ber., 73-74, (1941).
25. Anonymous.: Manuel for nutrition surveys. Second edition. National Institutes of Health. Bethesda, Md., (1963).
26. William H.: Official Methods of Analysis of the Association of Official and Analytical Chemists. (1975).
27. Wiggins RA.: Proc. Analyt. Div. Chem. Soc., (1976).
28. Bell JG.: Chem and Industry. (1971).
29. Çamaş H.: Süt ineklerinde kan plazmasında ve sütte karotin, vitamin A ve bazı yağ asitleri yönünden araştırmalar. (Doçentlik tezi), (1979).
30. Thompson J., Duval S. and Verdier B.: Investigation of carotenoids in human blood using HPLC. J. Micronut. Analysis, 1, 81-91, (1985).
31. Coverly S.: Automated determination of vitamin A in milk. J. Micronut. Analysis, 1,65-74, (1985).
32. Murti T., Jacob G. and Delthara V.: Determination of vitamin A in infant milk powders by HPLC. India J. Dairy Sci., 2, 42, (1989).