

Vitamin A'nın Metabolizması, Kan Plazmasında Vitamin A ve Karotin Tayini

Hayati ÇAMAŞ*

Vitamin A'nın Başlıca Şekilleri ve Bağırsak Mukozasından Emilmesi:

Doğada karotinoidler sınıfına dahil çok sayıda madde bulunmasına rağmen, vitamin A aktivitesi gösterenler azdır. Bunların başlıcaları α -, β - ve γ -karotinlerdir⁸. Hayvanların başlıca vitamin A kaynaklarını bu üç karotin oluşturur. Ancak yeşil bitkilerde, % 90 oranla β -karotin çoğunlukta olup, en yüksek vitamin A aktivitesi gösterendir¹⁷.

Besinler başlıca iki esas vitamin A aktivitesi içerirler. Bunlardan birisi serbest vitamin A alkol ya da bunun yağ asitleri ile esterleşmiş şekli, diğeri ise provitamin A olan β -karotindir³⁵. Gerek serbest vitamin A alkol ve gerekse esterleşmiş form, hayvansal besin maddelerinde bulunduğundan, ot yiyen hayvanlar vitamin A ihtiyaçlarını geniş ölçüde yeşil bitkilerdeki β -karotin kaynaklarından karşılamak zorundadırlar. Vitamin A esteri bağırsak lumeninde pankreas esterazı tarafından hidrolize edilir^{21,24} ve serbest alkol formu metabolik enerjiye ihtiyaç gösteren bir reaksiyonla, ince bağırsağın yukarı bölümünden emilir^{10,19,32,33}.

Vitamin A'nın bağırsak mukozasında birikimi ve emilmesi kompleks bir olaydır³².

Gerek vitamin A ve gerekse karotin, absorpsiyon sırasında disperse edici etkilere ihtiyaç gösterirler. Bu ihtiyaç β -karotinde vitamin A'dan daha yüksektir. Örneğin vitamin A alkol (retinol) Tween 80 (polioksietilen sorbitan monooleat)²⁸ içinde kolayca emildiği halde, karotin konjuge safra tuzlarının yokluğunda emilemez²⁷.

Besin maddelerinin sindirilebilirliği, okside edici ya da redükte edici etkilerin varlığı ya da yokluğu, besinsel proteinlerin miktarı ve tabiatı, intestinal mukozanın sağlamlığı, organizmanın genel hormonal ve fizyolojik durumu gibi faktörler de karotinlerin ve retinölün absorpsiyonunu geniş ölçüde etkilemektedir³⁶.

Retinölün karbon zincirindeki çok hafif değişimler, onun biyolojik aktivitesini yok etmektedir²⁸. Bu nedenle karotinler ve vitamin A emilim sırasında büyük kayıplara uğramaktadır.

* Doç. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Biyokimya Bilim Dalı, Bursa /TURKEY.

Keating ve arkadaşları ¹⁶, rumen sıvısında in vitro olarak yaptıkları bir araştırmada, rasyona nitrit ilavesinin, karotin retansiyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Diğer taraftan yüksek düzeyde kaba yemden oluşan rasyonlarla beslenen sığırların rumen sıvısında, vitamin A'nın yıkılması, fazla tahıl içeren rasyonlarla beslenenlerinkinden daha fazla olmaktadır. Bu durum, tarlaların nitrojenli gübrelere gübrelenmesi sonucu, otlarda nitrat birikiminin, sığırlarda vitamin A yetersizliği ensidansını arttırabileceği ¹⁴ görüşünü destekler niteliktedir.

Ayrıca nitratların guatrojenik oldukları saptanmıştır ⁴⁴. Halbuki hipotirodizmde β -karotinin vitamin A'ya dönüşmesi düşük düzeydedir ³⁰. Bu nedenle nitratların tiroid bezine etkileri sonucu vitamin A yetersizliği ortaya çıkabilmektedir. Öte yandan nitratların intestinal mikroorganizmalar tarafından nitritlere indirgenebileceği ve bunların da mukoza bütünlüğünü bozarak emilimi olumsuz yönde etkileyebileceği bildirilmektedir ²⁸.

Normal ihtiyacı geniş ölçüde aşan protein alınması, vitamin A ihtiyacını arttırdığı gibi ¹⁷, proteinlerden mahrumiyet de vitamin A'nın taşınmasına farkedilir derecede engel olmaktadır. Yapılan araştırmalar, vitamin A taşıyıcısı bir proteinin varlığını göstermektedir ⁴⁰.

Vitamin A ile karotinin emilimi, rasyondaki yağların tipi ve miktarı ile de etkilenmektedir. Gerek vitamin A ve gerekse karotinler yağlarla birlikte alındıklarında daha iyi değerlendirilirler. Ancak rasyonların fazla miktarda doymamış yağ asitleri içermeleri halinde, peroksitlerin oluşması suretiyle vitamin A ve karotinin parçalanması kolaylaşabilir. Bunu önlemek için anti-oksidanlar kullanılır ¹⁷.

Yağlardan yoksun rasyonla beslenen sığırlarda, kan plazmasındaki karotin düzeyinin önemli ölçüde düştüğü gösterilmiştir ⁵.

İnsan tarafından alınan vitamin A'nın tüm formları, retinolün uzun zincirli yağ asitleri ile olan esterleridir ²⁹. Bu esterler arasında retinil palmitat hakim durumdur. Besinsel retinil esterlerinin çoğu emilmeden önce hidrolize olurlar ^{20,21}. Özel durumlarda, az miktarda retinil palmitat, hidrolize olmaksızın emilebilir ²⁸. Civcivlerde ise retinil asetatın retinil palmitattan daha iyi emildiği gösterilmiştir ³¹.

Doğal retinil esterleri, bağırsakta geniş kapsamlı bir hidroliz sonucu emilmektedir ve bu hidrolizi yeniden kantitatif bir esterleşme izlemektedir. Bu hidroliz ve esterleşme siklusu, vitamin A bağırsaktan emilip karaciğerde depolanıncaya ve hatta karaciğerden serbest hale geçinceye kadar birkaç kez meydana gelmektedir ¹⁸. Vitamin A mikrozomlar içinde esterleşir ⁹.

Vitamin A emildikten ve karotin de emilip vitamin A'ya çevrildikten sonra, uzun zincirli yağ asitleri, özellikle palmitik asit ile esterleşerek lenf yolu ile karaciğere taşınır ^{12,13,20}.

Vitamin A esteri, lenf yolu ile genel dolaşıma ulaştıktan sonra, plazmadan hızla ayrılır ve karaciğerde depo edilir. Emilimden sonraki evrede kanda vitamin A serbest retinol halinde bulunur ³⁷. Bu şekil, ihtiyaç duyulunca, karaciğerin spesifik retinil palmitat esterazı tarafından serbest hale geçirilerek genel dolaşıma verilir ²².

İntestinal mukoza, provitaminlerin aktif vitamin A'ya çevrilmesinde başlıca rolü oynar. Bununla beraber, sınırlı ölçülerde de olsa, bu çevrilme işlemi diğer dokular tarafından da yapılabilir ⁴⁵. Karotinin vitamin A'ya çevrilmesi mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bugün, β -karotinin vitamin A'ya dönüşmesi ile ilgili

olarak iki yol tartışılmaktadır. Bu yollardan birisi, β -karotin molekülünün tam ortadan parçalanıp iki molekül vitamin A oluşması; diğeri ise bir uçtan başlayarak β -karotin molekülünün aşama aşama yıkılması suretiyle vitamin A'ya dönüşmesidir ².

Olson ²⁶'un araştırmalarına göre, β -karotin molekülünün 2 aktif vitamin A alkol meydana getirmek üzere ortadan parçalandığı ve bunların sonradan esterleşerek lenf yolu ile taşındığı kanaati hasıl olmuştur.

Sığırlarda, önceden vitamin A'ya çevrilmeksizin önemli miktarda karotin absorbe edilebilir. Sığırlarda plazmanın sarı renginden bu pigmentler sorumludur ¹⁷. Halbuki diğeri bazı türlerde, örneğin mandalarda, kan plazmasının, karotinoid düzeyi çok düşüktür. Bu durum, karotinlerin manda organizmasında, vitamin A'ya çevrilmek üzere, daha iyi değerlendirilebildiği şeklinde izah edilmektedir ³⁹.

Vitamin A'nın Fonksiyonu:

Vitamin A hayvansal organizmada, biyosentezlerin regülasyonunda önemli görevler üstlenmektedir. Gözün ağ tabakası pigmentlerinin kurulmasında, vitamin A aldehid (retinal) büyük bir role sahiptir. Bu nedenle vitamin A'nın fonksiyonları iki bölüme ayrılarak incelenebilir:

1. Vitamin A'nın gözün ağ tabakası pigmentlerinin oluşumundaki fonksiyonu,
2. Vitamin A'nın metabolik fonksiyonu.

Vitamin A'nın en iyi bilinen fonksiyonu görme olayındaki fonksiyonudur ^{8,17,42}. Bunun yanında, vitamin A'nın birçok temel görevleri henüz aydınlığa kavuşturulamamıştır ³³. Fakat mukopolisakkarid sentezinde rol oynamak suretiyle vitamin A'nın mukus salgısını stimüle ettiği ⁴³; karbonhidrat metabolizmasında asetat, laktat ve gliserol'den glikojen biyosentezinde ve glikokortikoidlerin sentezinde ¹⁵ görev aldığı bilinmektedir. Sinir sisteminin aktivitesinde, kemiklerin teşekkülünde, besinsel enerji ve proteinlerin değerlendirilmesinde, iç salgı bezleri ile cinsiyet organlarının faaliyetinde vitamin A'ya büyük bir sorumluluk düşmektedir. Ayrıca vitamin A, vitamin E ile birlikte vitamin C sentezinde de rol oynar ¹⁷. Diğer taraftan vitamin A, organizmanın su dengesinin regülasyonunda da görevlidir ²³. Noble ²⁵'nin araştırmalarına göre, sığır ve koyunların karaciğerinde Koenzim Q ile vitamin A'nın yakın ilişki içinde bulunduğu ve Vaughan ve arkadaşlarının ³⁸ araştırmalarına göre de, vitamin A eksikliğinde, rat karaciğer mitokondrionlarındaki linoleik ve arahidonik asit konsantrasyonlarının azaldığı saptanmıştır.

Kan plazmasındaki kritik vitamin A ve karotin düzeyleri ile bunların ne anlamalara gelebileceği birçok araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur ⁷.

Vitamin A'nın dışkı ile, CO₂'e dönüşerek solunum yolu ile ve suda eriyen komponentler halinde idrarla organizmadan dışarı atıldığı bildirilmektedir ²⁸.

Kan Plazmasında Vitamin A ve Karotin Tayini ¹:

Vitamin A tayini metodları, materyalin türüne ve laboratuvarlardaki araç ve gereç olanaklarına göre oldukça çeşitlidir. Seçilecek metodun herşeyden evvel güvenilir ve hassas olması aranır. Ayrıca klinik amaçlarla uygulanması da kolay olmalıdır.

Bazı işlem farklılıklarının olmasına rağmen, vitamin A tayini metodlarının temeli, genellikle birkaç esasa dayalıdır. Bunların başlıcaları ya vitamin A'nın UV-alan-

daki ışık absorpsiyonunun ölçülmesi; veya vitamin A'nın antimontriklorür, trifluorasetik asit, triklorasetik asit ve gliserol diklorhidrin gibi ayıraçlarla renk meydana getirmesi; yahutta vitamin A'nın anhidro vitamin A'ya dönüştürülmesi gibi esaslara dayanmaktadır ^{1.2.3.6.11.34.41}.

Günümüzde en çok kullanılan metod vitamin A'nın antimon triklorür ($SbCl_3$) ile mavi bir renk vermesi esasına dayanan Carr-Price reaksiyonudur ⁶. Ancak adı geçen ayıraç, nem karşısında çok duyarlı olduğu için, Carr-Price reaksiyonu hemen bozulabilir. Fakat numunelere 1-2 damla anhidro asetik asit damlatılarak bu sakınca ortadan kaldırılabilir ¹.

Plazmada β -karotin tayinine gelince, metodların çoğunda β -karotin, diğer karotinoidlerle birlikte ekstrakte edilir ve bu karışımın vizibl sahadaki absorbansının β -karotinin absorbansını temsil ettiği kabul edilmektedir ⁶. Aslında kan plazmasında, total karotinoidlerle β -karotin arasında yüksek düzeyde pozitif korrelasyon ($r = 0,99$) mevcut olduğundan, genellikle tayin işlemi güç olan β -karotin yerine total karotinoidlerin tayini yapılmaktadır ⁴.

İlke: Plazma ya da serum proteinleri alkol ile çöktürülür. Karotin ve vitamin A petroleterle ekstrakte edilir. Plazmada vitamin A'nın büyük bir bölümü alkol formunda (retinol) bulunduğundan ^{22.37} genellikle sabunlaştırmaya gerek duyulmaz ⁶. Ekstraktın absorpsiyonu 450 nm dalga boyunda okunarak karotin konsantrasyonu tayin edilir. Petroleter azot gazı altında buharlaştırılır. Geride kalan tortu üzerine kromojen çözelti yani Carr-Price ayıraç ilave edilir. Meydana gelen mavi rengin intensitesi 620 nm dalga boyunda okunur ve vitamin A'nın miktarı hesaplanır. Ancak kromojen çözelti ile karotin de renk reaksiyonuna katıldığından burada bir karotin düzeltmesi gereklidir.

Araç ve Gereçler:

- Spektrofotometre
- Cam kapaklı santrifüj tüpü
- Santrifüj cihazı
- Sabit ısı su banyosu ($40-50^\circ C$ 'ye ayarlanabilir)
- Azot gazı tankı

Ayıraçlar:

- Etilalkol (% 95'lik)
- Petroleter ($20^\circ-40^\circ$)
- Anhidro asetik asit
- Susuz sodyum sulfat p.a. (Na_2SO_4)
- Kloroform p.a.
- Hidroklorik asit (6 N)
- Kromojen çözelti (kloroformda % 20 $SbCl_3$)

Kromojen çözeltinin hazırlanması: 113.4 g $SbCl_3$ 455 ml kloroformda, geri soğutucu altında eritilir. Susuz Na_2SO_4 içeren filtre kağıdından kahverenkli şişeye süzülür. Eğer çözelti bulanık olursa, berraklaşmıncaya kadar Na_2SO_4 üzerinden süzme işlemine devam edilir. Susuz sodyum sulfat üzerinde ve kahve renkli şişede saklanır. Çözelti nem çektiği için, şişenin ağzı daima kapalı tutulmalıdır. Kromojen çözelti

bulunursa, içinde su vardır. Susuz sodyum sülfat süzülürken, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 'ya dönüşmek suretiyle kromojen çözeltildeki su uzaklaştırılır.

İşlem: Cam kapaklı santrifüj tüpüne 2 ml. plazma ya da serum konur ve üzerine % 95'lik etil alkolden 2 ml. ilave edilerek karıştırılır. Karışıma 3 ml. petroleter konur ve tüpün ağzı kapatılarak 2 dakika kuvvetlice çalkalanır. Sonra 3 dakika düşük devirde santrifüje edilir. Karışımın üst kısmında toplanan petroleter fazının 2 ml si, spektrofotometrenin 1 cm.lik küvetine konur ve ekstinksiyonu 450 nm dalga boyunda petroletere karşı okunur. Sonra 40-50° C'lik su banyosunda, azot gazı altında, petroleter buharlaştırılır. Tortu 0,2 ml. kloroformda eritilir. Üzerine 2 damla anhidrasetik asit damlatılır. Benzer olarak hazırlanan reaktif körü ile spektrofotometre 620 nm dalga boyunda sifıra ayarlandıktan sonra (Reaktif Körü = 0.2 ml. kloroform + 2 damla anhidrasetik asit + 2 ml. Carr-Price ayırıcı) plazma ekstraktını taşıyan küvete 2 ml. Carr-Price ayırıcı ilave edilir ve 3-5 saniye içinde ekstinksiyonu okunur. Okunan optik dansite kaydedildikten sonra, küvet hemen kaldırılıp mavi rengin oluşup oluşmadığı ve çözeltilin berrak olup olmadığı kontrol edilir. Bariz mavi rengin oluşması ve çözeltilin berrak olması şarttır. Aksi halde test tekrarlanır.

Her laboratuvarında aynı marka spektrofotometre bulunmadığından, analiz işlemleri laboratuvar imkânlarına adapte edilmelidir¹. Metodun orijinalindeki veriler Coleman spektrofotometresine göre belirlendiği halde, bizim verilerimiz Beckman-DU spektrofotometresine göre saptanmıştır. Bu nedenle işlemlerde bazı modifikasyonlar yapmak zorunlu hale gelmiştir. Şöyle ki; 450 nm dalga boyunda ekstinksiyonunu okuduğumuz kan plazmasının petroleter ekstraktını, spektrofotometre küvetinde buharlaştırmak bazı güçlükler meydana getirdiğinden, konik bir tüpe aktarılmış ve ondan sonra 40-50° C'lik su banyosunda azot gazı altında buharlaştırılmıştır. Daha sonra tortu, 0,2 ml. kloroformla tekrar spektrofotometre küvetine nakledilmiş ve yukarıdaki işlem sürdürülmüştür.

Önlemler: SbCl_3 nemlenmiş olmamalıdır (kullanılmayacağı zaman kapalı olarak saklanır).

— Numuneler SbCl_3 'ün ilavesinden önce nem içermemeli, kuru olmalıdır.

— SbCl_3 ile bulaşmış cam malzeme 6 N HCl çözeltilinde bekletildikten sonra iyice yıkanmalıdır.

— Eğer test küvetinde, kromojen çözeltilin ilavesinden sonra, mavi renk fark edilmezse (optik dansite 0,04'ün altında), numuneler 100 ml. de 14 mikrogramdan az vitamin A içeriyor demektir. Örneklerin % 25'inden fazlası 0,04'den düşük optik dansite veriyorsa, plazma 3 ml. ye çıkarılmalıdır.

— Petroleter ekstraktının pipetle alınması sırasında, protein partiküllerinin küvete geçmemesine özen gösterilmelidir.

Standart eğrilerin hazırlanması: Vitamin A ve karotin faktörleri bir spektrofotometreden diğerine biraz değiştiği için, standard karotin ve vitamin A eğrileri hazırlanmalı ve her enstrümanın faktörleri hesaplanmalıdır.

Standart β -Karotin Eğrisinin Hazırlanması

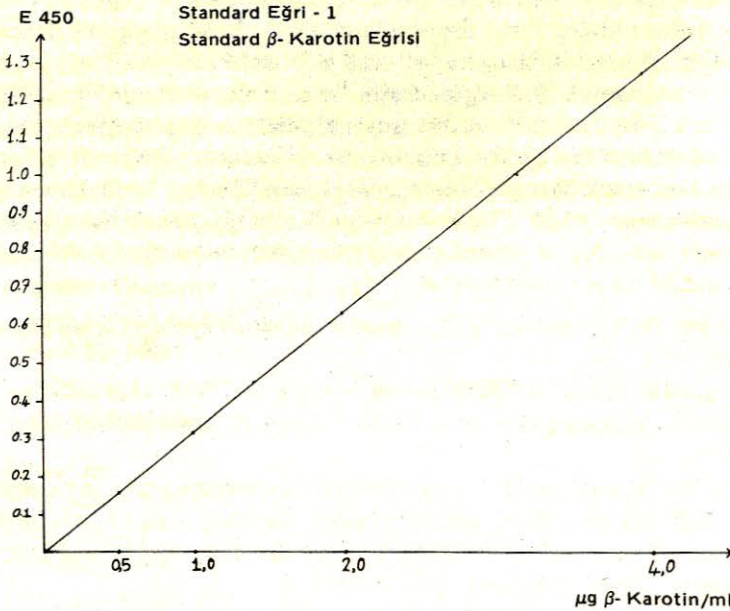
Hassas olarak 50 mg. β -karotin tartılır. Birkaç ml. kloroformda eritildikten sonra, petroleter ile ölçülü balonda 100 ml. ye tamamlanır. Bu çözelti tam kalibras-

yon anında hazırlanır ve mümkün olduğu kadar kısa zamanda işlemler bitirilir. Böylece β -karotinin parçalanmamasına özen gösterilir. Bu çözelti 1/100 oranında dilüe edilerek bir intermedier standard hazırlanır. İntermedier standard, aşağıdaki tarzda petroleterle dilüe edilmek suretiyle çalışma standartları elde edilir:

<u>Dilüsyon</u>	<u>β- karotin (mikrogram/ml)</u>
1 ml. → 10 ml. ye	0.5
2 ml. → 10 ml. ye	1.0
4 ml. → 10 ml. ye	2.0
8 ml. → 10 ml. ye	4.0

Bu standard çözeltilerin her birinden paralel olarak ikişer ml. spektrofotometre kütetine konularak optik dansiteleri 450 nm dalga boyunda okunur. Okunan optik dansitelere göre eğri çizilir ve faktörler hesaplanır.

Biz laboratuvarımızda aşağıdaki değerleri elde ettik ve bunlara göre grafiği çizerek faktörleri hesapladık (Standard eğri 1).



$$E_{450} \times F = \mu\text{g. } \beta\text{-karotin/ml. petroleter}$$

Bu eşitlik gereğince, her dilüsyondaki, β -karotin konsantrasyonlarının faktörleri ayrı ayrı hesaplanarak ortalaması asıl faktör olarak alındı. Böylece $F = 3.17$ bulundu. Bu faktörden yararlanılarak, 100 ml. kan plazmasındaki karotin konsantrasyonunun nasıl bulunacağı aşağıdaki gibi hesaplandı:

$$E_{450} \times 3,17 \times 3 = \mu\text{g } \beta\text{-karotin/3 ml. petroleter.}$$

İki ml. plazma kullanıldığı için;

$$\frac{E_{450} \times 3,17 \times 3}{2} = \mu\text{g } \beta\text{-karotin/ml. plazma,}$$

Değerler 100 ml. plazmada verileceği için,

$$\frac{E_{450} \times 3,17 \times 3 \times 100}{2} = \mu\text{g } \beta\text{-karotin/100 ml. plazma.}$$

Denklem sadeleştirilirse,

$$E_{450} \times 476 = \mu\text{g } \beta\text{-karotin/ 100 ml. plazma bulunur.}$$

Standard Vitamin A Eğrisinin Hazırlanması:

Bir gramında 334 mg. vitamin A asetat içeren vitamin A standardından hassas olarak 200 mg. tartılır. Bu miktar 6,68 mg. vitamin A asetatı karşılamaktadır. Birkaç ml. kloroformda eritilir ve 100 ml.ye dilüe edilir. Böylece % 6,68 mg.lik standard çözelti hazırlanır.

Çalışma standardı hazırlamak için, bu stok çözelti 10 ml. lik ölçülü balonlarda aşağıdaki gibi kloroformla seyreltilir:

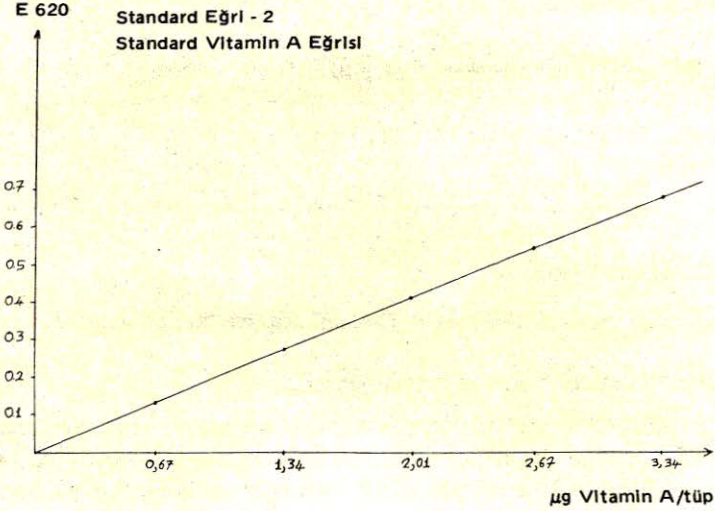
Dilüsyon	Vitamin A asetat $\mu\text{g/ml.}$
1 ml. \rightarrow 10 ml.	6,68
2 ml. \rightarrow 10 ml.	13,36
3 ml. \rightarrow 10 ml.	20,04
4 ml. \rightarrow 10 ml.	26,72
5 ml. \rightarrow 10 ml.	33,40

Bu çözeltilerin herbirinden 0,2 ml. alınıp spektrofotometre kuvetine konur. Böylece her kuvette sıra ile şu miktarlar elde edilir:

- 0,2 ml. 1,34 μg vitamin A
- 0,2 ml. 2,68 " " "
- 0,2 ml. 4,02 " " "
- 0,2 ml. 5,34 " " "
- 0,2 ml. 5,68 " " "

Daha önce anlatılmış işlem gereğince, alınan bu numuneler üzerine 2 damla anhidrid asetik asit damlatılır. Sonra 2 ml. Carr-Price ayracı ilave edilerek, reaktif körüne karşı, 620 nm dalga boyunda, ekstinksiyonları okunur.

Biz laboratuvarımızda paralel örneklerin ortalamaları olarak aşağıdaki sonuçları elde ettik ve çizimi kolaylaştırmak için vitamin A değerleri ile okunan ekstinksiyonların yarısını alarak standard vitamin A eğrisini çizdik (Standard eğri 2). β -karotin faktörünün hesaplanmasında olduğu gibi, her konsantrasyonun faktörü ayrı ayrı hesaplandı ve sonunda değerlerin ortalaması alınarak vitamin A faktörü bulundu.



$$E_{620} \times F = \mu\text{g. Vitamin A/tüp}$$

Ayrı ayrı hesaplanan faktörlerin ortalaması $F = 4,91$ olarak elde edildi.

Elde edilen bu faktörden yararlanılarak 100 ml. kan plazmasındaki, vitamin A değerleri şöyle hesaplandı:

$$E_{620} \times 4,91 = \mu\text{g. Vitamin A/tüp}$$

İki ml. kan plazması, 3 ml. petroleterde ekstrakte edildiği ve bunun 2 ml. si kullanıldığı için

$$\frac{E_{620} \times 4,91 \times 3}{2 \times 2} = \mu\text{g. Vitamin A/1 ml. plazma}$$

Değerler 100 ml. plazmada verileceği için;

$$\frac{E_{620} \times 4,91 \times 3 \times 100}{4} = \mu\text{g. Vitamin A/100 ml. plazma}$$

Denklem sadeleştirilirse,

$$E_{620} \times 368 = \mu\text{g. Vitamin A/100 ml. plazma elde edilir.}$$

Ancak plazmada, vitamin A ile birlikte karotinde mevcut olduğundan ve Carr-Price ayırıcı ile reaksiyona girdiğinden bir karotin düzeltilmesi gereklidir.

$$\text{Düzeltilmiş } E_{620} = E_{620} - (E_{450} \times \text{Düzeltilme faktörü})$$

1 µg karotin 620 nm dalga boyunda 0,017 ekstinksiyon vermektedir. O halde;

$$\text{Düzeltilme } F = 3,17 \times 0,017 / 1 \text{ ml. petroleter}$$

F = 3,17 değeri, daha önce, karotin faktörü hesaplanırken bulunmuştur.

Vitamin A tayini için, 2 ml. petroleter ekstrakte kullanıldığı için,

$$\text{Düzeltilme } F = 3,17 \times 0,017 \times 2 = 0,108 \text{ bulunur.}$$

Elde edilen bu düzeltilme faktörüne göre, daha önce bulduğumuz

$$E_{620} \times 368 = \mu\text{g. Vitamin A/100 ml. plazma}$$

denkleminde, 100 ml. kan plazmasındaki vitamin A değeri şöyle hesaplanır:

$$[E_{620} - (E_{450} \times 0,108)] \times 368 = \mu\text{g. Vitamin A/100 ml. plazma}$$

Yukarıdaki faktörler sadece antimon triklorür renk ayırıcı için tipiktir. Tri-fluorasetik asit metodu benzerdir, fakat aynı değildir.

LİTERATÜR

1. ANONİM (1963): Manual for nutrition Surveys. 124-129. 2. edn. Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense, National Institutes of Health, Bethesda, Md.
2. ANONİM (1970): Vitamin Compendium. F. Hoffmann-La Roche, AG, Basel.
3. A.O.A.C. (1975): 43. vitamins and other Nutrients. 816-823. In: (Editor; Horwitz, W. —Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Benjamin Franklin Station. Washington, D (20044).
4. BAYFIELD, R.F. and MYLREA, P.S. (1969): Carotenoid and tocopherol levels in the serum of apparently healthy dairy cattle. J. Dairy Res., 36, 137-144.
5. BOHMANN, V.R. and LESPERANCE, A.L. (1962): Effect of dietary fat on the digestion and blood composition in cattle. J. Anim. Sci., 21, 658.
6. BRUBACHER, G. and VUILLEUMIER, J.P. (1974): "Vitamin A" 975-982. In: (Editors: Curtius H. ch. and Roth M. — Clinical Biochemistry, Principles and Methods. Vol. II, Walter de Gruyter, Berlin, New York).
7. ÇAMAŞ, H. (1979): Süt ineklerinde kan plazmasında ve sütte karotin, vitamin A ve bazı yağ asitleri yönünden araştırmalar. A.Ü. Vet. Fak. Dergisi 26 (1-2), 81-97.
8. ERSOY, E., ERTÜRK, K. (1972): Biyokimya. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları. Ders Kitabı, 187, Ankara, 541.
9. FUTTERMAN, S. and ANDREWS, S.S. (1964): Composition of liver vitamin A ester and synthesis of vitamin A ester by liver microsomes. J. Biol. Chem. 239, 4077-4080.

10. GANGULY, J. (1960): Absorption, transport and storage of vitamin A. *Vitam. Hor.* 18, 387-415.
11. GLOOR, U. und VUILLEUMIER, J.P. (1976): Mektup. F. Hoffman-La Roche, Co, Abteilung F/CHV, Vu/kar, Basel-Schweiz.
12. GOODMAN, D.S., BROMSTRAND, R., WERNER, B., HUANG, H.S. and SHIRATORI, T. (1966): The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and β -Carotene in man. *J. Clin. Invest.*, 45, 1615-1623.
13. HUANG, H.S. and GOODMAN, D.S. (1965): Vitamin A and carotenoids. I. Intestinal absorption and metabolism of ^{14}C -Labeled vitamin A alcohol and β -Carotene in the rat. *J. Biol. Chem.*, 240, 2839-2844.
14. HUBER, W.G. and SMITH, G.S. (1963): Field acids in the diagnosis of bovine vitamin A deficiency. *Vet. Med.* 58, 875-880.
15. JOHNSON, B.C. and WOLF, G. (1960): The function of vitamin A in carbohydrate metabolism, its role in adrenocorticoid production. *Vitam. Hor.*, 18, 457-483.
16. KEATING, E.K., HALE, W.H. and HUBBERT, F.JR. (1964): In vitro degradation of vitamin A and Carotene by rumen liquor. *J. Anim. Sci.*, 23(1): 111-117.
17. KOLB, E. (1971): "Vitamine und Vitaminmangelkrankheiten" 815-921, In: (Herausgeber; Kolb, E. und Gürtler, H. — *Ernaehrungsphysiologie der landwirtschaftlichen Nutztiere*, VEB, Gustav Fischer, Verlag, Jena).
18. LAWRENCE, C.W., CRAIN, F.D., LOTSPEICH, F.S. and KRAUSE, R. (1966): Absorption, transport and storage of retinyl — 15 — ^{14}C — palmitate — 9, 10 — ^3H in the rat. *J. Lipid. Res.*, 7, 226-229.
19. LORAN, M.R., ALTHAUSEN, T.L., SPICER, F.W. and GOLDSTEIN, W.I. (1961): Transport of vitamin A across human intestine in vitro. *J. Lab. Clin. Med.*, 58, 622-626.
20. MAHADEVAN, S., SESHADRI SASTRY, P. and GANGULY, J. (1963): Studies on metabolism of vitamin A. 3. The mode of absorption of vitamin A esters in the living rat. *Biochem. J.*, 88, 531-534.
21. MAHADEVAN, S., SESHADRI SASTRY, P. and GANGULY, J. (1963): Studies on metabolism of vitamin A. 4. Studies on the mode of absorption of vitamin A ester in the living rat — *Biochem. J.*, 88, 534-539.
22. MAHADEVAN, S., AYYOUB, N.I. and ROELS, O.A.C. (1966): Hydrolysis of retinal palmitate by rat liver. *J. Biol. Chem.*, 241, 57-64.
23. MEE, J.M.L. and STANLEY, R.W. (1974): Association between blood vitamin A and packed cell volume in dairy animals. *Nutr. Report International*, 9(6), 401-406.
24. MURTHY, S.K. and GANGULY, J. (1962): Studies on cholesterol esterases of the small intestine and pancreas of rats. *Biochem. J.* 83, 460-469.
25. NOBILE, S. (1968): Relationship between levels of ubiquinones (Coenzymes Q) and vitamin A in livers of Australian sheep and cattle. A possible method for determining vitamin A status in cattle and sheep. *Austr. Vet. J.* 44, 1-6.
26. OLSON, J.A. (1961): The conversion of radioactive β -Carotene into vitamin A by the rat intestine in VIVO, *J. Biol. Chem.*, 236, 349-356.

27. OLSON, J.A. (1964): Effect of bile and bile salts on the uptake and cleavage of β -Carotene into retinal ester by intestinal slices. *J. Lipid Res.*, 5, 402-408. Alınmıştır: Olson, J.A. (1967): The metabolism of vitamin A. *Pharmacol. Rev.* 19 (4), 559-596.
28. OLSON, J.A. (1967): The metabolism of vitamin A. *Pharmacol. Rev.* 19(4), 559-596.
29. PLACK, P.A. (1965): Occurrence, absorption and distribution of vitamin A. *Proc. Nutr. Soc.*, 24, 146-153.
30. SERIF, G.S. and BREVIK, A.K. (1960): Effects of butyl-4-hydroxy-3,5-diiodobenzoate on the conversion of β -Carotene to vitamin A in the rat. *J. Biol. Chem.*, 235, 2230-2232.
31. SHELLENBERGER, T.E., PARRISH, D.B. and SANFORD, P.E. (1964): Absorption of preformed vitamin A from ligatured poultry intestinal sections. *J. Nutr.* 82, 99-105.
32. SKALA, I. and HRUBA, F. (1964): Accumulation of vitamin A by small intestine of the rat in vitro. *Am. J. Physiol.*, 206, 458-460.
33. SMITH, S.E. (1970): "Vitamins", 634-659. In: (Ed., Swenson, M.J. - *Duk's Physiology of Domestic Animals*. 8. Edn. Cornell University Press, Ithaca and London, XV + 1463.
34. STROHECKER, R. and HENNING, H.M. (1965): *Vitamin Assay, Tested Methods*, Verlag Chemie, GmbH, Weinheim/Bergstr.
35. TENNANT, B.C. and EWING, G.O. (1971): "Gastrointestinal Function", 111-113. In: (Ed.; Kaneko, J.J. Cornelius C.E. — *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 2. Edn., Vol. II. Academic Press, New York and London, XV + 352.
36. THOMPSON, S.Y. (1965): Occurrence, distribution and absorption of provitamin A. *Proc. Nutr. Soc.*, 24, 136-146.
37. TOMLINSON, J.E., MITCHELL, G.E., BRADLEY, N.W., TUCKER, R.E., BOLING, Y.A., SCHELLING, G.T. (1974): Transfer of vitamin A from bovine liver to milk. *J. Anim. Sci.* 39 (4), 813-817.
38. VAUGHAN MITCHELL, G., GEWARD, C.R. and SPIVEY FOX, M.R. (1969): Effect of vitamin A deficiency on mitochondrial lipids in rat liver. *J. Nutr.* 97, 8-12.
39. VEDANAYAGAM, K. (1966): Studies on the vitamin A and carotene content in the blood plasma of cattle. *Indian Vet. J.* 43, 209-212.
40. VEEN, M.J. and BEATON, G.H. (1966): Vitamin A transport in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 44, 521-527.
41. VUILLEUMIER, J.P., PROBST, H.P., BRUBACHER, G. (1967): Vitamine, Provitamine und Carotinoide, In: *Handbuch für Lebensmittelchemie*, Vol. II/2. Teil, Ed.; C. Acker, K.G. Bergner, W. Diemair, W. Heimann, F. Kiermeier, O. Schormüller, S.W. Souci. Berlin, Göttingen, Heidelberg, Springer, Verlag.
42. WALD, G. (1960): The visual function of the vitamin A. *Vitam. Hor.* 18, 417-430.

43. WOLF, G. and JOHNSON, B.C. (1960): Vitamin A and mucopolysaccharide biosynthesis. *Vitam. Hor.* 18, 439-455.
44. WYNGAARDEN, J., WRIGHT, B.M. and WAYS, P. (1952): The effect of certain anions upon the accumulations and retention of iodine by the thyroid gland. *Endocr.* 50, 537-549.
45. ZACHMAN, R.D. and OLSON, J.A. (1963): The uptake of C^{14} - β -Carotene and its conversion to retinal ester (Vitamin A ester) by the isolated perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 238, 541-546.