بررسی تغییر مقدار ویتامین D3 در شیر گاو منطقه ی ساری در سه ماه اول سال

محمد رضا سعیدی اصل[1] *، رضا صفری[2]، زهرا یعقوب زاده[2]، سلیمان غلامی پور[2]
[1]استادیار گروه علوم وصنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار(مسوول مکاتبات)
پست الکترونیک: mrezasaeidi@yahoo.com
[2]اعضای هیات علمی بخش بیوتکنولوژی پژوهشکده ی اکولوژی آبزیان دریای خزر ساری
تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۲۵

چکیده

شیر در اشکال متفاوت (کامل و دارای درصدهای مختلفی از چربی ، پاستوریزه و ...) دارای مقادیر متغیری از ویتامین‌های محلول در چربی می‌باشد. روش‌ها و تکنیک‌های مختلفی از جمله اسپکتروفتومتر، گاز کروماتوگرافی به منظور آنالیز کمی و کیفی ویتامین‌های محلول در چربی شیر انجام گرفته ولی حساسیت آن ها بالا نبوده و ممکن است مقدار واقعی ویتامین‌ها را نشان ندهد. از مهم‌ترین تکنیک‌های مورد استفاده می‌توان به روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا اشاره نمود که از حساسیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد. در تحقیق حاضر با استفاده از تکنیک مذکور مقادیر ویتامینD3 در شیر خام کارخانه ی شیر پاستوریزه ساری در سه ماه اول ۱۳۸۶ مورد بررسی قرار گرفت. روش آماده سازی نمونه و قرائت با دستگاه HPLC با استفاده از منبع AOAC انجام گرفت. نتایج نشان داد که میانگین و انحراف معیار ویتامین D3 در سه ماه فروردین ، اردیبهشت و خرداد به ترتیب۵۶ ± ۲۰۲/۶، ۴۴/۲۸ ± ۱۹۶/۵، ۴۱/۶۲ ± ۱۵۹/۷ واحد بین‌المللی بر میلی لیتر بوده است. تغییرات میزان ویتامین در ماه‌های مختلف معنی‌دار می‌باشد. مقایسه ی نتایج این تحقیق با سایر مطالعات نشان می‌دهد که غلظت ویتامین D3 به عوامل مختلف از جمله تغییرات فصلی ، نورخورشید ، نژاد گاو شیرده و نوع تغذیه بستگی دارد. نتیجه‌گیری کلی آن که شیر خام دارای مقادیر کمی از ویتامین D3 بوده و نیاز به غنی سازی شیر با ویتامین‌های سنتتیک می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ویتامین D3 ، شیر خام ، کروماتوگرافی مایع با فشار بالا

۱- مقدمه

شیر سوسپانسیون کلوئیدی است که از مواد جامد در محیط مایع تشکیل می‌گردد. شیر کامل دارای ۸۸٪ آب ، ۸/۶٪ مواد جامد غیر چربی و ۳/۴٪ چربی می‌باشد. از مهم‌ترین ویتامین‌های محلول در چربی می‌توان به ویتامین D اشاره نمود. ویتامین D به ترکیبات استروئیدی محلول در چربی گفته می‌شود. دو فرم از این ویتامین با نام‌های آرگوکلسیفرول (D2) و کوله کلسیفرول (D3) وجود دارند. ویتامین D3 با مکانیسم هیدروکسیلاسیون در کبد و کلیه به هورمون استروئیدی فعال ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D3 و ویتامین D2 به ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D2 تبدیل می‌شود. یک میلی گرم

ویتامینD معادل ۴۰۰۰۰ واحد بین‌المللی است. ویتامین D3 از طریق واکنش فوتوشیمیایی از ۷ دهیدروکسی کلسترول در پوست تولید می‌شود. ویتامین D2 از آرگوسترول در گیاهان و قارچ‌ها تشکیل می‌شود (۴) .

ویتامین D در برخی از غذاها نظیر ماهیان چرب ، روغن ماهی ، کبد ، شیر و تخم مرغ یافت می‌شود. در بیش تر کشورهای صنعتی مثل انگلیس ، شیر فرآیند شده ، برخی از شیرهای پودری ، مارگارین ، نان و شکلات ، غنی از ویتامین D می‌باشند. شیر انسان حاوی سطح پائینی از ویتامین D می‌باشد. یک فنجان شیر غنی شده با ویتامین D دارای ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D می‌باشد. تعیین مقدار دقیق و مورد نیاز ویتامین D مشکل است ، زیرا این ویتامین به طور طبیعی و از طریق نور خورشید تولید می‌شود. از این‌رو مقدار دقیق آن قابل بررسی کمی نمی‌باشد (۵).

کمبود دراز مدت ویتامین D3 در نوزادان و بچه‌ها باعث نرمی استخوان می‌شود. در بزرگسالان کمبود این ویتامین باعث استئومالاسی می‌گردد. علائم این بیماری شامل دردهای اسکلتی ، ضعف عضلانی و ضایعات پاتولوژیک ، کمبود نسبی ویتامین D همراه با هیپرپاراهیدروزیسم ثانویه و افزایش ضایعات استخوانی می‌باشد (۹) .

آکتینومایسین و عوامل ضد قارچی ایمیدازول با فعالیت ویتامین D مغایرت داشته و این عمل را با مهار کردن تبدیل ۲۵ هیدروکسی ویتامین D به ۲۵ و ۱ هیدروکسی ویتامین D توسط آنزیم‌های کلیوی انجام می‌دهند (۲۵ هیدروکسی ویتامین D – ۱ هیدروکسیلاز). سرب نیز باعث مهار سنتز ویتامین D می‌شود.

جذب ویتامین D از طریق روده ی کوچک و به صورت میسل‌های وابسته به نمک‌های صفراوی انجام گرفته ، گردش آن در بدن از طریق لنف صورت می‌گیرد. جذب مشتقات قطبی نظیر ۲۵ هیدروکسی ویتامین D کم تر وابسته به نمک‌های صفراوی می‌باشد. این مشتقات به طور معنی‌داری در غذا و افزودنی‌های غذایی وجود نداشته اگر چه مقادیر بسیار جزئی از ۲۵ هیدروکسی ویتامین D در گوشت و شیر یافت می‌شود (۹).

افرادی که دچار صرع، بیماری‌های قلب و عروق ، اسهال مزمن ، اختلالات کلیه ، کبد یا لوزالمعده ، مشکلات روده‌ای و سارکوئیدوز (بیماری سیستم ایمنی) هستند ، قبل از مصرف ویتامین D باید با پزشک خود مشورت نمایند. زنانی که در دوران حاملگی یا شیردهی هستندنباید بیش از حد مجاز از ویتامین D استفاده نمایند (۹).

از آن جایی که ویتامین D توسط بدن تولید شده و به مدت زیادی در بافت باقی می‌ماند نمی‌توان نیازمندی روزانه نسبت این ویتامین را دقیقاً مشخص نمود. نیاز به این ویتامین به فاکتورهای مختلف از جمله سن ، جنسیت ، میزان در معرض قرار داشتن در برابر نور خورشید ، فصول و مقدار پیگمانتاسیون پوست بستگی دارد.(۱۹، ۱۲، ۱۰) به طور متوسط مقدار غلظتی از ویتامین D که باید هر فرد روزانه دریافت نماید در حدودIU ۴۰۰- ۲۰۰ می‌باشد. اخیرا توسط انستیتو غذا و تغذیه ایالات متحده میزان نیاز روزانه ویتامین D را برای نوزادان ، بچه ها و بزرگسالان مرد و زن تا حدود سن ۵۱ در

حدود 200IU / روزانه (روز / 5mg) و در خانم‌های بالاتر از ۵۱ سال و مردان بالاتر از ۷۰ سال میزان دریافتی ویتامین D3 در حدود روز / 400 IU یا 600IU گزارش شده است (۱ و ۳).

در ارتباط با آنالیز کمی و کیفی ویتامین D با استفاده از دستگاه HPLC نیز مطالعاتی انجام گرفته است. Vanden Berg در سال ۱۹۸۶ از دستگاه HPLC به منظور آنالیز کمی وکیفی ویتامین D در شیر خشک غنی شده از ویتامین D و غنی نشده استفاده نمود. با استفاده از این روش تا غلظت‌های ۰/۱ نانو گرم از این ویتامین را می‌توان ردیابی نموده و تشخیص داد (۱۸).

به منظور جبران ویتامین‌های محلول در چربی از ویتامین‌های سنتتیک به منظور غنی سازی محصول تولید شده استفاده می‌گردد. فرآیند غنی سازی شیر با استفاده از ویتامین D در کودکان مدرسه ای و همچنین افراد پیر گزارش شده است. از جمله ی این ویتامین‌ها می توان به ویتامین D3 اشاره نمود که به صورت روتین در ایران انجام گرفته و با درصد خاصی به شیر خشک نوزادان اضافه می گردد (در شیرهایی که کم تر از IU ۱ در گرم ویتامینD3 دارند) .در غنی سازی شیرهای بسته بندی شده باید به این نکته توجه داشت که مقدار ویتامین D3 بیش تر از حد استاندارد باعث بروز عوارض دیگر که ناشی از مصرف بالای ویتامین D می‌باشد، نگردد (۱۱ ، ۱۳ ، ۱۴). نتایج تحقیقات در ایالات متحده حاکی از آن است که ۲۰٪ از افراد بالای ۶۵ سن دچار هیپرویتامینوز هستند (۹).

در سال ۲۰۰۲، Upreti و همکارانش اقدام به غنی سازی پنیر پاستوریزه با ویتامین D3 نموده و تغییرات این ویتامین را در طی فرآیند تولید مورد آزمایش قرار دادند. وی از روش صابونی کردن قلیایی در۷۰ oC به مدت ۳۰ استفاده کرده ، عمل استخراج را با استفاده از اترپترولیوم انجام داده و در نهایت با استفاده از HPLC تعیین غلظت نمود (۱۷). Upreti در خط تولید پنیر از ویتامین D3 به میزان 100IU/28g استفاده نموده و نتایج انتهای فرآیند نشان داد که ویتامین D3 بدون هیچ‌گونه تغییری باقی می‌ماند. نتایج تحقیق وی حاکی از آن است که در طول ۹ ماه نگه داری پنیر در دمای ۲۱-۲۹C^o و۶-۴ C^o هیچ گونه تغییری در غلظت ویتامین D3 ایجاد نمی شود، ولی به هنگامی که پنیر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۳۲C^o قرار داده شود ، در حدود ۳۰-۲۵ ٪ از غلظت ویتامین D3 کاسته می‌گردد. نتایج همچنین نشان داد که اضافه نمودن ویتامین هیچ گونه تغییری در بو و طعم پنیر ایجاد نمی‌کند (۱۷).

فرآورده‌های حیوانی دارای مقادیر بسیار بالایی از ویتامین D بوده که به طور طبیعی در غذاهای غنی شده وجود دارند. ماهیان آب شور نظیر هرینگ ، سالمون ، ساردین و روغن کبد ماهی منابع بسیار خوبی از ویتامین D3 می‌باشند. مقادیر کم تری از ویتامین D3 در تخم مرغ ، گوشت گوساله ، کره ، روغن گیاهی وجود دارد. گیاهان ، میوه جات ، تنقلات از نظر دارا بودن ویتامین D فقیر می‌باشند. در ایالات متحده آمریکا ، شیر مصرفی ، کره، مارگارین ، غلات و شکلات با درصدهای

مختلفی از ویتامین D غنی‌سازی شده تا مقدار مجاز ویتامین D در غذا رعایت گردد (۱۶). نتایج نشان داده که میزان ویتامین D3 در شیر گاو در حدودIU ۷۰-۳۵ بوده است(اندازه گیری با استفاده از روش بیولوژیکی). در صورتی که با انجام آزمایش های اسپکتروفتومتری مشخص گردید که میزان ویتامین D3 در حدودIU ۸۰-۵۰ می‌باشد (۱).

تحقیقات Luce و همکارانش حاکی از آن است که میزان ویتامین D در شیر گاوی که به چراگاه برده می‌شود بیش تر از گاوهایی است که در مکانی تاریک نگه داری می‌شوند. به عبارت دیگر نور خورشید در گاوهای شیرده باعث افزایش ویتامین D در شیر آن ها می‌شود. او به این نتیجه رسید که غلظت فاکتور ضد راشیتیستم در شیر گاو بستگی به نوع جیره غذایی و همچنین درجه دریافت نور توسط گاو دارد (۱۵) . Chick و همکارانش پی بردند که ۰/۲۵گرم از چربی شیر گاو تغذیه شده در مرتع برابر با ۰/۶ گرم از چربی شیر گاو تغذیه شده از علف در جای تاریک بوده است. نور خورشید میزان ویتامین D آن را تا ۲ برابر افزایش می‌دهد (۶). Dutcher و همکارانش میزان ویتامین D را در گاوهایی که در معرض نور خورشید قرار داشتند ، مورد ارزیابی قرار دادند و نتایج نشان داد که غلظت ویتامین D بیش تر از گاوهایی بود که در جای تاریک قرار داشتند (۸) .

۲-مواد وروش ها

نمونه‌های مورد بررسی شامل شیرهای خام کارخانه ی شیر پاستوریزه ساری بوده که از مناطق مختلف شهرستان ساری جمع آوری و تحویل کارخانه داده می شد (مرکز جمع‌آوری). تعداد نمونه‌ها ۶۰ عدد بود که در سه ماه اول سال ۱۳۸۶ مورد آزمایش قرار گرفتند. تعداد نمونه‌های مورد بررسی در هر ماه ۲۰ نمونه بوده است .

نمونه‌برداری به صورت تصادفی انجام گرفته بدین ترتیب که نمونه‌های شیر خام از چند جایگاه نمونه‌برداری شده و پس از مخلوط شدن به عنوان یک نمونه واحد در نظر گرفته شد. دلیل انجام این کار تحویل شیرهای مختلف با درصد چربی‌های متفاوت به کارخانه بوده که می‌توانست در نتیجه ی کار تاثیرگذار باشد. نمونه‌ها در کنار زنجیره سرد به آزمایشگاه شیمی پژوهشکده ی اکولوژی دریای خزر انتقال داده شد و پس از آماده‌سازی اولیه ، با استفاده از دستگاه HPLC قرائت و مقدار کمی ویتامین D3 مشخص گردید.

به لحاظ نمونه‌برداری تدریجی از کارخانه ، نمونه‌ها به سرعت و در حداقل زمان (۲ تا ۳ ساعت) مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. در بررسی نمونه‌ها به لحاظ بررسی مخلوط نمونه‌های مختلف نیاز به یکسان سازی چربی نبود.

۲-۱- آماده سازی محلول نمونه

به ۳۰۰-۲۰۰ میلی لیتر از شیر خام مقدار مشخصی از اتانول ، سدیم اسکوربات و پتاس اضافه نموده و به مدت ۴۵ دقیقه عمل رفلاکس انجام گرفت. پس از سرد شدن ، محلول رفلاکس دو بار با آب مقطر، اتانول و اتر دو پترول شست و شو داده شد. پس از انتقال محلول شست و شو یافته به قیف جدا کننده و جدا شدن لایه‌های مختلف ، لایه آبی را به قیف دیگر انتقال داده و عمل شست و شو (چندین مرتبه) با اتانول و پنتان انجام گرفت. پس از این مرحله ، فاز آبی را دور ریخته و فاز پنتانی را به قیف دیگر انتقال داده و سه مرتبه با محلول پتاس ۳ درصد شست و شو داده و سپس محتویات استخراجی با معرف فنل فتالئین تا مرز خنثی شدن شست و شو داده شدند. محلول به دست آمده از این مرحله را آبگیری کرده ، به پنتان آبگیری شده، آنتی اکسیدان اضافه کرده و به وسیله ی دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا خشک شدن کامل تبخیر گردید. باقی مانده ی خشک شده را در ۲ میلی لیتر مخلوط تولوئن و فاز متحرک (تولوئن ـ هگزان) با نسبت ۹۵:۵ حل کرده و محلول فوق جهت تزریق به دستگاه HPLC(مدل CECIL انگلیس، ستون ODS، طول موج UV = 254 نانومتر، Flow/Rate: 1 ml/min، Mobile Phase : Methanol، Range : 0.5 و INJ: 100 میکرولیتر) جهت شناسائی و تعیین مقدار ویتامین‌ها استفاده گردید (۱۳). ستون تصفیه را قبل از به کار گیری با مخلوط الکل آمیلیک و هگزان به نسبت (۹۰ +۱۰) با جریان ۶ میلی‌لیتر در دقیقه به مدت حداقل ۱۵ دقیقه شست و شو داده ، سپس با فاز متحرک ، عمل شست و شو حداقل به مدت ۲۰ دقیقه ادامه یافت (۱، ۲، ۴، ۱۳، ۱۴).

۲-۲- تهیه ی محلول استاندارد از ویتامین‌ها

وزن مشخصی از مخلوط استانداردهای مورد نظر را به‌یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری انتقال داده و در مقداری تولوئن حل کرده و با همان تولوئن به حجم رسانده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول را به‌یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری دیگر منتقل کرده و با فاز متحرک (تولوئن ـ هگزان) به حجم رسانده شد. پس از این مرحله، ۲۵ میلی لیتر از محلول فوق را مجددا به‌یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری منتقل نموده و با فاز متحرک، به حجم رسانده شده که بر اساس نوع غلظت هر یک از استانداردها ، واحد بر حسب IU/m1 غلظت محاسبه گردید.

۲-۳- کالیبر کردن دستگاه HPLC

با توجه به تهیه ی استاندارد طبق دستور العمل بالا، ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر از استاندارد را به دستگاه تزریق نموده و زمان بازداری ستون آنالیز و ستون تصفیه و بلندی پیک‌های ویتامین‌ها ، با توجه به تغییرات احتمالی فاز متحرک، مشخص شد.

۳- نتایج و بحث

میانگین و انحراف معیار ویتامین D3 در ماه‌های فروردین ، اردیبهشت و خرداد به ترتیب ۵۶/۷ ± ۲۰۲/۶، ۴۴/۲۸ ± ۱۹۶/۵، ۴۱/۶۲ ± ۱۵۹/۷ واحد بین‌المللی / میلی‌لیتر (IU) بوده است (جدول ۱و شکل ۱) . بیش ترین و کم ترین میزان ویتامین D3 به ترتیب ۳۱۰ و ۱۱۰ (فروردین) ، ۲۸۰ و ۱۳۰ (اردیبهشت) و ۲۵۰ و ۱۰۰ (خرداد ماه) بوده است (جدول۱). نتایج نشان می‌دهد که میانگین تغییرات ویتامین D3 در ماه‌های مختلف معنی‌دار نبوده است ($P<0.05$).

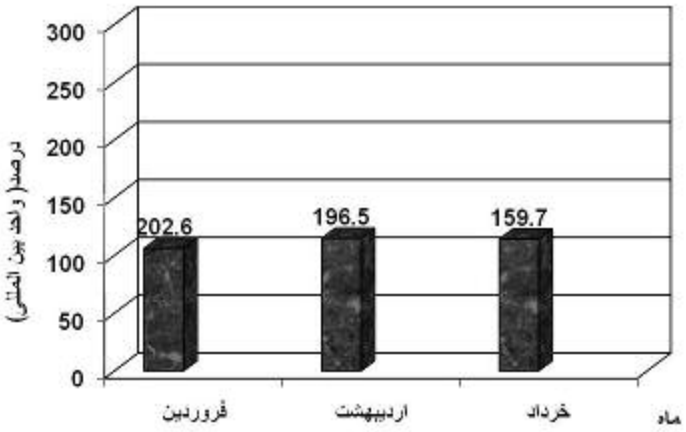
غلظت ویتامین D3 در شیر حاوی ۲٪ چربی، حدود ۱۰۰IU می‌باشد (۵). نتایج این تحقیق حاکی از غلظت بیش تر ویتامین D3 در شیرهای خام نمونه‌برداری شده بوده است. دلیل بیش تر بودن این ویتامین ، آزمایش بر روی شیر خام بوده که دارای چربی بیش تری (۳ تا ۳/۵٪) بوده است . در فرآیند پاستوریزه نمودن شیر، میزان چربی و در نتیجه غلظت ویتامین‌های محلول در چربی کاهش می‌یابد (۱۷).

نتایج Ernest و همکارانش حاکی از آن است که درصد ویتامینD در فصول تابستان و پائیز دارای مقادیر بیش تری نسبت به فصول بهار و زمستان بوده است. بدین ترتیب که بیش ترین درصد ویتامین D در ماه‌های تیر، مرداد و شهریور و کم ترین مقدار آن نیز در ماه اسفند دیده شده است. تغییرات ویتامین D در شیر گاو هولشتاین از ۲۷/۷-۳/۱ (واحد هر لیتر/ usp) و مقدار آن در شیر گاو Guernsey از ۴۳/۸ – ۴/۸ (واحد هر لیتر / usp) در نوسان بوده است (۷). نتایج تحقیق حاضر و مقایسه ی آن با فصل بهار مطالعه Ernest و همکارانش ، نشاندهنده مقادیر کم تر ویتامین D در نمونه‌های مطالعه ی حاضر بوده است. بدین ترتیب که میانگین غلظت ویتامین D در فصل بهار در سال‌های ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۶ و سال های ۱۹۹۶ تا ۱۹۹۷ در گاو هولشتاین به ترتیبIU ۲۲۸ و ۲۸۳ بوده و میانگین غلظت ویتامین D در فصل بهار در سال های ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۶ و سال‌های ۱۹۹۶ تا ۱۹۹۷ در گاو Guernsey به ترتیب IU ۲۲۸ و ۲۷۰ بوده است (۷). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که میانگین غلظت ویتامین D3 در سه ماه مورد بررسی به ترتیب ۲۰۲/۶، ۱۹۶/۵ و ۱۵۹/۷ واحد بین‌المللی بوده است. همان طوری که اشاره شد اختلاف در غلظت ویتامین D به عوامل مختلف محیطی ، نژاد گاو ، نوع تغذیه و ... بستگی دارد.

۴- نتیجه‌گیری

هر چند میزان ویتامین D3 در شیر خام در حد نسبتاً قابل قبولی قرار دارد ولی به دنبال انجام فرآیندهای مختلف در شیر از قبیل پاستوریزاسیون و هموژنیزاسیون ، میزان ویتامین‌های محلول در چربی شیر از جمله ویتامین D3 کاهش یافته و از این‌رو شیر تولید شده نیاز به غنی‌سازی با این ویتامین داشته تا درصد کمبود جبران گردد. آنالیز ویتامین‌های محلول

در چربی با استفاده از دستگاه HPLC در کم تر مرکزی انجام گرفته است. برای دست یابی به نتایج مستدل در ارتباط با ویتامین‌های محلول در چربی نیاز به انجام آزمایش های کامل‌تر در شیرهای تولید شده در سایر استان‌ها است ، زیرا شرایط اقلیمی و آب و هوایی تاثیر بسزایی بر درصد ویتامین‌های محلول در چربی در شیر دارد.



شکل ۱: میانگین تغییرات ویتامین D3 در شیر خام نمونه برداری شده از کارخانه ی شیر پاستوریزه در شهرستان ساری

جدول ۱ – مقدار ویتامین D3 در شیرهای خام نمونه برداری شده از کارخانه ی شیر پاستوریزه ی ساری در فروردین ، اردیبهشت وخرداد ماه ۱۳۸۶ (بر حسب واحد بین المللی بر میلی لیتر)(میانگین ۳ تکرار در هر آزمایش)

ویتامین D3 (بر حسب واحد بین المللی بر میلی لیتر)							
ردیف	فروردین	اردیبهشت	خرداد	ردیف	فروردین	اردیبهشت	خرداد
۱	۱۶۰	۱۷۰	۱۵۰	۱۱	۱۳۰	۱۶۰	۱۸۰
۲	۱۸۰	۱۶۰	۱۹۰	۱۲	۱۸۰	۱۳۰	۱۳۰
۳	۱۳۰	۲۱۰	۱۸۰	۱۳	۲۹۰	۱۳۰	۲۱۰
۴	۱۹۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۴	۱۶۰	۲۰۰	۱۳۰
۵	۲۵۰	۲۸۰	۲۰۰	۱۵	۱۹۵	۱۸۰	۱۴۵
۶	۲۲۰	۲۲۰	۱۶۰	۱۶	۱۶۶	۱۶۰	۱۰۰
۷	۲۴۰	۲۰۰	۱۸۰	۱۷	۱۹۶	۱۹۰	۱۰۰
۸	۲۶۰	۲۷۰	۱۰۰	۱۸	۲۵۰	۲۲۰	۱۵۰
۹	۱۱۰	۲۳۰	۲۲۰	۱۹	۲۷۵	۲۵۰	۱۶۰
۱۰	۱۶۰	۱۵۰	۱۴۰	۲۰	۳۱۰	۱۷۰	۱۲۰

۵- منابع

1- Adachi,A. and Kobayashi,T. 1990. Identification of vitamin D3 and 7-dehydrocholesterol in cow's milk by gas chromatography-mass spectrometry and their quantitation by high- performance liquid chromatography. J.Nutr.Sci.Vitaminol. 25: 67-78.
2- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
3-Banville, C., Vuillemard, J. C., and Lacroix, C. 2000. Comparison of different methods for fortifying cheddar cheese with vitamin D. Int. Dairy J. 10:375–382.

4-Ball, G. F. M. 1992. The fat soluble vitamins. in : Food Analysis by HPLC. L. M. L. Nollet, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, NY. pp. 275–340.
5-Cremin, F. M., and Power, P.1985. Vitamin D in bovine and human milks. in : Developments in Dairy Chemistry. Vol. 3. P. F. Fox, ed. Elsevier Appl. Sci. Publ., Essex, England. pp. 337–398.
6- Chick, H. and Eosoe, M. H. 1992. Influence of diet and sunlight upon the amount of vitamin A and vitamin D in the milk afforded by a cow.Biocbem. J. 20: p. 632.
7- Ernest,H . and Hopport, C.A . 1999. A study of the seasonal variation of vitamin D in normal cow,s milk. Journal of Nutrition.11(6): 537-549.
8- Dutcher, R. A. and Honeyell, H. 1994. Feeding experiments with rats using butters furnished by Dr. J. S. Hughes of Kansas. Penna. Agr.Exp. Sta. 40th Am. Rep. Bui. 213, p. 4.
9- Fuleihan, G. Hajj, El. Nabulsi, M. Choucair, M. Salamoun, M. Shahine, C. H. Kizirian, A. and Tannous, R. 2001. Hypovitaminosis D in healthy schoolchildren. Pediatrics. 107:762– 763.
10- Harris,S.S. and Dawson-Hughes,B. 1998. Seasonal changes in plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations of young American black and white women. Am.J.Clin.Nutr. 67: 1232- 1236.
11- Hartman, A. M. and Dryden, L. P. 1995. Vitamins in milk and milk products. In: Fundamentals of Dairy Chemistry. 2nd ed. B. H. Webb, A. . Johnson, and J. A. Alford, ed. AVI/Van Nostrand Reinhold, New York, NY. pp. 325–401
12- Holick,M.F. 1995. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. Am.J.Clin.Nutr. 61 Suppl. 638S-645S.
13- Indyk, H. and Woollard, D. C. 1985a. The determination of vitamin D in fortified milk powders and infant formulas by HPLC. J. Micronutr. Anal. 1:121–141.
14- Indyk, H. and Woollard, D. C. 1985b. The determination of vitamin D in supplemented milk powders by HPLC. II: Incorporation of internal standard.N.Z. J. Dairy Sci Technol. 20:19–28.
15- LUCE, E. M. 1990 The influence of diet and sunlight upon the growth-promoting and antiraehitic properties of the milk afforded by a cow. Biochem.J. 18: p. 716 and p. 1279.
16-Renken, S. A. and Warthesen, J. J. 1993. Vitamin D stability in milk. J. Food Sci. 58:552– 556,566.
17- Uperti, p ., Mistry, V . and Warthesen, J. 2002. Estimation and Fortification of Vitamin D3 in Pasteurized Process Cheese. Dairy Sci. 85:3173-3181
18- Van den Berg, H. 1986. Determination of vitamin D in fortified and nonfortified milk powder and infant formula using a specific radioassay after purification by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. ; Vol/Issue: 34:2
19- Webb,A.R. and Holick,M.F. 1988. The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D3. Ann.Rev.Nutr. 8: 375-399.