

Atomik Absorbsiyon Spektrofotometrede Kan-Serumu Bakır ve Çinko Analizleri İçin Bazı Numune Hazırlama Yöntemlerinin Karşılaştırılmaları

Başaran KARADEMİR*

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2007/07-A

Özet

Bu araştırmada kan-serumu Cu ve Zn düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan deiyonize distile su (A), triton X-100 (%1) (B), Triklor asetik asit (%6) (C), hidroklorik asit (1 mol) (D), nitrik asit (1 mol) (E), sülfürik asit (1 mol) (G), perklorik asit (1 mol) (H) ve asetik asitlerle (1 mol) (K) seyreltme veya çöktürme metotlarının karşılaştırılması amaçlandı. Çalışma için ihtiyaç duyulan kanlar on iki adet sağlıklı koyundan alındı. Gruplara göre sonuçlar aşağıdaki şekildeydi (sırasıyla Cu, Zn, µg/dl); A: 106.78±9.03, 66.95±4.35, B: 103.51±9.33, 69.89±3.06, C: 123.87±10.66, 94.61±5.68, D: 127.30±10.21, 69.40±5.20, E: 148.35±10.69, 86.20±4.20, G: 128.70±9.13, 115.63±3.78, H: 132.86±11.41, 91.74±4.44, K: 102.18±8.49, 48.97±5.28.

Sonuç olarak, Cu ve Zn için en düşük düzeyler K grubunda gözlemlendi. En yüksek düzeyler Cu için E grubunda, Zn için G grubundaydı. A grubunun metodu araştırmalarda sıklıkla kullanılır. A grubu düzeyleri ile Cu için E grubu düzeyleri, Zn için G grubu düzeyleri arasında istatistik olarak fark vardı (P<0.05).

Anahtar sözcükler: Kan, serum, Cu, Zn, numune hazırlama, seyreltme, çöktürme.

Comparisons of Some Sample Preparation Methods for Blood-Serum Copper and Zinc at Atomic Absorption Spectrometer

Summary

The aim of this study was to compare some dilution or sedimentation methods with deionized distilled water (A), triton X-100 (1%) (B), trichloroacetic acid (%6) (C), hydrochloric acid (1 mol) (D), nitric acid (1 mol) (E), sulfuric acid (1 mol) (G), perchloric acid (1 mol) (H) and acetic acid (1 mol) (K) for using determination of blood-serum Cu and Zn levels. For the investigation, needed bloods were taken from twelve healthy sheep. According to groups results were as follows (Cu, Zn respectively, µg/dl); A: 106.78±9.03, 66.95±4.35, B: 103.51±9.33, 69.89±3.06, C: 123.87±10.66, 94.61±5.68, D: 127.30±10.21, 69.40±5.20, E: 148.35±10.69, 86.20±4.20, G: 128.70±9.13, 115.63±3.78, H: 132.86±11.41, 91.74±4.44, K: 102.18±8.49, 48.97±5.28.

Consequently, the lowest values for Cu and Zn were observed at the group K. The highest value for Cu was at the group E and for Zn was at the group G. The method of group A use at researches frequently. There was a significant difference between group A levels and group E levels for Cu and group G levels for Zn (P<0.05).

Keywords: Blood, serum, Cu, Zn, sample preparation, dilution, sedimentation.

İletişim (Correspondence)

Phone: +90 474 2426801/1242

e-mail: basarankarademir@gmail.com

GİRİŞ

Hayvansal organizmalar tüm vücut fonksiyonlarını normal bir şekilde sürdürebilmek için ihtiyaç duydukları besinleri dışarıdan almak zorundadırlar. Minerallerde de birçok enzim ve hormonun oluşumuna katkıda bulunur, organ ve dokuların yapısına girer, besinlerle birlikte dışarıdan alınmak zorundadır ¹⁻⁸.

Bakır vücutta hücre sel solunumda, kalp fonksiyonlarında, doku pigmentasyonunda bağ dokunun gelişiminde, merkezi sinir sisteminin fonksiyonlarında, derinin keratinizasyonunda ve hemoglobin sentezinde görevler üstlenmektedir ^{1,2,4,6,9}. Çinko birçok hormon ve enzimin yapısına girmekte veya oluşumunda görev almaktadır. Bu hormon ve enzimlere insülin, GH, TSH, FSH, ACTH, löysin amino peptidaz, alkalin fosfataz, karbonik anhidraz, laktat dehidrojenaz ve ribonükleaz örnek oluşturmaktadır ^{3,4,6,9,10}. Yine çinkonun sinir sistemi üzerinde nörofizyolojik etkilere sahip olduğu ve noksanlığında beyinde fonksiyonel bozuklukların geliştiği bildirilmektedir ^{11,12}.

Vücuda giren iz elementler kan proteinlerine bağlanarak vücuda dağılırlar ¹³. Kan serumundaki Cu ve Zn düzeylerinin Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre ile ölçümünün yapılabilmesi için numunelerin cihazın ölçümüne hazır hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla ölçüm sıvısının vizkozitesi ve elementin cihaz tarafından okunma sınırlarına getirilmesi önemli kısıtlardır ¹⁴⁻¹⁶. Analizler sırasında serum proteinlerinin interferensini önlemek için serum sulandırılmakta veya asitle işleme tabi tutulmaktadır ¹³.

Sulandırma oranları 1:1'den 1:20'ye kadar bildirilmektedir ^{9,13,17,18}. Yine sulandırma veya protein çöktürme materyali olarak deiyonize su ^{9,16,18}, triton X-100¹, triklor asetik asit (TCA) ^{10,13}, hidroklorik asit ^{13,17}, nitrik asit ^{17,19,20}, sülfirik asit ¹³, perklorik asit ^{17,20}, gliserol, n-butanol, n-propanol ¹⁴ gibi farklı bileşiklerin kullanıldığı bildirilmektedir.

Bu araştırmada Atomik Absorbsiyon Spektrofotometrede serum Cu ve Zn düzeylerinin tespitinde ön hazırlık olarak sulandırma veya protein çöktürme yöntemlerinden deiyonize distile su, triton X-100, TCA, hidroklorik asit, nitrik asit, sülfirik asit, perklorik asit, asetik asit kullanımlarının karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan materyali: Araştırmanın hayvan materyali-

ni Kafkas Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan, klinik muayene sonucuna göre sağlıklı oldukları tespit edilen, 2-4.5 yaşları arasındaki 12 dişi koyun oluşturdur.

Kan numunesinin toplanması: Kan numuneleri klinik muayene sonuçlarını takiben gerekli tüm zaptırap tedbirlerinden sonra Vena jugularisten alındı ²¹. Kan, tek kullanımlık iğne ile vakumlu PTFE tüplere alındı. Alınan kanlar yarım saat süresince oda ısısında bırakılarak pıhtılaşması sağlandı. Pıhtılaşan kanlar 3500 devirde 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar 1.5 ml'lik PTFE tüplere aktararak analizleri yapılmaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Çalışma gruplandırılmaları: Her bir sulandırma veya protein çöktürme sıvısı için A, B, C, D, E, G, H, K kodlarıyla 8 grup oluşturuldu. Her bir grupta kullanılacak sıvıların içerikleri ve oranları aşağıdaki şekildeydi; A: Deiyonize distile su, B: %1-Triton X-100, C: %6 TCA, D: 1 mol Hidroklorik asit, E: 1 mol nitrik asit, G: 1 mol sülfirik asit, H: 1 mol perklorik asit, K: 1 mol Asetik asit. Her grup için numuneler dörder kez hazırlandı. Bunlardan ikisi Cu ve Zn analizleri için kullanılırken ikisi ise geri kazanım (Recovery) çalışması için kullanıldı. Bu amaçla 1:1 oranında 1 ppm'lik standart solüsyonu, serum-sulandırma sıvısı karışımına eklenerek çıkan sonuçlar Balk ve ark'ın belirttiği gibi hesaplandı ²².

Laboratuar analizleri: Kan serumlarından Cu ve Zn analizleri, Thermo Elemental S4 model Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (AAS) cihazı (Thermo Electron Corporation, İngiltere) kullanılarak yapıldı. Ölçümler için alev sistemi kullanıldı. Serum örneklerine 1:2 oranında sulandırma solüsyonları eklenerek 80°C de 15 dakika bekletildi. Bu şekilde eklenen sıvıların serum proteinini daha kolay çöktürmesi sağlandı ¹³. Isıtma işleminden sonra 10000 devir/dk'da 10 dakika süreyle santrifüj edilerek oluşan çöktürmelerin ayrışması sağlandı. Üstte kalan sıvı kısım tek kullanımlık başka bir PTFE tüpe aktararak 10000 devir/dk'da 10 dakika süreyle ikinci kez bir daha santrifüj edildi. Üstteki sıvı kısım tek kullanımlık PTFE tüplere alınarak ölçümleri için AAS cihazına okutturuldu. Sulandırma oranları cihaza yüklendi. Böylelikle cihaz ölçüm sonuçlarını doğrudan ppm (mg/lt) olarak verdi. Ölçüm birimi, daha önce yapılmış başka araştırmalarla karşılaştırmanın kolay olabilmesi için µg/dl'ye çevrildi. Cihazın yaptığı ölçümlerin güvenilirliğini ortaya koymak için her 12 numunenin ölçümünden sonra cihaza yoğunluğu önceden belirlenen standart

solüsyonları okutturuldu. Bu ölçümler sırasında cihaza 6 okuma yaptırıldı, alınan 6 absorbands verisinin ortalamaları bir kontrol verisi olarak kabul edildi. Bu şekilde her grup için alınan toplam 8 kontrol verisi ise varyasyon katsayısının (CV) hesaplanmasında kullanıldı²².

İstatistik analizler: İstatistik analizler için SPSS for Windows, Release 10.0.1, Standard version (SPSS Inc.)²³ software programı kullanıldı. Gruplar arası farkın istatistik kontrolleri için One-Way ANOVA, grup verilerinin birebir karşılaştırmaları için Duncan testi kullanıldı.

BULGULAR

Cihazın çalışması sırasında yaptığı ölçümlerin güvenilirliğini ortaya koymaya yönelik CV test sonuçları Cu: %5.41, Zn: %4.95 şeklinde tespit edildi. Yine cihazın ve yapılan işlemlerin güvenilirliğini ortaya koymaya yönelik, bir diğer yöntem olan geri kazanım çalışması sonuçları ise Tablo 1 ve 2’de sunulmaktadır.

Isıtma işlemi sonrasında C, E, G ve H gruplarında tam bir protein çöküşü gözlemlendi. Bu gruplardaki

Tablo 1. Cu için gruplara göre geri kazanım (Recovery) oranları (n = 12, µg/dl).
Table 1. Recovery proportion for Cu according to groups (n = 12, µg/dl).

Gruplar	A	B	C	D	E	G	H	K
Ölçülen	106.78	103.51	123.87	127.30	148.35	128.70	132.86	102.18
İlave edilen	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Beklenen	103.39	101.75	111.94	113.65	114.35	114.35	116.43	101.09
Geri kazanılan	101.64	102.48	112.16	117.02	118.29	118.29	113.36	100.17
Oran (%)	98.31	100.71	100.20	102.96	103.45	103.45	97.369	99.09

Tablo 2. Zn için gruplara göre geri kazanım (Recovery) oranları (n = 12, µg/dl).
Table 2. Recovery proportion for Zn according to groups (n = 12, µg/dl).

Gruplar	A	B	C	D	E	G	H	K
Ölçülen	66.95	69.89	94.61	69.40	86.20	115.63	91.74	48.97
İlave edilen	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Beklenen	83.48	84.95	97.31	84.70	93.10	107.81	95.87	74.48
Geri kazanılan	84.13	84.06	95.47	85.05	92.11	106.98	93.48	76.28
Oran (%)	100.78	98.96	98.11	100.41	98.94	99.23	97.51	102.41

Tablo 3. Grupların İstatistik değerlendirmeleri ile birlikte serum Cu değerleri (n = 12).
Table 3. The values of serum Cu according to groups with statistical evaluations(n = 12).

Gruplar	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	%95 Güven aralığında alt ortalama değer	%95 Güven aralığında üst ortalama değer	En düşük düzey	En yüksek düzey
A	106.78 ^b	29.95	9.03	86.66	126.90	54.06	157.14
B	103.51 ^b	30.94	9.33	82.72	124.90	51.66	148.14
C	123.87 ^{ab}	35.34	10.66	100.13	147.61	51.66	184.50
D	127.30 ^{ab}	33.85	10.21	104.56	150.04	74.13	184.86
E	148.35 ^a	35.46	10.69	124.52	172.17	98.82	214.53
G	128.70 ^{ab}	30.30	9.13	108.35	149.05	80.58	188.04
H	132.86 ^{ab}	37.85	11.41	107.43	158.29	79.05	204.36
K	102.18 ^b	28.15	8.49	83.27	121.09	53.28	153.42

^{abc}: aynı sütunda ortak harf bulundurmayan değerler arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır (P < 0.05).

çökelti çok net bir şekilde oluşurken, üstte kalan sıvı kısım tamamen berrak ve saydam görünüşteydi. D grubunda homojen beyaz bulanık bir görüntü ortaya

yüksek ($P < 0.05$), G grubundan düşük düzeylerdeydi ($P < 0.05$). G grubunda, çalışmadaki en yüksek sonuçlar alındı (Tablo 4).

Tablo 4. Grupların İstatistik değerlendirmeleri ile birlikte serum Zn değerleri (n = 12).
Table 4. The values of serum Zn according to groups with statistical evaluations (n = 12).

Gruplar	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	%95 Güven aralığında alt ortalama değer	%95 Güven aralığında üst ortalama değer	En düşük düzey	En yüksek düzey
A	66.95 ^c	15.05	4.35	57.39	76.51	45.81	101.70
B	69.89 ^c	10.59	3.06	63.16	76.52	52.92	86.25
C	94.61 ^b	19.66	5.68	82.12	107.10	61.29	127.80
D	69.40 ^c	18.00	5.20	57.97	80.83	32.82	88.11
E	86.20 ^b	14.53	4.20	76.97	95.44	54.15	105.96
G	115.63 ^a	13.09	3.78	107.31	123.94	87.54	133.98
H	91.74 ^b	15.37	4.44	81.97	101.51	56.64	108.24
K	48.97 ^d	18.30	5.28	37.34	60.60	0.48	68.61

^{abc}: aynı sütunda ortak harf bulundurmeyen değerler arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır ($P < 0.05$).

çıkarken, iki defa santrifüj edilmesine rağmen belirgin bir çökelti şekillenmedi. Üstte kalan sıvı kısmının hiç berraklaşmadığı, bulanıklığını AAS'de okutulmaya verirken bile muhafaza ettiği gözlemlendi. A ve B gruplarında önemli bir çökelti gözlenmemekle birlikte üstte kalan sıvı kısım ise C, E, G ve H gruplarındaki kadar olmasa bile berrak ve saydamdı. K grubundaki numuneler ise A ve B gruplarındaki numuneler gibi önemli bir çökelti şekillenmedi, fakat bunların üstte kalan sıvı kısımları A ve B gruplarına göre biraz daha bulanık görüntü verdi.

Cu'nun analiz sonuçlarına bakıldığında A, B ve K gruplarının birbirine yakın değerler verdiği (minimum $P = 0.061$) gözlemlendi. Sonuçlara göre E grubu verileri ise en yüksek düzeydeydi. A, B, K grupları ile E grubu arasında istatistikî bir fark tespit edildi ($P < 0.05$). C, D, G ve H grupları kendi aralarında birbirine yakın değerlerdedi. Bununla birlikte diğer gruplarla sayısal bir farklılık olmasına rağmen, aralarında istatistikî bir fark bulunamadı ($P > 0.05$) (Tablo 3).

Zn analiz sonuçlarında hem sayısal hem de istatistikî farklılıklar görüldü. K grubu A grubundan bile ($P < 0.05$) daha düşük sonuçlar verdi. A, B ve D grupları birbirlerine yakın değerler verirken aralarında istatistikî bir fark bulunamadı ($P > 0.05$). C, E ve H grupları kendi aralarında birbirine yakın sonuçlar verirken (minimum $P = 0.224$) A, B, D ve K gruplarından

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bakır ve çinkonun klinik önemlerinden dolayı, bunların biyolojik materyal içerisindeki düzeylerinin ortaya konulması önem arz etmektedir. Pratikte bu mineraller için kan düzeylerinin belirlenmesinde, numune hazırlama metodunun kolay olması nedeniyle deiyonize suyla seyreltme metodu sıklıkla kullanılmaktadır^{9,16,18,19}. Fakat vücuda alınan minerallerin daha çok plazma proteinlerine bağlanarak ilgili yerlere ulaştırılması¹³ plazma proteinlerinin ölçümü sırasında interferenz oluşturma olasılığını aklı getirmektedir. Bu amaçla, özellikle kan numunelerinin (total kan, serum, plazma) asitle muamele edilmesi ortamdaki proteinlerin çökteltilerek olumsuz etkisini ortadan kaldırmış olacaktır^{10,13,17}.

Çalışmada elde edilen Cu değerleri gruplara göre ortalama $102.18 \pm 8.49 \mu\text{g/dl}$ ile $148.35 \pm 10.69 \mu\text{g/dl}$ arasında değişmektedir (Tablo 3). Bu değerler, Altıntaş ve Fidancının²⁴ belirttiği $50-250 \mu\text{g/dl}$ aralığında bulunmasıyla birlikte bazı çalışma gruplarının verileri arasında istatistikî önem tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Gruplar arasındaki bu farklılığın sebebi minerallerin kan proteine farklı düzeylerde bağlanmalarından kaynaklanmış olabilir. Farklı kaynaklarda ise koyun serum Cu değerleri $75.04 \pm 6.58-80.10 \pm 7.49 \mu\text{g/dl}$ ³, $126.74 \pm 18.92 \mu\text{g/dl}$ ⁴, $1.17 \pm 0.04 \text{ mg/l}$ ¹, $54.50 \pm 4.60-114.20 \pm 7.10 \mu\text{g/dl}$ ²⁵ şeklinde bildirilmektedir.

Değer ve Dedenin¹³ yaptıkları çalışmada serum Cu değerleri HCl ile muamele edilen grupta 86.11 ± 2.83 µg/dl, TCA ile muamele edilen grupta 43.13 ± 1.56 µg/dl olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada HCl ile sulandırmada (D grubu) Cu 127.30 ± 10.21 µg/dl, TCA ile sulandırmada (C grubu) ise 123.87 ± 10.66 µg/dl olarak bulunmuştur. Sunulan bu çalışmada Cu analizi için iki grup arasında istatistikî fark bulunmazken, Değer ve Dedenin bulgularında farklılığın yüksek düzeyde olduğu görülmektedir. Söz konusu bu farklılık laboratuvar analizlerindeki metodolojik farklılıktan kaynaklanmış olabilir.

Bu araştırmadaki Zn değerleri gruplara göre ortalama 48.97 ± 5.28 µg/dl'den 115.63 ± 3.78 µg/dl'ye kadar değişmektedir (Tablo 4). Altıntaş ve Fidancı²⁴ koyun normal serum çinko değerini $80-120$ µg/dl olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda gruplar arasında istatistikî farklılıklar gözlemlendi ($P < 0.05$). Farklı çalışmalarda koyunların serum Zn bulguları $0.302 \pm 0.129-1.001 \pm 0.495$ µg/ml¹⁰, $38.72 \pm 5.36-40.56 \pm 5.61$ µg/dl³, 113.14 ± 15.22 µg/dl⁴, 1.05 ± 0.04 mg/l¹, $7.14 \pm 1.80-50.90 \pm 19.10$ µg/dl²⁵ şeklinde bildirilmektedir.

Değer ve Dede'nin¹³ çalışmalarında Zn için serumun HCl ve TCA ile muamelelerinde sırası ile 45.47 ± 1.43 µg/dl ve 36.04 ± 5.10 µg/dl değerleri bildirilmiştir. Sunulan bu çalışmada ise aynı sırayla değerler 69.40 ± 5.20 µg/dl (D grubu) ve 94.61 ± 5.68 µg/dl (C grubu) olarak bulunmuştur. Her iki çalışmada da gruplar arasında istatistik farklılık bildirilmesine rağmen bu çalışmadaki bulgularda TCA grubu sonuçları daha yüksekken diğer çalışmada HCl grubundaki değerler daha yüksek bulunmuştur. Farklılık laboratuvar metodolojisindeki farklılıktan kaynaklanmış olabilir.

Sunulan bu araştırmada Zn için A, B ve D grupları arasında istatistikî fark gözlemlenmedi. Bu durum Zn için aynı A ve B gruplarında olduğu gibi bir protein çöktürme olayının olmadığını ortaya koymaktadır. Makroskopik olarak net bir şekilde proteinleri çökerek ayrılan C, E, G ve H gruplarının değerleri, çökelti vermeyen A, B, D, K gruplarından istatistik olarak da yüksek bulunmuştur. Proteinleri çöken C, E, G ve H gruplarından, G grubu değerleri C, E ve H grubu değerlerinden daha yüksek düzeyde bulunurken ($P < 0.05$), bu grupların Zn değerleri arasında istatistik fark gözlemlenmemiştir ($P > 0.05$). Çalışma D, E, G, H ve K gruplarında kullanılan asitler 1 mol olarak hesaplanmıştır. G grubu hariç diğer gruplarda kullanılan asitlerin tesir değerlikleri biriken D grubunda kullanılan

sülfürik asidin tesir değeri iktir. G grubu ile C, E ve H grupları arasındaki fark bu tesir değeri farklılığından kaynaklanmış olabilir (Tablo 4).

Çalışmada K grubunda da bir asit olan asetik asit kullanılmış olmasına rağmen hem bir çökelti oluşmamış hem de bulunan değerler deiyonize distile su kullanılan A grubuna göre hem sayısal hemde istatistikî ($P < 0.05$) olarak altında kalmıştır. Sonuçlara göre Asetik asitin hem Cu hem de Zn analizleri için serum proteinlerini çöktürme amaçlı kullanımına uygun olmadığı gözlemlenmiştir (Tablo 4).

Çalışma bulguları hem Cu hem de Zn analizleri için serum numuneleri hazırlanırken nitrik asit, sülfirik asit, TCA ve perklorik asitlerle yapılan asit muamele daha yüksek sonuçlar verdiği, bununla birlikte ön hazırlık aşamasında daha fazla zaman ve işçilik gerektirdiği belirlenmiştir. Buna karşın deiyonize distile su ile seyreltme yönteminin ise ön hazırlık aşamasının daha kolay ve kısa sürdüğü görülmüştür. Yöntemin kolaylığı açısından araştırmacılar sıklıkla deiyonize distile su ile seyreltme yöntemini tercih etmektedirler. Yapılacak olan çalışmalarda da bu yöntemin kullanılması sonuçların karşılaştırılması yönünde kolaylık sağlayabilir.

Sonuç olarak ilgili araştırmacılara, sonuçların daha iyi elde edilmesi gerekiyor, zaman ve işçilik harcamaları önemsizse Cu analizleri için nitrik asitle, Zn analizleri için sülfirik asitle çöktürme yöntemleri önerilebilir. Bunun yanı sıra zaman ve işçilikten tasarruf edilmesi gerekiyor ve daha önceki yapılan çalışmalarla kıyaslanması büyük önem arz ediyorsa deiyonize distile su ile seyreltme yöntemi önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. **Atasoy N:** Tiftik keçilerinin serum ve kıllarında bakır ile çinko düzeyleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(1-2): 44-47, 1998.
2. **Çimtay İ, Ölcü A:** Elazığ yöresinde klinik olarak sağlıklı görünen sığırlarda kan plazması ve kıl bakır değerleri üzerinde araştırmalar. *Tr J Vet Anim Sci*, 24, 267-273, 2000.
3. **Kaya N, Utlu N, Uyanık BS, Özcan A:** The serum zinc and copper values of the Morkaraman and Tuj sheep grown up in the pasture condition in and around Kars. *Tr J Vet Anim Sci*, 22, 399-402, 1998.
4. **Kurt D, Denli O, Kanay Z, Güzel C, Ceylan K:** Diyarbakır bölgesinde Akkaraman koyunlarında kan serumunda Cu, Zn, Se ve yünde Cu, Zn düzeylerinin araştırılması. *Tr J Vet Anim Sci*, 25, 431-436, 2001.
5. **McDowell LR:** Minerals in animal and human nutrition. Academic Press Inc. London, 1992.
6. **Ozan S:** Karacabey merinos koyunlarında yapağı dökümü ile

- kanda çinko bakır düzeyleri arasında ilişkiler. *Selçuk Üniv Vet Fak Derg*, 1, 133-142, 1985.
7. **Öztabak K, Özpınar A:** Yeni doğan kuzuların kolostrum ve inek sütüyle beslenmesinin serum bakır ve çinko düzeylerine etkisi. *İstanbul Üniv Vet fak Derg*, 31 (1): 75-81, 2005.
 8. **Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW:** Veterinary Medicine. 9th ed. WB Saunders Comp. Ltd. London, 2000.
 9. **Çekirdekçi A, Köksel O, İlhan N, Tamer L, Yücebilgiç G, İsbir T, Ulus T:** Serum and hair zinc, copper and magnesium levels in patients with pulmonary tuberculosis (Pre - Treatment). *FÜ Sağlık Bil Dergisi*, 9(1): 46-48, 1995.
 10. **Gücüş Aİ, Öncüler A, Kalkandelen G, Bakioglu T:** Koyun ve sığırlarda plazma çinko düzeyinin bölgesel ve mevsimsel değişimleri. I. *Ulusal Çinko Kongresi*, 12-16 Mayıs, 629-636, Eskişehir, 1998
 11. **Hotz C, Lowe NM, Araya M, Brown KH:** Assesment of the trace element status of individuals and populations: the example of zinc and copper. *Am Soc Nutri Sci*, 133, 1563S-1568S, 2003.
 12. **Sandstead HH:** Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *J Nutrition*, 130, 347S-349S, 2000.
 13. **Değer Y, Dede S:** Koyun kanında iz element (Zn ve Cu) analizi için kullanılan bazı numune hazırlama metodlarının karşılaştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniv Sağlık Bil Derg*, 6 (1-2): 5-8, 2000.
 14. **Taylor A:** Measurement of zinc in clinical samples. *Ann Clin Biochem*, 34, 142-150, 1997.
 15. **Taylor A, Branch S, Halls D, Patriancar M, White M:** Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages. *J Anal At Apectrom*, 17,: 414-455, 2002.
 16. **Tiftik AM:** Klinik Biyokimya. Mimoza Yay. No: 44, Konya, 1996.
 17. **Grace ND, Lee J:** Influence of high zinc intakes, season and staple site on the elemental composition of wool and fleece quality in grazing sheep. *New Zealand J Agri Res*, 35, 367-377, 1992.
 18. **Application notes.** Thermo Electron Limited, Cambridge, UK, 2004.
 19. **Spears JW:** Zinc methionine for ruminants: Relative bio-availability of zinc in lambs and effect of growth and performance of growing heifers. *J Anim Sci*, 67, 835-843, 1989.
 20. **Thompson RH, Blanchflower WJ:** Wet-ashing apparatus to prepare biological materials for atomic absorption spectrophotometry. *Lab Pract*, 20 (11): 859-861, 1971.
 21. **Kelly WR:** Veterinary Clinical Diagnosis. Baillière Tindal, London, 1984.
 22. **Balk M, Kızılarıslan D, Saydam G, Türkmen A, Himmetoğlu T:** Serum magnezyum düzeylerinin tayini için kullanılan xylydyl blue ve calmagite boya bağlama yöntemlerinin karşılaştırılması. *Turk J Biochem*, 28 (1): 12-16, 2003.
 23. **SPSS:** SPSS reference manual (Release 10.0.1) for Windows, SPSS Inc. USA, 1999.
 24. **Altıntaş A, Fidancı UR:** Evcil hayvanlarda ve insanda kanın biyokimyasal normal değerleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 40 (2): 173-186, 1993.
 25. **Çamaş H, Bildik A, Gülser F:** Investigation on some trace elements (Cu, Mo, Zn, Co, Mn) and sulphate in soil, Grass and Sheep's blood. *YYÜ Vet Fak Derg*, 10 (1-2): 87-91, 1999.