

STUDI ABSORPSI Fe DALAM TUBUH ANAK MENGUNAKAN METODE PERBANDINGAN ISOTOP STABIL

Rukihati dan Sumardjo

Puslitbang Iptek Bahan (P3IB) - BATAN
Kawasan Puspiptek, Serpong 15314, Tangerang

ABSTRAK

STUDI ABSORPSI Fe DALAM TUBUH ANAK MENGGUNAKAN METODE PERBANDINGAN ISOTOP. Isotop stabil adalah bahan yang sangat berguna dalam penelitian absorpsi dan metabolisme nutrisi anorganik dalam tubuh manusia. Prinsip dasar studi dengan isotop ini adalah menambahkan isotop stabil yang kelimpahannya rendah setelah diperkaya kedalam makanan. Dalam studi ini isotop stabil besi : ^{57}Fe dan ^{58}Fe digunakan sebagai perunut untuk mempelajari absorpsi Fe dalam tubuh anak. Perunut diberikan bersama susu sapi dan bersama jus apel. Perbandingan isotop Fe ditentukan menggunakan ICP-MS (*inductively coupled plasma-mass spectrometer*) yang dilengkapi dengan ETV (*electrothermal vaporization*) untuk pemasukan sampel. Pemasukan sampel menggunakan ETV mereduksi gangguan ion-ion poliatom, terutama gangguan terhadap ^{57}Fe dari ion poliatom ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$). Diperoleh hasil bahwa absorpsi Fe oleh anak secara nyata lebih besar ($13,8 \pm 3,8 \%$) bila diberikan bersama-sama jus apel dari pada bila diberikan bersama-sama susu sapi ($5,8 \pm 1,3 \%$).

Kata kunci : Perbandingan isotop stabil, perunut, absorpsi, ICP-MS, ETV, ion poliatom, susu sapi, jus apel

ABSTRACT

THE STABLE ISOTOP RATIOS METHOD FOR THE STUDY OF Fe ABSORPTION IN INFANTS. Stable isotopes are valuable tool for research on inorganic nutrient absorption and metabolism in human. The basic principle of an isotope study is to trace a meal or diet with the stable isotopes of enriched low natural abundance. In this study stable isotopes of iron (Fe) : ^{57}Fe and ^{58}Fe were used as tracer to study the Fe absorption in infants. The tracer given with a cow's milk and an apple juice. Iron-isotope ratios were determined using ICP-MS (*inductively coupled plasma-mass spectrometer*) equipped with sample introduction by ETV (*electrothermal vaporization*). Sample introduction by ETV significantly reduces the levels of certain polyatomic ions, in particular those associated with the interference of ^{57}Fe ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$). The result showed that Fe absorption by infants was significantly greater ($13.8 \pm 3.8 \%$) when given with apple juice than that with cow's milk ($5.8 \pm 1.3 \%$).

Key words : Stable isotope ratio, tracer, absorption, ICP-MS, ETV, polyatomic ions, cow's milk, apple juice

PENDAHULUAN

Telah dimaklumi bahwa isotop adalah unsur-unsur kimia yang mempunyai nomor massa berbeda, tetapi nomor atom sama. Sebagai contoh ^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{57}Fe dan ^{58}Fe adalah isotop-isotop unsur Fe. Kelimpahan (*abundance*) isotop Fe di alam adalah ^{54}Fe (5,8273%), ^{56}Fe (91,7668%), ^{57}Fe (2,1211%) dan ^{58}Fe (0,2847%). Dengan ditemukan teknologi pengkayaan isotop (*isotope enrichment*), dapat diperoleh isotop-isotop stabil yang diperkaya. Semisal kelimpahan ^{57}Fe (2,1211%) atau ^{58}Fe (0,2847%) dapat diperkaya menjadi > 90 %. Di alam terdapat dua jenis isotop : 1). isotop stabil yaitu isotop-isotop yang tidak memancarkan sinar-sinar radio-aktif (sinar α , β atau γ). 2). isotop radioaktif biasa disebut radioisotop yaitu isotop-isotop yang mengeluarkan sinar-sinar radioaktif. Radioisotop dapat dibuat antara

lain di dalam reactor nuklir.. Kebanyakan unsur di dalam tabel periodik mempunyai lebih dari satu isotop stabil yang dapat digunakan sebagai perunut (*tracer*) pada penelitian absorpsi dan metabolisme unsur nutrisi esensial di dalam tubuh manusia. Sedangkan unsur-unsur monoisotop seperti : F, I, Na, P, Mn dan Co tidak digunakan sebagai perunut.

Sebagai perunut bisa digunakan isotop stabil atau isotop radioaktif dari unsur-unsur : Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, Mg, Se, Mn sebagaimana disebutkan oleh Fred Mellon [1]. Metodologi penggunaan isotop radioaktif adalah sederhana dan mudah dideteksi di dalam sampel darah, urin atau tinja (*feces*). Namun demikian penggunaan isotop radioaktif berisiko karena adanya paparan radiasi internal, dan tidak dapat digunakan untuk

kelompok subjek tertentu seperti anak-anak dan perempuan hamil. Disamping itu, isotop radioaktif dari beberapa unsur-unsur nutrisi anorganik (seperti Cu dan Mg) waktu peluruhan lebih cepat dari pada waktu yang dibutuhkan untuk penelitian, dan terbatas pemakaiannya untuk manusia. Dalam tahun 1980-an penggunaan isotop radioaktif dalam tubuh manusia untuk keperluan penelitian nutrisi dan biokimia sudah ditinggalkan.

Dalam tahun 1970-an penelitian menggunakan isotop stabil telah banyak dilaksanakan, perkembangan lebih cepat sejak tahun 1980 dengan tersedianya alat ukur yang lebih presisi dan akurat untuk menentukan perbandingan isotop seperti spektrometer masa ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometer*).

Dengan menggunakan isotop stabil, absorpsi atau metabolisme unsur nutrisi anorganik di dalam tubuh manusia dapat dirunut, yang sebelumnya tidak bisa ditentukan. Mengingat reniknya kandungan unsur-unsur tersebut diperlukan metode pengukuran unsur kelumit dengan presisi dan akurasi tinggi. Keuntungan menggunakan isotop stabil adalah tidak ada risiko radiasi terhadap subjek atau penelitiannya, serta dapat digunakan untuk berbagai subjek penelitian : anak-anak, perempuan hamil atau perempuan menyusui. Penolakan terhadap penggunaan isotop stabil terutama disebabkan : harga isotop stabil cukup mahal, analisis cukup rumit dan biaya tinggi serta memerlukan pengetahuan yang lebih dari satu disiplin ilmu.

Beberapa penelitian yang menggunakan isotop stabil untuk mengetahui absorpsi unsur nutrisi dalam tubuh manusia antara lain absorpsi unsur-unsur Zn [2], Cu [3], Ca [4] serta absorpsi Fe oleh : laki-laki [5], perempuan tidak hamil [6], perempuan hamil [7] dan anak-anak [8- 10]. Penelitian absorpsi Fe dalam tubuh manusia tetap menarik untuk diteliti mengingat defisiensi (kekurangan Fe = anemia) umumnya disebabkan oleh mal-nutrisi (kesalahan-nutrisi) [11]. Di negara-negara berkembang anemia lebih disebabkan karena penduduk sangat kurang mengkonsumsi makanan yang mengandung besi. Fe yang terkandung dalam jaringan hewan diabsorpsi lebih baik oleh tubuh dari pada Fe yang terdapat dalam non-hewan; penduduk di negara berkembang sedikit sekali mengkonsumsi daging hewan atau *vegetarian*. [12]. Pengaruh kekurangan Fe pada anak-anak menyebabkan antara lain penurunan hemoglobin, kapasitas gerak menurun, pertumbuhan terbelakang dan perkembangan mental terhambat [13].

Dalam tulisan ini dipelajari absorpsi Fe oleh anak-anak yang berumur \pm satu tahun. Perunut isotop stabil Fe yang digunakan yaitu ^{57}Fe dan ^{58}Fe yang diperkaya. Kedua isotop tersebut diberikan dalam bentuk ferosulfat. Isotop ^{57}Fe diberikan bersama susu sapi sedangkan isotop ^{58}Fe diberikan bersama-sama jus apel. Penggunaan dua isotop stabil untuk penelitian nutrisi ini biasa disebut *double isotop method* (metode isotop ganda). Metode ini berdasarkan pemberian dua isotop yang berbeda secara simultan dalam media yang berbeda

pula. Perbandingan isotop Fe ditentukan dengan menggunakan ICP-MS yang dilengkapi dengan ETV (*electrothermal vaporization*).

METODE PERCOBAAN

Subjek Penelitian

Delapan anak, empat laki-laki dan empat perempuan berumur antara 12 – 15 bulan (rata-rata 13 ± 1 bulan, berat $10,9 \pm 1,2$ kg) dikumpulkan untuk penelitian ini. Tidak seorangpun dari subjek yang menderita anemia atau penyakit kronis lainnya. Setiap subjek menerima susu sapi sebagai satu-satunya sumber susu untuk diminum selama tiga bulan sebelum penelitian dimulai. Selama enam bulan setiap anak mengkonsumsi makanan formula anak yang sama, sebelum diberikan susu sapi yang diberi perunut isotop stabil Fe. Selama penelitian setiap anak tidak diberikan multivitamin atau suplemen vitamin yang mengandung Fe, dan tidak seorang anakpun yang menderita sakit. Karakteristik subjek dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian

Subjek	Usia (bulan)	Berat (kg)	Hemoglobin (mg/L)	Ferritin ($\mu\text{g/L}$)
1.	13	10,4	102	24
2.	14	11,5	135	25
3.	14	9,9	124	12
4.	14	9,6	109	31
5.	12	10,6	114	15
6.	13	9,7	137	48
7.	13	12,3	119	45
8.	15	12,9	117	15
Rata-rata	14	10,9	120	27
SD	1	1,2	11	12,8

SD = Standard deviation

Cara Penelitian

Pagi-pagi di hari pertama penelitian, semua anak-anak ditempatkan di dalam unit penelitian metabolik. Selama dua jam sebelum penelitian dimulai, anak-anak tidak diperbolehkan makan apapun. Setiap anak ditimbang dan diukur tingginya. Kemudian setiap anak diambil darahnya sebanyak 3 mL (secara medis) untuk pengukuran Hb (hemoglobin), hematokrit, ferritin (dianalisis menggunakan RIA = Radioimmunoassay, yang dilakukan oleh laboratorium kesehatan komersial) dan untuk pengukuran *baseline* perbandingan isotop Fe. Secara bertahap dengan menggunakan botol, setiap anak diberi 120 mL susu sapi. Selama pemberian susu, kepada setiap anak diberikan 5 mg ^{57}Fe dalam bentuk ferosulfat yang telah dipreparasi dengan 16 mg asam askorbat dan dicampur dengan susu rasa anggur. Pemberian perunut isotop stabil ^{57}Fe , dilakukan

menggunakan *syringe* (sebelum dan sesudah pemberian perunut, *syringe* ditimbang).

Kemudian setiap anak diberi makanan sereal-tanpa-Fe, dan selanjutnya anak-anak dibiarkan tidak makan apapun selama 2 jam setelah pemberian 5 mg ferosulfat (terdiri dari 0,75 mg ⁵⁸Fe sulfat dan 4,25 mg ferosulfat tanpa pengkayaan ⁵⁸Fe) yang telah dipreparasi dengan 8 mg asam askorbat, segera anak-anak diberi 120 mL jus apel yang mengandung 42 mg asam askorbat. Setelah 14 hari, setiap anak ditimbang dan diambil darahnya (secara medis) sebanyak 1 mL untuk penentuan perbandingan isotop besi, menggunakan ICP-MS – ETV.

Instrumentasi

Sistem ICP-MS terdiri dari dua komponen utama : plasma-argon (ICP) dan spektrometer-massa (MS). Plasma-argon adalah media pembentuk ion yang bersuhu ± 6.000 K. Pada suhu plasma tersebut ionisasi unsur-unsur sangat efektif, umumnya terjadi ion-ion positif tunggal, semisal ⁵⁷Fe⁺. Kombinasi ICP-MS dengan ETV dimaksudkan untuk menghindari terjadinya ion-ion poliatom yang dapat mengganggu terhadap ion-ion analit, terutama gangguan ion poliatom (⁴⁰Ar¹⁶O⁺H)⁺ terhadap ion analit ⁵⁷Fe⁺.

Sejumlah 5 µL serum darah ditempatkan pada batang grafit (graphite rod) ETV untuk proses pengeringan, penguapan air, pembakaran dan pengabuan bahan organik. Akhirnya penguapan analit ke dalam sistem ICP plasma-argon, yang selanjutnya proses ionisasi analit di dalam plasma argon. Sistem ICP-MS dioperasikan pada *isotopic ratios peak hopping mode*, dengan pengaturan parameter sebagai berikut : Daya plasma (*RF, radio frequency*) = 1,1 kW, daya terpantul = < 5 W, kecepatan alir argon pendingin = 12 L/menit, kecepatan alir argon-pendukung = 1,4 L/menit dan kecepatan alir argon *nebulizer* = 0,8 L/menit. Spektrometer massa diprogram sebagai berikut : *dwell time* = 60 milidetik, *measuring time* = 5 detik, *measuring per peak* = 1, *repeats per integration* = 3.

Perhitungan

Jumlah isotop besi yang diikat oleh sel darah merah (RBC = red blood cell) ditulis dengan notasi (Fe_{sdm}), ditentukan berdasarkan perbandingan isotop Fe yang diperkaya (Fe_{pky}) dan Fe alam (Fe_{alm}). Perhitungan untuk ⁵⁷Fe :

$$^{57}\text{Fe}_{\text{sdm}} = \left[\frac{^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}_{\text{pky}} - ^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}_{\text{alm}}}{1/[^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}_{\text{alm}}]} \right] \times \text{Fe}_{\text{srk}} \times \text{FA}_{57}$$

Fe_{srk} adalah total Fe dalam darah yang bersirkulasi. Asumsi volume darah untuk anak-anak adalah 65 mL/kg, dan konsentrasi Fe dalam hemoglobin adalah 3,47 mg/g maka rumusan Fe_{srk} secara empiris adalah :

$$\text{Fe}_{\text{srk}} (\text{mg}) = 65(\text{mL/kg}) \times \text{Hb}(\text{g/mL}) \times \text{berat badan}(\text{kg}) \times 3,47 (\text{mg/g})$$

FA₅₇ adalah fraksi-berat isotop ⁵⁷Fe (di alam), adalah 0,0212

Perbandingan isotop ⁵⁷Fe/⁵⁶Fe_{alm} dan ⁵⁸Fe/⁵⁶Fe_{alm} adalah hasil pengukuran dengan ICP-MS dari cuplikan darah anak-anak sebelum diberi isotop perunut (*baseline*). Identik dengan perumusan di atas, perhitungan untuk ⁵⁸Fe :

$$^{58}\text{Fe}_{\text{sdm}} = \left[\frac{^{58}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}_{\text{pky}} - ^{58}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}_{\text{alm}}}{1/[^{58}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}_{\text{alm}}]} \right] \times \text{Fe}_{\text{srk}} \times \text{FA}_{58}$$

harga FA₅₈ adalah 0,0028. Penentuan akhir persen absorpsi dihitung berdasarkan asumsi bahwa 90 % isotop Fe diikat oleh sel darah merah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Menurut FRED MELLON [1], unsur-unsur nutrisi : Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Se, Cr, Mo yang terkandung dalam tubuh manusia, baik kandungan total dalam tubuh, pengambilan rata-rata per hari, maupun kuantitas unsur-unsur tersebut yang dikeluarkan dari tubuh dapat dilihat pada Tabel 2. Kandungan Fe dalam tubuh berkisar antara (0,1-4) g, konsentrasi dalam serum darah adalah

Tabel 2. Karakteristik unsur nutrisi anorganik dalam tubuh manusia [1]

Unsur	Kandungan total dalam tubuh	Konsentrasi dalam plasma/serum	Rata-rata pengambilan per hari	Absorpsi (%)	Pengeluaran total	Pengeluaran melalui air seni
Ca	(1000 -1200) g	(2,2-2,5) mmol/liter	800 (440 -1320) mg	(30-60)	(100-200) mg	(100-250) mg
Mg	(20-30) g	(0,8-1,2) mmol/liter	300 (190-440) mg	(25-45)	30 mg	100 mg
Fe	(0,1-4) g	(14-32) µmol/liter	12 (9-20) mg	(1-40)	≤ 0,5mg	< 0,1 mg
Zn	(1,5-2,5) g	(9-22) µmol/liter	10 (7-15) mg	(15-4)	(1,5-3,0) mg	0,5 mg
Cu	80 mg	(13-22) µmol/liter	1,5 (1,1-3,1)mg	(30-40)	(0,5-2,5) mg	< 0,1 mg
Se	(3-30) mg	(0,7-1,5) µmol/liter	56 (19-134) µg	(60-80)	tad	(10-200) µg
Cr	tad	tad	40 (25-91) µg	(0,05-2)	tad	(0,05-0,5) µg
Mo	tad	tad	130 (80-280) µg	80	tad	(80-160) µg

tad = tidak ada data

(14 -32) $\mu\text{mol/L}$ atau setara dengan 56(14-32) $\mu\text{g/L}$ = (784-1792) $\mu\text{g/L}$. atau (0,784 -1,792) $\mu\text{g/mL}$. Penentuan kuantitas isotop-isotop Fe dalam darah memerlukan teknik analisis renik (*trace analysis*), salah satunya menggunakan ICP-MS yang dapat menentukan unsur hingga ng/mL. Dengan menggunakan ETV jumlah sampel darah sebanyak 5 μL dapat mencukupi untuk penentuan isotop Fe.

Pada Tabel 3 dicantumkan hasil penentuan persen absorpsi Fe yang diberikan bersama-sama susu sapi dengan perunut ^{57}Fe dan diberikan bersama-sama jus apel dengan perunut ^{58}Fe .

Sebagaimana terlihat pada Tabel 3, absorpsi Fe oleh anak-anak berusia ± 1 tahun yang diberikan bersama-sama jus apel (perunut ^{58}Fe) secara nyata lebih besar dari pada absorpsi Fe yang diberikan bersama-sama susu sapi (perunut ^{57}Fe), yaitu $13,8 \pm 3,8\%$ terhadap $5,8 \pm 1,3\%$. Absorpsi relatif $^{58}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ rata-rata adalah $2,4 \pm 0,5\%$. Simpangan baku relatif (RSD) perbandingan $^{58}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ (21%) tidak jauh berbeda dengan ^{58}Fe (28%) dan ^{57}Fe (22%).

Studi absorpsi Fe dengan menggunakan metode isotop ganda (*double isotope method*), dan perbandingan isotop ditentukan dengan ICP-MS-ETV tidak terlalu rumit, dan bisa diterapkan untuk mengetahui jumlah Fe yang diabsorpsi oleh anak dari makanan tambahan (supplement). Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh HEINRICH *et al.* [14] dengan menggunakan isotop radioaktif ^{59}Fe . Dalam penelitian tersebut, perunut ^{59}Fe diberikan bersama-sama air dan yang lain bersama-sama susu sapi. Ternyata absorpsi Fe yang diberikan bersama-sama dengan air (8,3%) lebih besar dari pada bila diberikan bersama-sama susu sapi (4,8%).

Tabel 3. Persen absorpsi Fe yang diberikan bersama-sama susu sapi (perunut ^{57}Fe) dan diberikan bersama-sama Jus apel (perunut ^{58}Fe)

Subjek	^{57}Fe (%)	^{58}Fe (%)	$^{58}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$
1.	3,4	7,2	2,1
2.	6,2	13,6	2,2
3.	7,3	9,4	1,3
4.	4,1	12,3	3,0
5.	6,3	14,1	2,2
6.	5,7	17,3	3,0
7.	7,1	19,1	2,7
8.	6,1	17,2	2,8
Rata-rata	5,8	13,8	2,4
SD	1,3	3,8	0,5
SD/Rata-rata	0,22	0,28	0,21

Menurut [13] absorpsi terhadap Fe bervariasi bergantung kepada : keberadaan Fe di dalam tubuh, bentuk senyawa dan kuantitas Fe dalam makanan serta bergantung pada konsentrasi pendukung (promoter) dan

penghambat (inhibitor). Pada Tabel 4 dicantumkan senyawa dan makanan sebagai pendukung dan penghambat absorpsi unsur nutrisi Fe. Oleh sebab itu dalam pelaksanaan penelitian ini, sebelum dan selama pemberian perunut, semua subjek “dikondisikan” dan diperlakukan sama, yaitu selama tiga bulan sebelum diberikan perunut, setiap subjek menerima susu sapi dan makanan formula untuk anak yang sama untuk diminum/dimakan, dan selama penelitian subjek tidak diberi multivitamin ataupun vitamin yang mengandung Fe. Dalam penelitian absorpsi Fe oleh tubuh manusia selalu disertai dengan pemberian asam askorbat yang berfungsi untuk mereduksi Fe (III), ferri menjadi Fe (II), ferro serta untuk mempertahankan status Fe (II) yang dapat diserap oleh tubuh [13,15].

Tabel 4. Senyawa dan makanan yang mempengaruhi absorpsi besi [13]

<u>Senyawa</u>	<u>Senyawa</u>
Asam askorbat	Fosfat
Asam sitrat	Fitat
Gula	Polifenol, tannin
Beberapa asam amino	Beberapa jenis protein
	Ca, Mn, Cu, Zn
<u>Makanan</u>	<u>Makanan</u>
Daging, unggas, ikan	Telur
Jus buah-buahan	Air teh
Susu asi	Susu sapi
	Keju
	Bayam
	Dedak gandum

KESIMPULAN

Berdasarkan pengukuran isotop dengan ICP-MS-ETV dan menggunakan metode isotop ganda (*double isotope method*), dapat ditentukan banyaknya Fe yang diabsorpsi dalam tubuh anak, Absorpsi Fe dengan pemberian jus apel ($13,7 \pm 6,4\%$) secara nyata lebih besar dari pada pemberian dengan susu sapi ($5,7 \pm 4,0\%$), hal ini mengingatkan bahwa absorpsi Fe dari makanan tambahan (supplement) untuk anak yang mengandung susu sapi adalah tidak efektif.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Steven A. Abrams dari *Children's Nutrition Research Center, Dep. Of Pediatrics, Baylor College of Medicine and Texas Children's Hospital, Houston, Texas, US.* yang telah memberi peluang untuk studi dan diskusi mengenai absorpsi Fe. Ucapan yang sama penulis sampaikan kepada Ms. Cindy Clark dan Ms Lily K. Liang yang telah memberikan pengalaman dalam preparasi sampel dan aplikasi spektrometer massa untuk penentuan isotop.

DAFTAR ACUAN

- [1]. FRED MELLON, BRITTAMARIE SANDSTROM, *Stable Isotopes in Human Nutrition Inorganic Nutrien Metabolism*, Academic Press, (1996)
- [2]. EHRENKRANZ, R.A., ACKERMAN, B.A., NELLI, C.M., JANGHORBANI, Determination with Stable Isotopes of the Dietary Bioavailibility of Zinc in Premature Infants, *Am. J. Clin. Nutr.*, **40** (72) (1984)
- [3]. TING, BTG., KASPER, L.J., YOUNG, V.R., JANGHORBANI : Copper Absorption in Healty Young Men, Study with Stable Isotope ⁶⁵Cu and Neutron Activation Analysis, *Nutr. Res.* **4** (757) (1984)
- [4]. EHRENKRANZ, R.A., NELLI, C.M., JANGHORBANI : Absorption of Calcium in Premature Infants as Measured with a Stable Isotope ⁴⁶Ca Extrinsic Tag, *Pediatr. Res.* **19** (178) (1985)
- [5]. JANGHORBANI, TING, B.T.G., YOUNG, *J. Nutr.*, **110** (2190) (1990)
- [6]. CANTONE, M.C., MOHLO, N., PIROLA, L., GAMBARINI, G., HANSEN, C., ROTH, P., WERNER, E., *Med. Phys.*, (1988)
- [7]. WHITTAKER, P.G., LIND, T., WILLIAMS, J.G., GRAY, A.L., *Analyst*, **114** (675) (1989)
- [8]. LONNERDAL, B., *Iron Intake and Requirement : Nutritional Needs of the Six to Twelve Month Old Infant*, Carnation Nutrition Education Series, **2**, (1991) 199-211
- [9]. OSKI, F.A., Iron Deficiency in Infancy and Childhood, *J. Med.* **329**, (1993) 190-193
- [10]. IDJRADINATA, P., POLLITT, E. Reversal of Developmental Delays in Iron-Deficient Anaemic Infants Treated with Iron, *Lancet*, **341** (14) (1993)
- [11]. Expert Scientific Working Group, Summary of a Report on Assessment of the Nutritional Status of the United States Population, *Am. J. Clin. Nutr.* **42**, (1985) 1318 – 1330
- [12]. International Nutritional Anemia Consultative Group The Effects of Cereal and Legumes on Iron Availability, Washington, DC., The Nutrition, (1982)
- [13]. S.J FAIRWEATHER-TAIT, Iron Deficiency in Infancy; Easy to Prevent – or Is It ?, *European Journal of Clinical Nutrition*, **46** (4) (1992) S9-S14
- [14]. HEINRICH, H. C., GABBE, E.E., WHANG, D.H., BENDER – GOTZE, C. SHAFER, K.H., *Ferrous and Hemoglobin ⁵⁹Fe Absorption from Supplemented Cow Milk in Infants with Normal and Depleted Iron Stores*, *Z. Kinderheilkd* **120** (1985) 251-258
- [15]. HELBERG, L., Bioavailability of Iron in Man, *Ann. Rev. Nutr.*, **1** (1991) 123 – 148