

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**MĖGINIO PARUOŠIMO IR LAIKYMO SĄLYGŲ ĮTAKA KRAUJO SERUMO
KAROTENOIDŲ KONCENTRACIJAI**

Magistrantė VITALIJA PUNDZIŪTĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas
dr. Asta Mažeikienė _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
doc., dr., Dovilė Karčiauskaitė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2018 m., Vilnius

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Karotenoidai.....	7
1.1.1. Karotenoidų struktūra.....	7
1.1.2. Biologinis įsisavinimas ir metabolizmas.....	9
1.1.3. Funkcijos ir klinikinė reikšmė.....	10
1.1.4. Nustatymo metodai.....	12
1.1.5. Skilimas.....	13
1.2. Karotenoidų stabilumas.....	14
1.2.1. Preanalizinės stadijos poveikis karotenoidų stabilumui.....	15
1.2.2. Šviesos ir mėginių laikymo temperatūros įtaka karotenoidų stabilumui.....	16
1.2.3. Karotenoidų stabilumas po ekstrakcijos.....	17
1.2.4. Ilgalaikis karotenoidų mėginių saugojimas.....	18
1.3. Apibendrinimas.....	19
2. TYRIMO METODIKA.....	20
2.1. Naudoti reagentai.....	20
2.2. Prietaisai ir laboratoriniai reikmenys.....	20
2.3. Tyrimams naudoti mėginiai.....	22
2.4. Karotenoidų standartinių medžiagų tirpalų koncentracijos spektrofotometrinis nustatymas.....	22
2.5. Karotenoidų išskyrimas iš kraujo serumo mėginių.....	23
2.6. Karotenoidų standartinių medžiagų tirpalų paruošimas chromatografijai.....	24
2.7. Chromatografinis karotenoidų išskyrimas ir nustatymas.....	25
2.8. Statistinė analizė.....	26
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	27
3.1. Ilgalaikio mėginių saugojimo įtaka kraujo serumo karotenoidų koncentracijai.....	27
3.2. Kraujo serumo karotenoidų koncentracijos stabilumas po ekstrakcijos.....	29
3.2.1. 24 valandų trukmės iš kraujo serumo išskirtų mėginių laikymo poveikis karotenoidų koncentracijai.....	30

3.2.2. 72 valandų iš kraujo serumo išskirtų mėginių laikymo poveikis karotenoidų koncentracijai	32
3.2.3. 168 valandų iš kraujo serumo išskirtų mėginių laikymo poveikis karotenoidų koncentracijai	34
3.3. E-likopeno ir Z-likopeno izomerų pokyčiai iš kraujo serumo išskirtuose ir 24, 72 ir 168 valandas laikytuose mėginiuose	37
3.4. Rezultatų aptarimas	40
IŠVADOS	43
SUMMARY	44
LITERATŪROS SĄRAŠAS	45

SANTRUMPOS

- BHA – butilhidroksianizolis
- BHT – butilhidroksitoluenas
- DTL – didelio tankio lipoproteinai
- ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija
- GPH – gerybinė prostatos hiperplazija
- LMTL – labai mažo tankio lipoproteinai
- MeOH – metanolis
- MTBE – tert-butilmetileteris
- MTL – mažo tankio lipoproteinai
- TCL – didžiausia pokyčio riba (angl. *Total change limit*)
- UV – ultravioletinė šviesa
- ŽPV – žmogaus papilomos virusas

IVADAS

Karotenoidai yra geltonos, oranžinės ar raudonos spalvos natūralūs pigmentai, sintetinami fotosintezę vykdančių organizmų. Tai jie lemia ryškią daugumos vaisių ir daržovių spalvą. Žmogaus organizme karotenoidai nėra sintetinami, tad visas kiekis yra gaunamas vartojant maisto produktus, kuriuose yra gausu šių pigmentų. Karotenoidai pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu ir taip pat yra vitamino A pirmtakai [1]. Jie tapo vis labiau tyrinėjamu objektu, kai buvo pastebėta, kad padidėjusi karotenoidų koncentracija organizme gali būti susijusi su sumažėjusia kai kurių ligų rizika. Didžioji dalis mokslinių straipsnių pabrėžia karotenoidų naudą žmogaus organizmui, kadangi tinkamas jų kiekis maisto racione žymiai sumažina lėtinių ir degeneracinių ligų riziką, gali apsaugoti nuo širdies ir kraujagyslių ligų, diabeto, artrito ir kt. [2].

Siekiant vis geriau suprasti karotenoidų biologinį poveikį žmogaus organizmui labai svarbus etapas yra tikslus karotenoidų koncentracijos nustatymas. Tiksliems ir patikimiems rezultatams nepakanka vien gero analizės metodo, tačiau itin svarbu užtikrinti tyrimo kokybę, pradedant mėginio surinkimu ir tinkamomis laikymo sąlygomis. Dėl savo struktūros karotenoidai yra reaktyvūs ir gana nestabilūs. Stabilumas yra apibrėžiamas kaip mėginio sugebėjimas per tam tikrą laiką ir laikantis nurodytų laikymo sąlygų išlaikyti nustatytą pradinę medžiagos koncentraciją [3]. Karotenoidai yra jautrūs šviesai, aukštai temperatūrai ir deguoniui, tačiau jų stabilumas kraujyje yra geras, kadangi kraujas yra laikomas vakuuminuose mėgintuvėliuose, kur neturi kontakto su deguonimi, o taip pat kraujyje yra kitų natūralių antioksidantų [4]. Skirtingai negu kraujyje, iš kraujo serumo ar kraujo plazmos išskirti karotenoidai tampa ypač jautrūs aplinkos veiksniams. Todėl svarbu išskirtus karotenoidų mėginius apsaugoti nuo įvairių aplinkos veiksnių, kad jų koncentracijos pakitimai dėl nestabilumo po ekstrakcijos, neturėtų įtakos gautiems tyrimo rezultatams.

Šio magistrinio darbo tikslas yra įvertinti kaip mėginio paruošimo ir laikymo sąlygos veikia kraujo serumo karotenoidų koncentraciją.

Šiam tikslui pasiekti buvo išskirti trys uždaviniai:

1. Nustatyti karotenoidų koncentracijos pokyčius kraujo serumo mėginiuose, laikytuose $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje;

2. Nustatyti iš kraujo serumo išskirtų karotenoidų koncentracijos pokyčius mėginiuose atsižvelgiant į laiką iki tyrimo;
3. Įvertinti likopeno izomerų koncentracijos kitimą iš kraujo serumo išskirtuose mėginiuose po 24, 72 ir 168 valandų.

Magistrantė atliko kraujo serumo karotenoidų koncentracijos tyrimus efektyviosios skysčių chromatografijos metodu Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centre ir atliko gautų duomenų statistinę analizę.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Karotenoidai

Karotenoidai – tai plačiai paplitusi, riebaluose tirpių pigmentų grupė, kurią sintetina dauguma augalų, taip pat dumblių ir fotosintetinančių bakterijų [5,6]. Paprastai karotenoidai sudaryti iš 40 anglies molekulių su daug konjuguotų dvigubųjų jungčių [7]. Karotenoidai suteikia raudoną, oranžinę ar geltoną spalvą tokiems augalams kaip apelsinai, pomidorai, morkos ir kt. [6, 30]. Gyvūnų ir žmogaus organizme šios medžiagos nėra sintetinos *de novo*, todėl gaunamos tik su maistu [8]. Šiuo metu yra atrasta daugiau nei 700 natūraliai egzistuojančių karotenoidų, iš kurių apie dvidešimt gali būti rezorbuoti ir metabolizuoti žmogaus organizme, tačiau didžiąją dalį (>95 proc.) visų karotenoidų žmogaus kraujyje sudaro tik šeši – α -karotenas, β -karotenas, β -kriptoksantinas, likopenas, liuteinas ir zeaksantinas [5, 19].

1.1.1. Karotenoidų struktūra

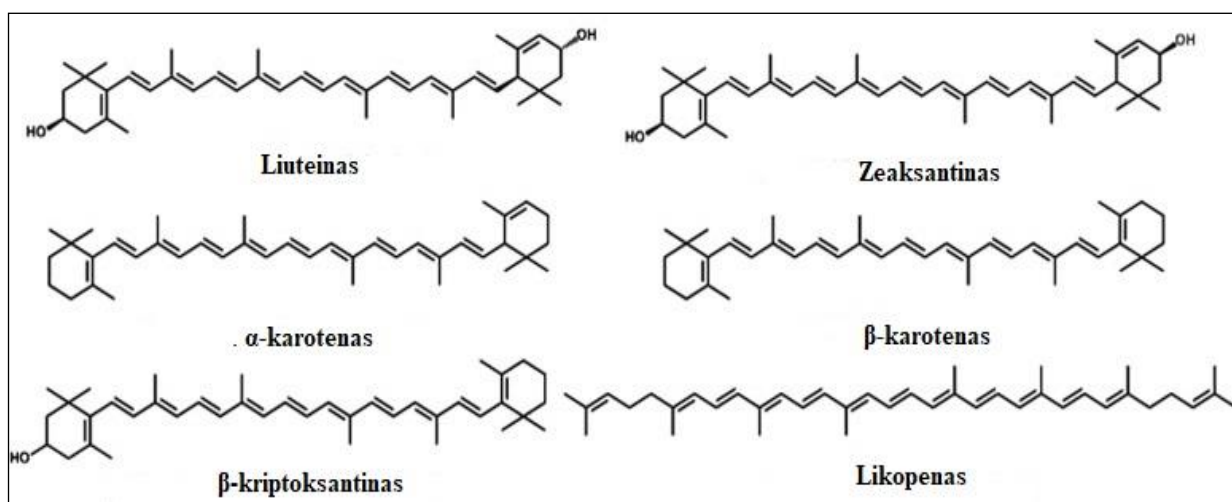
Karotenoidų molekulės savybės ir funkcijos daugiausia priklauso nuo jos struktūros. Dauguma karotenoidų priskiriami tetraterpenų klasei, kadangi jų pagrindą sudaro 40 anglies atomų grandinė. Grandinė sudaryta iš 8 izopreno molekulių, sujungtų taip, kad molekulė būtų simetriška ir linijinė – tarpusavyje molekulės sujungtos principu „galva-uodega“, išskyrus centrą, kur molekulės jungiasi „uodega-uodega“ principu [10]. Konjuguota dvigubųjų jungčių sistema (C=C), kuri labai paplitusi karotenoidų struktūroje, laikoma vienu svarbiausių faktorių energijos perdavimo reakcijose, pavyzdžiui fotosintezės procese [18]. Kadangi konjuguotos dvigubosios jungtys suteikia karotenoidams stiprų cheminį reaktyvumą, jie gali pakankamai lengvai izomerizuotis ir oksiduotis. Pagrindinė bazinė struktūra gali būti modifikuota hidrinimo, dehidrinimo, ciklizacijos ir oksidacijos procesų metu [10].

Priklausomai nuo izomerizmo aplink C=C jungtis, karotenoidai gali būti dviejų konfigūracijų – *E* arba *Z*, kas paprastai atitinka *cis* ir *trans*. *Cis* izomerai yra mažiau termodinamiškai stabilūs nei *trans* izomerai, todėl *trans* forma yra labiau paplitusi gamtoje. *Trans* konfigūracijos karotenoidai yra linijiniai, tvirti ir turi išplėstą dvigubųjų ryšių sistemą, tačiau *cis* izomerai yra labiau tirpūs ir gali būti lengviau rezorbuojami ir transportuojami tarp ląstelės struktūrų [11].

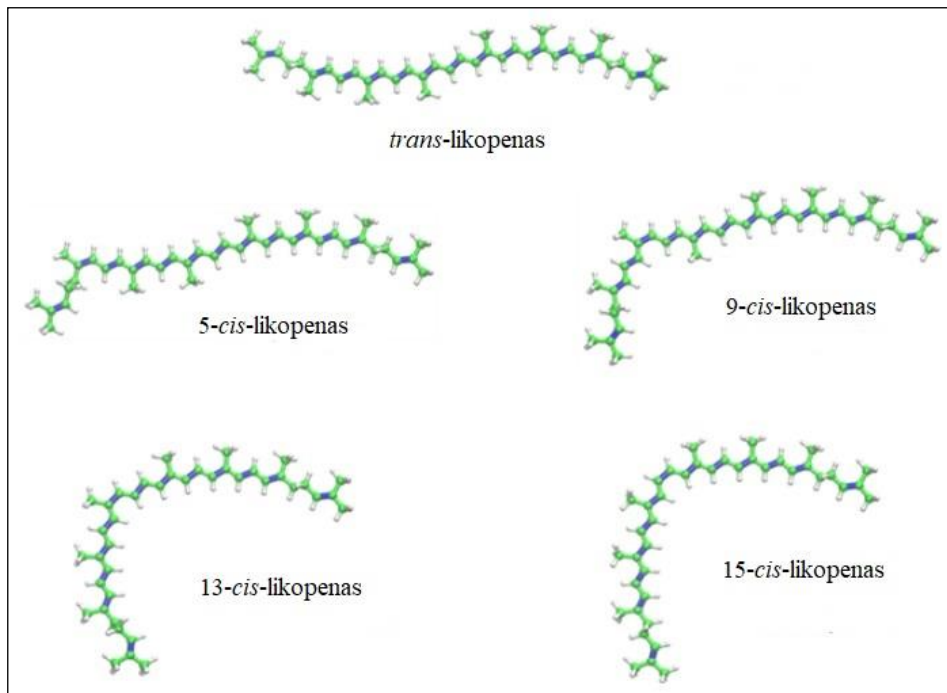
Iš visų karotenoidų, likopenas savo struktūroje turi daugiausia konjuguotų dvigubųjų jungčių, todėl jis ypač linkęs egzistuoti daugelyje izomerų formų [49]. *Trans* geometrinė likopeno forma vyrauja šviežiuose maisto produktuose, tokiuose kaip neapdoroti pomidorai, kuriuose ši forma sudaro apie 80-90 proc. viso likopeno [55]. Tuo tarpu žmogaus organizme, audiniuose ar serume, daugiau nei 50 proc. viso likopeno sudaro *cis* izomerai [49]. Terminiškai apdorotuose ar perdirbtuose maisto produktuose ir žmogaus serume daugiausia aptinkami tokie mono-*cis* izomerai kaip 5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis* ir 15-*cis* [24] (**1.2 pav.**), tačiau aptinkami ir kai kurie di-*cis* izomerai. Kadangi žmogaus organizme didžiąją dalį likopeno sudaro *cis* formos, kai kurie mokslininkai mano, jog *cis* izomerai galimai pasižymi didesniu biologiniu prieinamumu ir antioksidaciniu pajėgumu [49].

Dėl struktūrinių skirtumų visis karotenoidai yra išskiriami į dvi dideles klases – karotenus ir ksantofilus [29]. Karotenai sudaryti vien tik iš anglies ir vandenilio (pvz. α -karotenas, β -karotenas, likopenas), o ksantofilus sudaro anglis, vandenilis ir deguonis (liuteinas, zeaksantinas, kriptoksantinas) [7] (**1.1 pav.**).

Karotenoidai yra hidrofobinės molekulės, labai mažai tirpios ar visiškai netirpios vandenyje ir funkcionuojančios hidrofobinėse ląstelės struktūrose [53]. Prie polieninės grandinės prijungtos poliarinės funkcinės grupės gali keisti karotenoidų poliškumą ir taip paveikti jų lokalizaciją biologinėse membranose ir sąveikas su kitomis molekulėmis [11].



1.1 pav. Pagrindinių karotenoidų cheminės struktūros [68].



1.2 pav. *Trans*-likopeno ir kai kurių *cis*-likopeno izomerų cheminės struktūros [74].

1.1.2. Biologinis įsisavinimas ir metabolizmas

Žmogaus organizmas karotenoidų nesintetina, tad jų turi gauti kartu su maistu. Daugiausia karotenoidų yra šviežiuose vaisiuose ir daržovėse – raudonuose ir geltonuose vaisiuose ir žaliuose lapinėse daržovėse [19]. Skirtingų rūšių karotenoidai įvairiuose maisto produktuose yra pasiskirstę nevienodai, pavyzdžiui likopeno daugiausia yra pomidoruose, arbūzuose, papajose, rožiniuose greipfrutuose, β -kriptoksantino – mandarinuose, moliūguose, apelsinuose [20], o pagrindiniai liuteino šaltiniai – špinatai, lapiniai kopūstai, brokoliai ir kiaušinio tryniai [21, 22].

Teigiamas karotenoidų poveikis žmogaus sveikatai yra susijęs su jų koncentracija kraujyje ir audiniuose. Tam įtakos turi ne tik vartojamo maisto kiekis, kuriame gausu karotenoidų, bet ir jų rezorbcijos efektyvumas ir metabolizmas [23]. Tik keliuose maisto produktuose randamos didelės β -kriptoksantino koncentracijos. Tačiau net ir gausiausių maisto šaltiniuose jo kiekis yra mažas (apie 1 mg/100 g) [20], palyginus su β -karotenu (6-8 mg/100 g) ar likopenu (3-4 mg/100 g) [73]. Nepaisant β -kriptoksantino trūkumo maiste, jo koncentracija kraujyje yra gana didelė [20]. Tai rodo, jog skirtingų karotenoidų biologinis įsisavinimas yra nevienodas.

Biologinis įsisavinimas – tai medžiagos dalis, įeinanti į sisteminę kraujotaką ir dalyvaujanti fiziologinėse funkcijose arba kaupiama vėlesniam laikui [23]. Karotenoidų rezorbcija žmogaus organizme siekia nuo 5 iki 50 proc. [19, 24], tačiau jų biologinis įsisavinimas dar mažesnis – apie 3-34 proc. [25]. Karotenoidų biologinis įsisavinimas priklauso nuo keleto veiksnių. Pirmiausiai –

nuo maisto matricos ir karotenoidų išlaisvinimo iš jos [23]. Karotenoidai turi būti išlaisvinti iš maisto matricos, kad būtų galima juos rezorbuoti ir jie taptų biologiškai aktyviais komponentais [20, 25]. Karotenoidų išskyrimas iš maisto produktų matricos labai priklauso nuo jų būsenos ir ryšių su kitais junginiais. Karotenoidai dažnai egzistuoja kristalinės fizikinės formos pavidalu, pavyzdžiui, likopenas pomidoruose ar β -karotenas morkose. Tokioje būsenoje karotenoidų išskyrimas trunka ilgiau [28] ir dėl to mažėja jų biologinis įsisavinimas [19]. Karotenoidų įsisavinimo efektyvumas taip pat priklauso nuo tokių medžiagų kaip riebalai [20], baltymai ir tulžies rūgštys [24,28]. Daržovėse karotenoidai jungiasi su baltymais ir įsitvirtina chloroplastų ar kitose ląstelių struktūrose, kai kuriuose vaisiuose jie įsiterpę į riebalų lašelius chromoplastuose [27]. Tokiose struktūrose esantys karotenoidai yra lengviau pasisavinami. Veiksmingą liuteino pasisavinimą iš kiaušinio trynio ypač padidina jame esantis cholesterolis, triacilgliceroliai ir fosfolipidai [21]. Priešingai nei tikėtasi, buvo įrodyta, kad tokie technologiniai procesai kaip maisto produktų homogenizavimas ir terminis apdorojimas padidina karotenoidų biologinį įsisavinimą [19, 27]. Tyrimų metu nustatyta, jog likopenas yra pasisavinamas geriau iš perdirbtų pomidorų produktų, negu iš šviežių pomidorų [24], kaip ir β -karotenas įsisavinimas geriau iš termiškai apdorotų morkų ar morkų sulčių [31]. Biologiniam įsisavinimui įtakos turi ir karotenoidų cheminė struktūra. Manoma, kad β -kriptoksantino biologinis įsisavinimas yra didesnis dėl struktūroje turimų deguonies molekulių, kurios padidina jo hidrofiliškumą [20]. Be ankščiau paminėtų veiksnių, karotenoidų biologinį įsisavinimą taip pat lemia genetiniai veiksniai, mitybos būklė, lytis, senėjimas, įvairios infekcijos [19].

Kaip ir kiti lipiduose tirpūs junginiai, taip ir suvirškinti karotenoidai pirmiausia patenka į chilomikronų sudėtį [26]. Lipoproteinlipazei suskaidžius chilomikronus, laisvi karotenoidai toliau transportuojami lipoproteinų sudėtyje – labai mažo tankio lipoproteinuose (LMTL), didelio tankio lipoproteinuose (DTL), o daugiausia mažo tankio lipoproteinų (MTL) dalelėse. Taigi MTL dalelės pasižymi didžiausia karotenoidų koncentracija plazmoje [19]. Karotenoidai daugiausia kaupiasi riebaliniame audinyje, kepenyse ir kraujyje [19, 32], tačiau santykinai didelis jų kiekis buvo nustatytas ir antinksčiuose, sėklidėse, geltonkūnyje, tinklainėje ir odoje [19].

1.1.3. Funkcijos ir klinikinė reikšmė

Karotenoidai atlieka svarbių funkcijų įvairiuose biologiniuose procesuose. Visų pirma jie svarbūs augalams ir mikroorganizmams, kurie patys juos sintetina. Karotenoidai suteikia augalams spalvą, gali absorbuoti šviesą, bet kartu veikia ir kaip apsauga nuo per didelio šviesos poveikio –

apsaugo nuo jos sukeltų pažeidimų [9]. Taip pat veikia kaip kai kurių hormonų pirmtakai, kitų organizmų atraktantai bei reguliuoja augimą ir vystymąsi [57]. Žmogaus organizmui jie ypač svarbūs dėl didelio antioksidacinio aktyvumo [14], dalyvavimo ląstelės augimo reguliacijoje, imuniniame atsake [12]. Dėl savo struktūroje turimų konjuguotų dvigubųjų jungčių, karotenoidai efektyviai sąveikauja su reaktyviomis deguonies rūšimis [11]. Jie gali neutralizuoti labai reaktyvų singuletinį deguonį ir paversti jį stabilesniu tripletiniu deguonimi, taip pat esant mažam deguonies slėgiui, jungtis su peroksilo radikalais ir taip padaryti juos nekenksmingais. Kadangi daugumoje biologinių audinių ir vyrauja mažas deguonies parcialinis slėgis, karotenoidai svarbūs užkertant kelią lipidų peroksidacijai *in vivo* [13, 34]. Kita svarbi karotenoidų funkcija – tai yra vitamino A (retinolio) pirmtakai [34]. Vitaminas A ypač svarbus regėjimui, ląstelių diferencijavimuisi, glikoproteinų sintezei, augimui ir kaulų vystymuisi bei gleivių sekrecijai epiteliniuose audiniuose. Apskaičiuota, kad apie 60 proc. iš maisto gaunamo vitamino A yra iš pro-vitamino A šaltinių [28]. Pro-vitamino A aktyvumu pasižymi tokie karotenoidai kaip α -karotenas, β -karotenas ir β -kriptoksantinas, o liuteinas, likopenas ir zeaksantinas nėra verčiami į aktyvius retinoidus [71].

Atlikta daug tyrimų, įrodančių, kad mityba, kurią sudaro daug karotenoidų turinčios daržovės ir vaisiai, gali sumažinti riziką sirgti kai kuriomis ligomis. Mažindami ląstelių lipidų, lipoproteinų, baltymų ir DNR oksidacinius pažeidimus, karotenoidai gali apsaugoti nuo aterosklerozės [14], taip pat spėjama, kad jie prisideda prie sumažėjusios rizikos sirgti tam tikrų rūšių vėžiu, 2 tipo cukriniu diabetu [25] koronarine širdies liga ir kt. [35]. Atlikti tyrimai nustatė, jog likopenas gali sumažinti riziką sirgti šlapimo pūslės, prostatos, skrandžio ir krūties vėžiu [13], o padidėjusi jo koncentracija riebaliniame audinyje yra siejama su mažesniu miokardo infarkto dažniu [24]. Naujausi tyrimai parodė, kad β -karotenas ir vitaminas A yra svarbios medžiagos lipidų apykaitos reguliacijoje ir gali tapti pagrindiniais nutukimo ar nutukimo sutrikimų gydymo ir prevencijos veiksniais [52]. Liuteinas ir zeaksantinas gali apsaugoti nuo akies geltonosios dėmės degeneracijos, kadangi atlieka svarbų vaidmenį akies tinklainėje, taip pat teigiama, kad pro-vitamino A aktyvumo neturintys karotenoidai yra svarbūs užtikrinant kaulų sveikatą [58].

Likopeno biologinis aktyvumas gali priklausyti nuo jo izomerų. Nustatyta, kad *Z*-likopeno izomerai turi stipresnį antioksidacinį aktyvumą, nei *E*-likopenas. Dėl šios priežasties manoma, kad būtent *Z*-likopeno izomerai galimai turi didesnę poveikį sveikatai [75]. Zou ir kt. [76] tyrimo metu nustatyta, kad būtent *Z*-likopeno izomerai, palyginus su *E*-likopenu, parodė labiau pastebimą gerybinę prostatos hiperplazijos (GPH) vystymosi slopinimą. Taip pat atliktas mokslinis tyrimas parodė, jog vartojimas daržovių, kuriose gausu *Z*-likopeno, gali apsaugoti nuo žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekcijos: nustatyta, kad ŽPV persistencija sumažėja 56 proc. moterims, kurių

Z-likopeno izomerų koncentracija buvo didesnė [77]. Taip pat, dėl antioksidacinio poveikio, dalyvavimo proliferacijos, apoptozės procesuose, likopenas ir jo izomerai gali būti svarbūs chemoterapijos atveju [78].

1.1.4. Nustatymo metodai

Siekiant įvertinti karotenoidų privalumus ir panaudoti įvairiose srityse yra svarbu juos tiksliai identifikuoti ir nustatyti jų koncentraciją įvairiose biologinėse medžiagose. Svarbūs ne tik greiti, paprasti ir jautrūs identifikavimo ir nustatymo analitiniai metodai, bet pirmiausia ir tinkamas mėginio paruošimas [60].

Karotenoidų kiekybiniam tyrimui yra reikalingi keturi etapai: ekstrakcija, atskyrimas, identifikavimas ir kiekybinis įvertinimas [24]. Bendro ar standartizuoto karotenoidų ekstrakcijos metodo nėra, tačiau dauguma metodų yra panašūs ir vadovaujasi tam tikrais bendrais principais [54, 59]. Kraujo plazmoje ar kraujo serume esantys baltymai dažniausiai nusodinami naudojant etanolį [61], o ekstrakcijai pasirenkamas organinis ir nesimaišantis tirpiklis kaip acetonas, chloroformas, metanolis, izopropanolis, dietilo eteris ar jų deriniai, o dažniausiu pasirinkimu tampa *n*-heksanas [62].

Karotenoidų identifikavimui gali būti taikomi tiek spektrofotometriniai, tiek chromatografiniai metodai. Dėl karotenoidų konjuguotos polieninių grandinių sistemos jie gerai sugeria šviesą regimojoje ir ultravioletinėje (UV) spektro srityje [63]. Spektrofotometriniai absorbcijos matavimai gali būti naudojami kiekybiškai įvertinti gryną karotenoidų koncentraciją arba bendrą karotenoidų koncentraciją mišinyje arba ekstraktoje [64]. Karotenoidų analizei gali būti taikomi tokie paprasčiausi chromatografiniai metodai kaip klasikinis atviros kolonėlės as plonasluoksnės chromatografijos metodas [66, 67], tačiau jiems reikalingas didelis tiriamosios medžiagos kiekis ir palyginti su kitais metodais skiriamoji geba yra maža ir pakankamai ilgas analizės laikas. Efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) sukūrimas sukėlė revoliuciją karotenoidų tyrimuose ir žymiai pagerino jų atskyrimą ir kiekybinį nustatymą [24]. Dėka komerciškai gaminamos stacionarios fazės ir labai mažo jos dalelių dydžio ypač pagerėjo metodo skiriamoji geba ir atkuriamumas [63]. Taip pat tokie privalumai kaip metodo paprastumas, greitis, jautrumas, tikslumas, specifiškumas ir mėginio tausojimas [24], pavertė ESCh labiausiai paplitusiu analitiniu metodu karotenoidų nustatymui [24, 32]. Dažniausiai naudojama atvirkščių fazių ESCh su gradientiniu eliuacijos režimu, tačiau gali būti taikoma tiek normalių fazių ESCh, tiek izokratinis eliuacijos režimas [56, 57]. Judrios fazės parinkimas taip pat svarbus žingsnis. Atvirkščių fazių ESCh

atveju naudojami tokie poliniai tirpikliai kaip vanduo, metanolis, acetonitrilas, 2-propanolis, acetonas, etilacetatas, tetrahidrofuranas, tert-butilmetileteris (MTBE), dichlormetanas, chloroformas ir jų mišiniai [57]. Dažniausiai ESCh taikoma su C18 ar C30 kolonėle [57, 63]. Naudojant C18 stacionarią fazę galima greitai ir lengvai atskirti palyginti trumpą grandinę ir mažą molekulinę masę turinčias analites [65], C30 stacionarioji fazė dažniau naudojama sudetingesnėms analizėms, kada reikalingas tikslesnis karotenoidų atskyrimas, pavyzdžiui, atskirti likopeno *trans* izomerus nuo *cis* izomerų [63, 38, 57]. Efektyvioji skysčių chromatografija karotenoidų kiekybiniam nustatymui dažniausiai naudojama su UV ir regimojo spektro spindulių spektrofotometriniais detektoriais [61, 62], tačiau gali būti naudojami ir fotodiodų matricos [61, 63], refraktometriniai, elektrocheminiai, masių spektrometriniai detektoriai [24, 57].

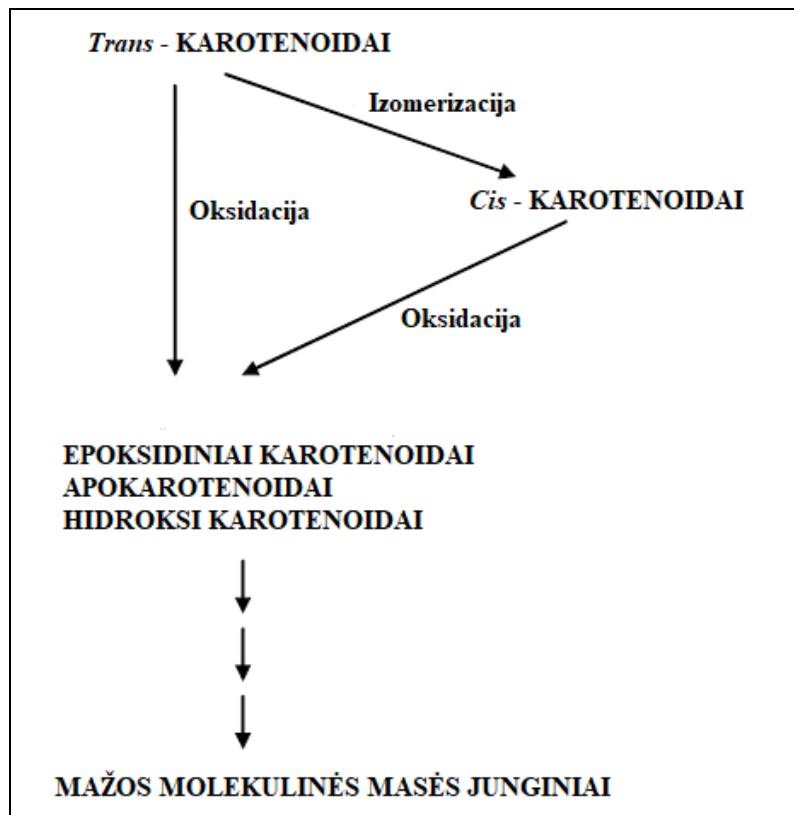
1.1.5. Skilimas

Dėl savo struktūros karotenoidai yra svarbūs vykdant įvairias biologines funkcijas, tačiau kartu tai yra ir pagrindinė jų nestabilumo priežastis, lemianti jautrumą oksidacijai ir geometrinei izomerizacijai [28, 43]. Karotenoidų skilimas gali įvykti tiek dėl cheminio ar fizikinio poveikio, tiek dėl fermentų katalizuojamų reakcijų [46]. Jie ypač jautrūs šilumos, šviesos, deguonies ir rūgščių poveikiui [43, 45, 69].

Šviesa, šiluma ir rūgštys skatina *trans* karotenoidų izomerizavimąsi į *cis* formas [28], o tai turi įtakos junginių biologinėms savybėms, prieinamumui ir antioksidaciniam aktyvumui [43]. UV spindulių poveikis, taip pat hipochloro rūgštis, kurią skatina neutrofilai *in vivo* yra svarbūs karotenoidų destrukcijai [44]. Biologiškai katalizuojamus skilimo procesus vykdo arba nespecifiniai fermentai, kaip peroksidazės ir lipoksigenazės, arba karotenoidų skilimo oksigenazės, specifiskai veikiančios dvigubąsias karotenoidų jungtis [46]. Pagrindinė degradacijos priežastis yra oksidacija [43,47]. Oksidacija priklauso nuo esamo deguonies, karotenoidų struktūros ir fizinių sąlygų [28], gali būti katalizuojama fermentais, metalais, šiluma ir šviesa, ir sukelti karotenoidų spalvos ir biologinio aktyvumo praradimą [47]. Taigi fizinio ir cheminio oksidacinio streso poveikis sukelia karotenoidų oksidacinį skilimą ir lakių bei nelakių junginių susidarymą [48]. Susidaro tokie karotenoidų skilimo produktai [44] kaip β-jononas, β-ciklocitralas, epoksidiniai junginiai ir įvairūs, skirtingo ilgio anglies grandinės ketonai ir aldehydai. Šie degradacijos produktai gali turėti biologinį aktyvumą, kuris skiriasi nuo karotenoidų pirmtakų poveikio ir gali būti toksiškas [48]. Pavyzdžiui karotenoidų skilimo produktai slopina Na⁺ -K⁺ -ATPazės aktyvumą ir pažeidžia mitohondrinį kvėpavimą [44, 48], β-karotino ir likopeno degradacijos produktai inhibuoja imuninės sistemos

funkcijas *in vitro* ir kai kurie iš jų dėl stipraus poliškumo gali sukelti oksidacinį stresą [45], β -jononas ir jo dariniai yra stiprūs ląstelių augimo inhibitoriai ir vertinami kaip galimi antikancerogeniniai chemoterapiniai veiksniai [48]. Taip pat įrodyta, kad cigarečių dūmuose esantys organiniai laisvieji radikalai, tokie kaip alkilas, alkoksilas ir peroksilas, aldehidai ir azoto oksidai, suardo karotenoidus, dėl ko rūkančių žmonių kraujo serume karotenoidų kiekis yra mažesnis [45].

1.3 paveiksle pavaizduota galima karotenoidų degradacijos schema.



1.3 pav. Karotenoidų degradacijos shema [28].

1.2. Karotenoidų stabilumas

Neatsiejama daugumos epidemiologinių ir klinikinių tyrimų dalis – įvairių biožymenų vertinimas kraujo mėginiuose [15, 51]. Karotenoidai taip pat tampa vis svarbesniu tyrimo objektu, kadangi epidemiologiniuose tyrimuose padidėjusi jų koncentracija vis dažniau siejama su sumažėjusia ligų rizika. Siekiant tiksliai išmatuoti jų koncentraciją mėginyje yra svarbu ne tik tinkamas metodo pasirinkimas, bet ir preanaliziniai veiksniai, tokie kaip mėginio surinkimas, laikymas ir apdorojimas, kurie gali paveikti mėginio stabilumą.

Įvairūs faktoriai po mėginio ekstrakcijos ir prieš analizę, gali lemti karotenoidų degradaciją ir jos nulemtus netikslius karotenoidų mėginio koncentracijos matavimo duomenis. Dėl savo cheminės struktūros karotenoidai yra pakankamai jautrūs oksidacijos ir izomerizacijos procesams, sukeltiems deguonies, aukštos temperatūros ar šviesos poveikio. Stabilumo tyrimai atskleidžia kritinius mėginių saugojimo taškus, kuriuose karotenoidai gali tapti nestabilūs [15].

1.2.1. Preanalizės stadijos poveikis karotenoidų stabilumui

Preanalizės stadija yra viena iš svarbiausių siekiant užtikrinti tikslius rezultatus. Preanalizės klaidos sudaro apie 70 procentų visų laboratorijos klaidų, kurios įvyksta dėl netinkamo mėginio surinkimo, paruošimo ir laikymo [16], todėl svarbu užtikrinti tinkamą reikalavimų laikymąsi.

Teigiama, kad tokie karotenai kaip likopenas, α ir β karotenai, paprastai yra gana nestabilūs, kai yra laikomi neapsaugoti nuo šviesos, oro ir temperatūros. Pervežant kraujo serumo karotenų mėginius, būtina juos laikyti šaltai ir apsaugoti nuo šviesos poveikio [12].

Pakankamai svarbus veiksnys yra mėginio paėmimo laikas, nes kai kurių žymenų įverčiai gali kisti priklausomai nuo sezono, mėnesio, savaitės ar net valandų. Karotenoidų koncentracija mėginio surinkimo laiko atžvilgiu gali įvairuoti priklausomai nuo sezono, taigi planuojant tyrimus svarbu atsižvelgti į mėginio surinkimo sezoniškumą [15].

Mėginio surinkimas ir tolesnis jo paruošimas turėtų būti atliekamas vadovaujantis tikslia tvarka, pagal standartizuotas procedūras, tačiau atliekant kai kuriuos tyrimus to neįmanoma padaryti. Epidemiologinių tyrimų metu mėginiai yra dažnai surenkami ir saugomi tam tikrą laiką iki kol bus paruošti. Siekiant gauti tikslius tyrimo rezultatus, svarbu pasirinkti tinkamas laikymo sąlygas ir trukmę [15]. Nuo šviesos poveikio mėginiai turėtų būti saugomi visada – ir surinkimo metu, ir atliekant tyrimą [12].

Tiriant laiko iki mėginių paruošimo poveikį karotenoidų koncentracijai buvo pastebėtas tik nedidelis poveikis bendram karotenoidų kiekiui. Visgi, tyrimų duomenimis, β -kriptoksantino koncentracija sumažėjo statistiškai reikšmingai atidėjus mėginio paruošimą iki 144 valandų (6 paros) [33]. Ankstesnių tyrimų duomenimis, uždelstas mėginių paruošimą iki 28 valandų, didžiausias pokytis pastebėtas β -karoteno atveju (sumažėjo 5,5 proc. per dieną) [72], o pagal Key ir kt. [70] atliktus tyrimus 24 valandoms uždelstas paruošimas įtakos turėjo α -karoteno ir likopeno koncentracijai: α -karoteno sumažėjo 8,7 proc. ($p < 0,05$), o likopeno – 6,7 proc. (pokytis nelaikytas statistiškai reikšmingu) [33].

1.2.2. Šviesos ir mėginių laikymo temperatūros įtaka karotenoidų stabilumui

Kai kuriuose literatūros šaltiniuose teigiama, kad karotenoidai visame kraujyje gali išlikti stabilūs iki savaitės, jei laikomi šaltai, o laikomi kambario temperatūroje kai kurie karotenoidai gali degraduoti, nors išmatuoti pakitimai yra nežymūs [12, 15]. Pagal Cuerq ir kt. [16] atliktą tyrimą, kraujyje karotenoidai išlieka stabilūs iki 48 valandų kambario temperatūroje be jokios papildomos apsaugos nuo šviesos, o ir vėliau užfiksuoti pakitimai neperžengia didžiausios pokyčio ribos (angl. *total change limit (TCL)*), kas rodo, jog karotenoidai yra pakankamai stabili analitė. Tuo pačiu tyrimu nustatyta, kad 32 °C temperatūroje karotenoidų stabilumas išlieka iki 3 dienų, o kambario temperatūroje – iki 7 dienų. Priešingai teigiama kitame tyrime, kur nustatyta, jog kraują laikant 32 °C temperatūroje, per tris dienas pastebėtas reikšmingas daugumos karotenoidų koncentracijos sumažėjimas (2–25 proc.) [36]. Kito tyrimo metu nustatyta, kad skirtingi karotenoidai nevienodai išlaiko stabilumą, pavyzdžiui β-karoteno koncentracija jau po 48 valandų kambario temperatūroje sumažėjo pakankamai reikšmingai – 16 procentų [16]. Kitame tyrime nustatytas likopeno koncentracijos jautrumas. Pastebėta, kad likopeno koncentracija reikšmingai sumažėja mėginį laikant 24 valandas tiek kambario temperatūroje dienos šviesoje, tiek 4 °C temperatūroje tamsoje, nors kitų karotenoidų koncentracijos per tokį laiką nepakinta. Laikant kraujo mėginius 35 °C temperatūroje šviesoje didžiausiu stabilumu pasižymėjo α-karotenas, kuris išliko stabilus iki 72 valandų [24].

Nagrinėjant karotenoidų stabilumą kraujo serumo mėginiuose, nustatyta, kad mėginiai išlieka stabilūs laikant juos 4 °C temperatūroje šviesoje ar tamsoje iki 14 dienų, kambario temperatūroje tamsoje – iki 7 dienų, o šviesoje – tik iki 3 dienų. Laikant mėginius užšaldytus tiek –70 °C, tiek –30 °C temperatūroje, karotenoidų koncentracija serume nepakito ir po 14 dienų. Taip pat nustatyta, kad pakartotinis užšaldymas –70 °C temperatūroje ir atšildymas neturi reikšmingų pokyčių [12, 37].

Pagal Drammeh ir kt. [36] atliktą tyrimą, kraujo serumo mėginius laikant 11 °C temperatūroje iki 14 dienų, buvo užfiksuoti pavienių karotenoidų koncentracijos pokyčiai. α-karoteno, *trans*-β-karoteno ir *trans*-likopeno koncentracijos padidėjo 1–2 proc. po 7 dienų, *cis*-β-karoteno – po 10 dienų. β- kriptoksantino ir liuteino + zeaksantino koncentracijos pokyčių nepastebėta net ir po 14 dienų. Tačiau įvertinus analizės ir biologinę variaciją paaiškėjo, kad karotenoidų koncentracijos statistiškai reikšmingi skirtumai neperžengė didžiausios pokyčio ribos ir laikyti kliniškai nereikšmingais.

Keletas tyrimų atskleidė, kad kitaip nei natūrali saulės šviesa, dirbtinė patalpų šviesa neturi įtakos karotenoidų koncentracijai [15, 37]. Kraujo plazmos mėginiuose esantys karotenoidai esant laboratoriniam apšvietimui išlieka stabilūs mažiausiai 24 valandas. Su ir kt. [24] atliktas tyrimas, kurio metu kraujo plazmos mėginiai buvo laikyti kambario temperatūroje, apšviesti fluorescencine šviesa iki 72 valandų, parodė, jog β -karoteno, α -karoteno, kriptoksantino ir cis-likopeno koncentracijos nepakito. Tačiau prie statistiškai reikšmingos vertės ($p = 0,054$) priartėjo liuteino+zeaksantino koncentracijos pokytis, o *trans*-likopeno koncentracija jau po 48 valandų sumažėjo 10 proc.

1.2.3. Karotenoidų stabilumas po ekstrakcijos

Siekiant nustatyti tikslią karotenoidų koncentraciją, svarbūs ne tik veiksniai, galintys paveikti mėginio stabilumą prieš jį apdorojant, bet ir jo ekstrakcijos metu ar po jos. Teigiama, kad karotenoidai tampa ypač nestabilūs išskyrus juos į organinius tirpiklius – nors molekulės yra pakankamai stabilios esant matricoje, tačiau patekusios į tirpalą tampa ypač jautrios šviesai, šilumai, rūgštims ir deguoniui [59]. Iš plazmos į heksaną, kuriame yra 0,01 proc. BHT, išskirti karotenoidai net laikant juos $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje rodė statistiškai reikšmingą rezultatų kintamumą. Panašūs rezultatai buvo pastebėti išskirtus mėginius laikant $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Mėginius laikant kambario temperatūroje, matavimų kintamumas buvo mažesnis, tačiau net ir gavus tokius rezultatus nerekomenduojama mėginių laikyti kambario temperatūroje [24].

Tyrimas atliktas su iš kraujo plazmos išskirtais karotenoidais parodė, jog svarbiausias jų stabilumo kintamasis buvo laikymo laikas. Tai patvirtino hipotezę, kad yra stiprus ryšys tarp mėginio laikymo laiko iki tyrimo ir karotenoidų kiekio kraujo plazmos mėginyje. Buvo pastebėta, kad svarbi ir laikymo temperatūra, kadangi esant skirtingoms temperatūroms stabilumas buvo nevienodas. Laikant išskirtus mėginius $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje karotenoidai išliko stabilūs iki 120 dienų, o laikant mėginius $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, tokį ilgą laiką koncentracijos neišliko stabilios [17]. Karppi ir kt. atliko stabilumo tyrimą su iš kraujo plazmos išskirtais ir $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje savaitę laikomais karotenoidais. Jau po dviejų dienų buvo pastebėtas likopeno ir α -karoteno kiekio sumažėjimas ($13,0 \pm 2,7$ proc. ir $11,0 \pm 1,3$ proc.). Išmatavus kiekius po savaitės, koncentracijos sumažėjo dar labiau – atitinkamai $29,0 \pm 2,0$ proc. ir $23,0 \pm 9,0$ proc., lyginant rezultatus su ką tik išskirtomis ir pamatuotomis koncentracijomis. Remiantis atliktu tyrimu buvo padaryta išvada, kad išskirtų karotenoidų mėginiai gali būti laikomi 3 dienas $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje be reikšmingo

karotenoidų kiekio sumažėjimo, išskyrus likopeną ir α -karoteną, kurie, kaip nustatyta, yra mažiau stabilūs [38].

Dauguma ankstesnių mokslinių tyrimų metu buvo tiriamas karotenoidų stabilumas išskirtuose mėginiuose tik iki 24 valandų laikymo. Pagal Talwar ir kt. [39] karotenoidai išliko stabilūs iki 24 valandų priklausomai nuo laikymo temperatūros ar antioksidanto naudojimo. Su ir kt. [40] atlikti tyrimai taip pat parodė laikymo temperatūros svarbą išskirtiems mėginiams, priešingai negu Craft ir kt. [41] ir Cavina ir kt. [42] atlikti tyrimai, kai iš plazmos išskirti karotenoidai išliko stabilūs ir kambario temperatūroje.

Likopenas yra vienas jautriausių karotenoidų ir ypač linkęs izomerizuotis, todėl dažnai tiriamas likopeno izomerų stabilumas. Murakami ir kt. [49] tyrė likopeno izomerų temperatūrinį stabilumą. Esant 4 °C temperatūrai nustatyta, kad bendra likopeno koncentracija mažėja pakankamai lėtai. Tuo tarpu ties 25 °C ir 40 °C temperatūra, bendra likopeno koncentracija ženkliai nepakinta per pirmas 10 dienų, tačiau poto koncentracija pradeda sparčiai mažėti. Tiriant likopeno izomerų (5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis*) stabilumą, rezultatai buvo labai panašūs, taigi didelių stabilumo skirtumų tarp *trans* ir *cis* izomerų nepastebėta. Pagal Ishida ir kt. [56] atliktą tyrimą, kurio metu buvo tiriamas laiko ir temperatūros poveikis likopeno izomerizacijai pastebėta, kad laikant likopeną kambario temperatūroje tamsoje, *trans* izomerų kiekis sumažėja, tačiau didėja *cis* izomerų. Taip pat tyrimo metu padaryta išvada, kad esant kuo aukštesnei temperatūrai, izomerizacija linkusi greitėti – laikant mėginius –20 °C temperatūroje, *trans* likopeno sumažėjo apie 4 proc. per 9 dienas, kai tuo tarpu 21-23 °C temperatūroje sumažėjimas siekia 64 proc. Taip pat šio eksperimento metu buvo tirtas antioksidanto butilhidroksianizolio (BHA) poveikis, tačiau žymaus pagerėjimo nepastebėta, todėl autoriai siūlo iš biologinių mėginių ekstrahuotą likopeną laikyti –20 °C temperatūroje tamsoje, siekiant išvengti izomerizacijos.

1.2.4. Ilgalaikis karotenoidų mėginių saugojimas

Siekiant išsaugoti nepakitusius mėginius ilgą laiką, svarbu sumažinti skilimo tikimybę, tad geriausia juos šaldyti kuo žemesnėje įmanomoje temperatūroje [15]. Pastebėta, kad ilgalaikiam saugojimui –20 °C ar –30 °C temperatūra nėra tinkama [24]. Laikant mėginius –20 °C temperatūroje jau po kelių savaičių nustatomi karotenoidų koncentracijos pokyčiai [24, 37]. Viename iš dešimtmetį trukusių tyrimų teigiama, kad mėginius saugojant –20 °C temperatūroje po 6 mėnesių nustatytas 15 proc. karotenoidų koncentracijos sumažėjimas, o po 10 metų – iki 97 proc.

[15]. Nors stebint β -karoteno stabilumą $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, per pirmus 6 mėnesius koncentracijos sumažėjimas nenustatytas, tačiau po 9 mėnesių koncentracija sumažėjo apie 30 proc. [24].

Vieno tyrimo metu nustatyta, kad mėginius laikant $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje karotenoidų koncentracija lieka stabili iki 10 metų [15]. Kito tyrimo metu atskleidžiama, kad β -karoteno, β -kriptoksantino, liuteino + zeaksantino ir likopeno stabilumas laikant juos $-77\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje išlieka iki 4 metų.

1.3. Apibendrinimas

Nors dauguma mokslinių straipsnių teigia, kad tinkamiausia temperatūra mėginių saugojimui yra $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ir žemesnė temperatūra [24], tačiau mėginių saugojimo trukmės atžvilgiu, literatūros duomenys yra priešaringi. Taip pat nevienareikšmiai literatūros duomenys pastebimi ir karotenoidų mėginių po ekstrakcijos atžvilgiu. Dauguma tyrimų atlikta vertinant tik 24 valandų išskirto mėginio laikymo poveikį [39 – 42]. Taip pat vieni mokslininkai teigia, kad net laikant išskirtus karotenoidus $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ar $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, nustatomi statistiškai reikšmingi koncentracijos pokyčiai [24], kai tuo tarpu Karppi ir kt. [38] atlikto tyrimo metu dauguma karotenoidų $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje išliko stabilūs iki 3 dienų.

Taigi, tyrimo dizainą pasirinkome atsižvelgdami į dažniausiai pasitaikančias praktinio darbo aplinkybes ir priešaringiausius literatūros šaltinių duomenis.

2. TYRIMO METODIKA

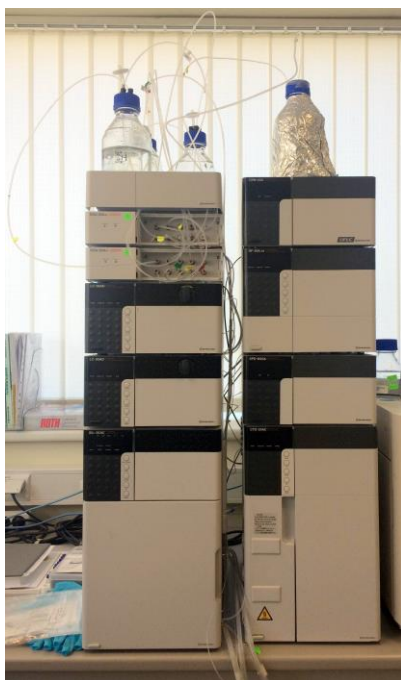
2.1. Naudoti reagentai

- karotenoidų standartinių medžiagų tirpalai (40-150 µg/ml): karotenoidų standartinės medžiagos toluene ir cikloheksano mišinyje (1:4), liuteino ir zeaksantino standartinės medžiagos etanolyje (1:10);
- n-heksanas (*Sigma-Aldrich*, Vokietija);
- etanolis (*Merck*, Vokietija);
- petrolio eteris (*B.D.H.*, D. Britanija);
- ≥99,9 proc. grynumo metanolis (*Honeywell*, JAV);
- ≥99,8 proc. grynumo tert-butilmetileteris (*Honeywell*, JAV);
- echinenonas (β, β – karoten-4-onas) (*Chromadex*, JAV);
- butilhidroksitoluenas (*Merck*, Vokietija);
- >99,99 proc. grynumo azoto dujos.

2.2. Prietaisai ir laboratoriniai reikmenys

- kvarcinė mikrokiuvetė (10 mm, 45x12, 5x12,5 mm, 700 µl) (*Hellma*, Vokietija);
- šlifinės skaidraus stiklo matavimo kolbutės stikliniu kamščiu (*Brand*, Vokietija);
- 150 mm ilgio, stiklinės, negraduotos Pastero pipetės;
- spektrofotometras „UV-1601“ (*Shimadzu*, Japonija);
- ultragarsinė vonelė „USC100T“ (*VWR*, Belgija);
- išgrynintas dejonizuotas vanduo (*Millipore*, JAV);
- svarstyklės „KERN ABJ“ (*KERN & SOHN GmbH*, Vokietija);
- plačiagurkliai chromatografiniai užsukami rudo stiklo buteliukai (*Agilent Technologies*, JAV);
- užsukami kamšteliai su PTFE silikono tarpine (*Agilent Technologies*, JAV);
- Efektyviosios skysčių chromatografijos sistema (*Shimadzu Prominence*, Japonija):
 - UV/regimojo spektro spektrofotometriniis detektorius, SPD-M20A;
 - Kolonėlių termostatas CTO20AC;

- Dujų šalinimo įrenginys DGU-20A5R;
 - Sistemos valdiklis CMB-20A;
 - Automatinis dozatorius SIL-30AC.
 - Tirpiklių tiekimo blokas LC-30AD.
- ESCh kolonėlė, Stabilitų 100 C30, 250 mm x 4,6 mm; dalelių dydis 5 μm (*Dr. Maisch GmbH, Vokietija*);
 - ESCh apsauginės prieškolonėlės, C30, 20 mm x 4,6 mm (*Dr. Maisch GmbH, Vokietija*);
 - ESCh apsauginių kolonėlių laikiklis (*Dr. Maisch GmbH, Vokietija*);
 - sūkurinis maišytuvus „RS-VF10“ (*Phoenix instrument GmbH, Vokietija*);
 - mikrocentrifuga „Velocity“ 13 μ (*Dynamica, JK*);
 - garintuvas-inkubatorius DB28125 (*Barnstead Thermolyne, JAV*);
 - keičiamo tūrio mikrolitrinės pipetės ACURA, 20-200 ml ir 100-1000 ml tūrio (*Spcorex, Šveicarija*);
 - 2 ml tūrio mikromėgintuvėliai;
 - 250 μl tūrio įdėklai į plačiagurklius buteliukus (*Agilent Technologies, JAV*);
 - šaldiklis „ULTRAFREEZER 480“ (*Fiocchetti, Italija*);
 - šaldiklis „GFL 6380“ (*GFL, Vokietija*);
 - laboratoriniai indai.



2.1 pav. Efektyviosios skysčių chromatografijos sistema (*Shimadzu Prominence, Japonija*).

2.3. Tyrimams naudoti mėginiai

Tyrimui naudoti kraujo serumo mėginiai buvo atrinkti iš mėginių, skirtų 2011-2015 metais VU MF vykdyto Visuotinės dotacijos priemonės Europos socialinio fondo ir Lietuvos Respublikos bendrojo finansavimo lėšomis finansuoto projekto „Lietuvos populiacijos genetinė įvairovė ir sandaros kitimai, susiję su evoliucija ir dažniausiai paplitusiomis ligomis“ (akronimas LITGEN; vadovas prof.habil. dr. V. Kučinskas).

Buvo pasirinkti 2012 metais surinkti kraujo serumo mėginiai ir iš jų, atsitiktine tvarka atrinkta 60 mėginių. 20 mėginių, kurių karotenoidų koncentracijos jau buvo nustatytos 2012 metais, panaudoti siekiant įvertinti ilgalaikį mėginių saugojimo poveikį karotenoidų koncentracijai. Likę mėginiai naudoti karotenoidų stabilumo analizei, kurios metu iš kraujo serumo išskirti karotenoidai laikyti 22° C temperatūroje tam tikrą laiką (24 valandas, 72 valandas ir 168 valandas). Visi mėginiai iki tyrimų laikyti šaldiklyje, –80 °C temperatūroje.

Kiekvieno tiriamojo kraujo serumo karotenoidai buvo išskirti po du kartus. Apskaičiuotas variacijos koeficientas tarp pakartotų mėginių koncentracijų neviršijo 10 proc. Iš viso efektyviosios skysčių chromatografijos sistema atlikta 240 matavimų. Vidinės standartinės medžiagos atkuriamumas 94 ± 14 proc.

2.4. Karotenoidų standartinių medžiagų tirpalų koncentracijos spektrofotometrinis nustatymas

Buvo atliktas spektrofotometrinis karotenoidų standartinių medžiagų tirpalų tyrimas koncentracijai nustatyti. Karotenoidų standartinių medžiagų tirpalai skiesti tam tikru tirpikliu (heksanu, etanoliu ar petrolio eteriu) ir santykiu (1:10, 1:20 ar 1:50). Skiestų karotenoidų standartinių medžiagų tirpalų koncentracijos išmatuotos esant atitinkamam bangos ilgiui ir iš gautų rezultatų apskaičiuota kiekvieno karotenoido standartinės medžiagos tirpalo koncentracija (c):

$$c [\mu\text{g/ml}] = E \times 1000 / E_{1\%,1\text{ cm}} \times 10 \times \text{skiedimo faktorius}$$

Šiuo atveju $E = E_{\text{(karotenoido standartinės medžiagos tirpalo)}} - E_{\text{(tirpiklio)}}$, o $E_{1\%,1\text{ cm}}$ tai specifinis ekstincijos koeficientas. Skiedimo faktorius atitinkamai 10, 20 arba 50.

Tikslūs karotenoidų standartinių medžiagų tirpalų tirpikliai, bangos ilgiai ir $E_{1\%,1\text{ cm}}$ vertės nurodytos **2.1 lentelėje**.

2.1 lentelė. Tirpiklių, bangos ilgio, $E_{1\%,1\text{ cm}}$ ir skiedimo vertės naudotos karotenoidų standartinių medžiagų tirpalų koncentracijai apskaičiuoti.

<i>Karotenoidas</i>	<i>Tirpiklis</i>	<i>Skiedimas</i>	<i>$E_{1\%,1\text{ cm}}$</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>
Liuteinas	Etanolis	1:10	2550	445
Zeaksantinas	Etanolis	1:10	2480	450
Kriptoksantinas	Petrolio eteris	1:20	2400	449
α -karotenas	n-heksanas	1:20	2710	445
β -karotenas	n-heksanas	1:20	2590	450
Likopenas	Petrolio eteris	1:50	3450	470
Kantaksantinas	Petrolio eteris	1:10	2220	466

2.5. Karotenoidų išskyrimas iš kraujo serumo mėginių

Pirmiausia į 500 μl kraujo serumo įdėta 500 μl vidinės standartinės medžiagos tirpalo ir maišyta 1 minutę sukuriniu maišytuvu. Vidine standartine medžiaga naudotas etanolis skiestas echinenonas (1:200 skiedimas). Karotenoidų ekstrakcijai panaudota 400 μl heksano su 0,1 proc. butilhidroksitolueno ir mėginys centrifuguotas 2 minutes, 2000 aps./min greičiu. Po centrifugavimo viršutinis heksano sluoksnis (**2.2 pav.**) perpiltas į naują mikromėgintuvėlį. Ekstrakcija su heksanu pakartota dar du kartus. Surinktas karotenoidų ekstraktas heksane (apie 1 ml) išdžiovintas naudojant garintuvą-inkubatorių su švelniu azoto dujų srautu, 30 ± 1 °C temperatūroje. Gautos nuosėdos (**2.2 pav.**) ištirpintos 250 μl MeOH ir MTBE (1:1, v/v) mišinyje. Tirpalas centrifuguotas 4 minutes, 13 500 aps./min greičiu ir perkeltas į chromatografinį buteliuką su įdėklu.

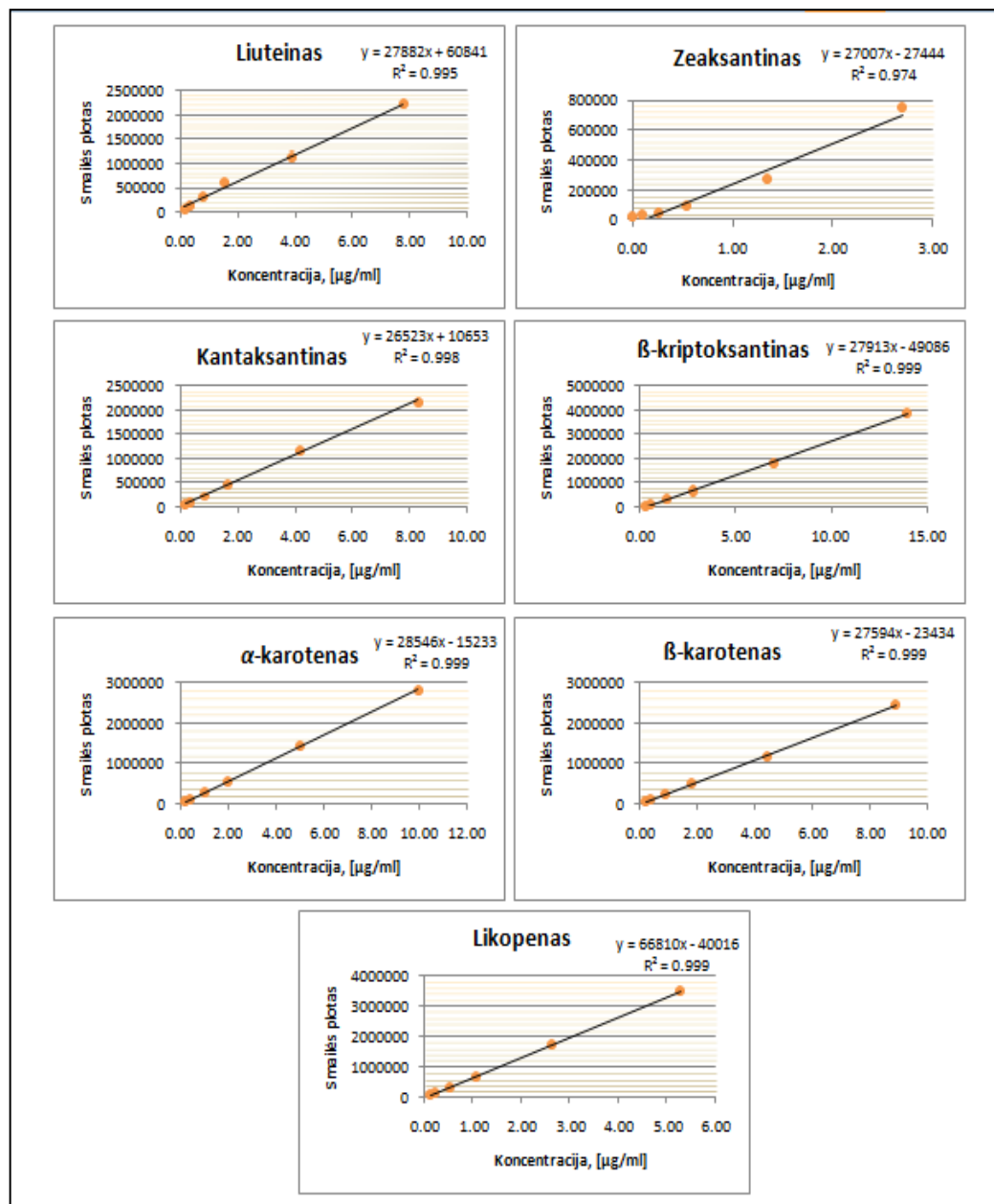


2.2 pav. Karotenoidų ekstrakcija iš kraujo serumo mėginių: kraujo serumo mėginys užpiltas heksanu ir nucentrifuguotas (kairėje) ir karotenoidų ekstraktas išdžiovintas azoto dujų srautu (dešinėje).

2.6. Karotenoidų standartinių medžiagų tirpalų paruošimas chromatografijai

Karotenoidų standartinių medžiagų tirpalai laikyti šaldiklyje -20°C temperatūroje atšildyti, o nuosėdos pašalinamos naudojant ultragarsinę vonelę. Buvo pagaminti kiekvieno karotenoido standartinės medžiagos serijiniai skiedimai su judriąja faze (MeOH:MTBE (1:1,v/v)): 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:250 ir 1:500 santykiu. Paruošti skiedimai naudoti chromatografiniam tyrimui.

Iš gautų chromatografijos rezultatų ir spektrofotometriniu būdu nustatytų karotenoidų standartinių medžiagų tirpalų koncentracijų (**2.4 skyrius**) buvo sudarytos kiekvieno karotenoido standartinės medžiagos kalibracinės kreivės (**2.3 pav.**).



2.3 pav. Karotenoidų standartinių medžiagų kalibracinės kreivės.

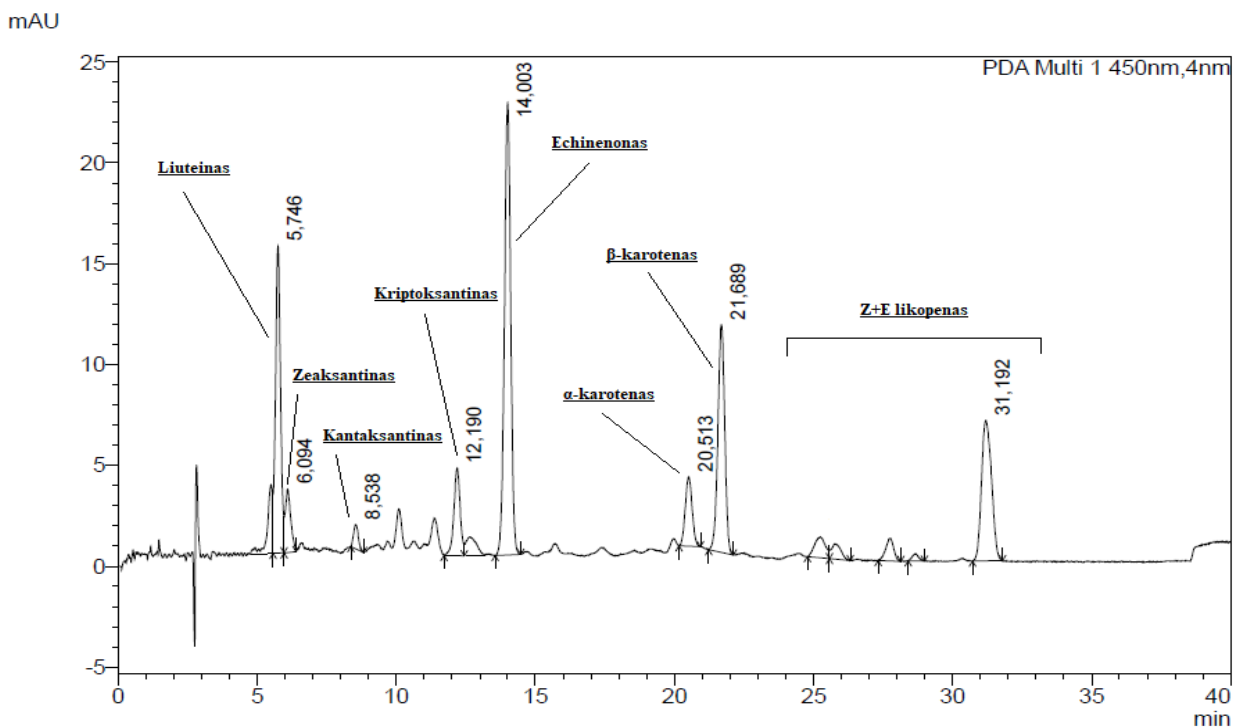
2.7. Chromatografinis karotenoidų išskyrimas ir nustatymas

Chromatografijos tyrimai atlikti naudojant efektyviosios chromatografijos sistemą (*Shimadzu Prominence*, Japonija). Pasirinkta C30 (250 mm x 4,6 mm; dalelių dydis 5 µm) ESCh kolonėlė ir apsaugine prieškolonėlė (C30, 20 mm x 4,6 mm). Kolonėlės temperatūra 23±1°C, injekuoto mėginio tūris – 30 µl. Naudota dvikomponentė judrioji fazė iš metanolio ir MTBE, kurios tėkmės greitis 1,3 ± 1 ml/min. Buvo pasirinkta gradientinė eliuacija, kurios parametrai nurodyti **2.2 lentelėje**. Vieno mėginio chromatografinės analizės laikas – 40 min.

Karotenoidų detekcijai naudotas UV ir regimojo spektro spindulių spektrofotometrinis detektorius, pasirinktas bangos ilgis – 450 nm, išskyrus likopeną, kuris detekuojamas ties 470 nm bangos ilgiu. **2.4 paveiksle** pateikiamas kraujo serumo karotenoidų chromatogramos pavyzdys.

2.2 lentelė. Dvikomponentės judriosios fazės sudėties kitimas ESCh tyrimo metu.

Laikas (min.)	MEOH (%)	MTBE (%)
0,01	90	10
35	51,1	48,9
38	90	10
40	90	10



2.4 pav. Kraujo serumo karotenoidų chromatogramos pavyzdys.

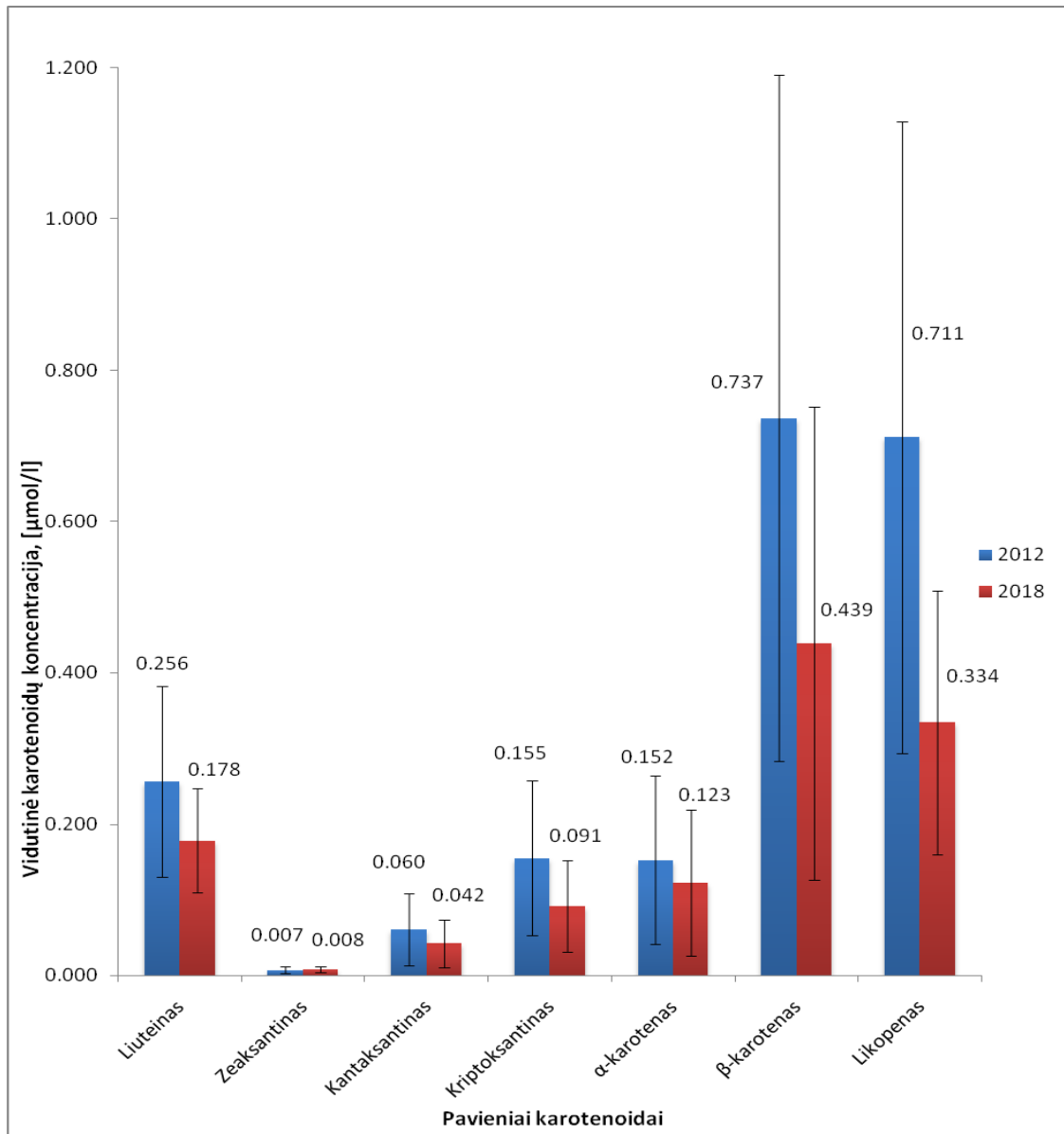
2.8. Statistinė analizė

Duomenų statistinė analizė atlikta Microsoft Office Excel 2007 ir R 3.5.0 statistinėmis programomis. Kiekybiniai duomenys aprašomi aritmetiniu vidurkiu, standartiniu nuokrypiu, mediana ir kvartilių skirtumu. Taip pat skirtumai tarp duomenų pateikti procentine išraiška. Duomenų pasiskirstymo pagal normalųjį dėsnį hipotezei patikrinti naudotas Šapiro-Vilko testas. Skirtumų reikšmingumui tarp duomenų grupių įvertinti taikytas parametrinis Stjudento t-kriterijus priklausomoms imtims. Jei duomenys neatitiko normaliojo skirstinio, skirtumams nustatyti naudotas neparametrinis kriterijus – Vilkoksono ženklų kriterijus. Rezultatai laikomi statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Ilgalaikio mėginių saugojimo įtaka kraujo serumo karotenoidų koncentracijai

2012 metais nustatytos dvidešimties pacientų kraujo serumo karotenoidų koncentracijos buvo pakartotinai išmatuotos 2018 metais. Kaip ir 2012 metais taip ir 2018 metais mažiausia koncentracija pacientų kraujo serumo mėginiuose nustatyta zeaksantino, o didžiausia β -karoteno (3.1 pav.).



3.1 pav. Vidutinės pavienių karotenoidų koncentracijos išmatuotos 2012 metais, ir po 6 metų.

Įvertinta kaip pakito karotenoidų koncentracija –80 °C temperatūroje 6 metus laikytuose kraujo serumo mėginiuose. Nustatyta, kad visų pavienių karotenoidų vidutinės koncentracijos sumažėjo, išskyrus zeaksantiną, kurio koncentracija padidėjo per 0,001 μmol/l. Tačiau zeaksantino teigiamas pokytis nustatytas kaip statistiškai nereikšmingas (p=0,2943). Visų kitų pavienių karotenoidų kaip liuteino, kantaksantino, kriptoksantino, α-karoteno, β-karoteno ir likopeno koncentracijų pokyčių reikšmės buvo statistiškai reikšmingai sumažėjusios (p <0,05) (**3.1 lentelė**).

Išreiškus karotenoidų koncentracijų pokyčius procentine išraiška (**3.1 lentelė**) pastebėta, kad likopeno pokytis didžiausias – per 6 metus sumažėjo perpus (53 proc.), kriptoksantino ir β- karoteno sumažėjo apie 40 proc., o kantaksantino ir liuteino vidutinė koncentracija sumažėjo trečdaliu (30 proc.). Vienintelio zeaksantino atveju buvo stebimas teigiamas koncentracijos pokytis (padidėjo 15 proc.).

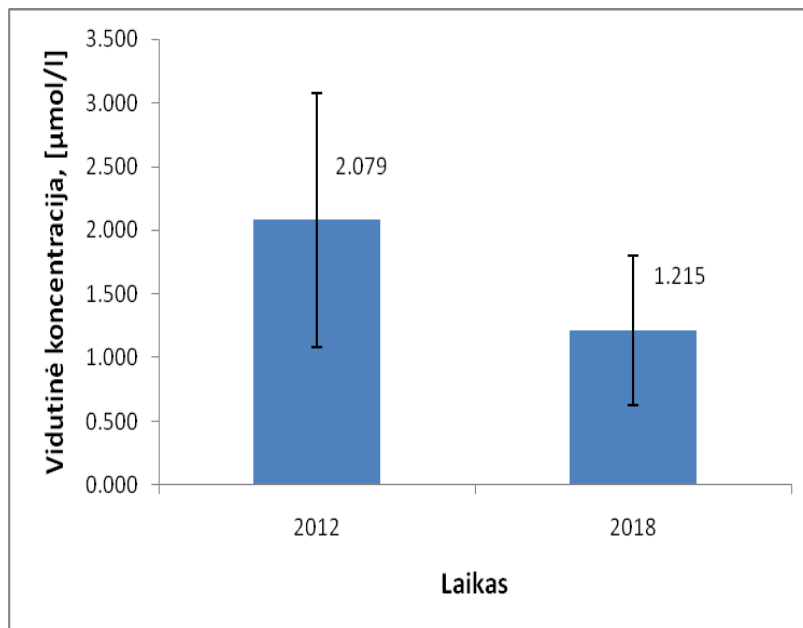
3.1 lentelė. Karotenoidų koncentracijų, matuotų 2012 ir 2018 metais, aprašomosios charakteristikos, procentinis pokytis ir p reikšmės.

	Karotenoidų koncentracija (μmol/l)				Pokytis (%)	p reikšmė
	Vidurkis ± SN		Mediana ± KS			
	2012 m.	2018 m.	2012 m.	2018 m.		
Liuteinas	0,256 ± 0,126	0,178 ± 0,069	0,251 ± 0,187	0,185 ± 0,093	-31	0,0005*
Zeaksantinas	0,007 ± 0,004	0,008 ± 0,004	0,007 ± 0,006	0,007 ± 0,006	+15	0,2943
Kantaksantinas	0,060 ± 0,047	0,042 ± 0,031	0,049 ± 0,036	0,035 ± 0,023	-30	0,0003*
Kriptoksantinas	0,155 ± 0,103	0,091 ± 0,061	0,131 ± 0,088	0,063 ± 0,067	-41	0,0002*
α-karotenas	0,152 ± 0,111	0,123 ± 0,097	0,128 ± 0,144	0,114 ± 0,084	-19	0,0032*
β-karotenas	0,737 ± 0,453	0,439 ± 0,313	0,722 ± 0,479	0,316 ± 0,307	-40	0,0000*
Likopenas	0,711 ± 0,418	0,334 ± 0,175	0,553 ± 0,394	0,304 ± 0,150	-53	0,0000*
Bendra koncentracija	2,079 ± 0,993	1,215 ± 0,590	1,917 ± 1,082	1,199 ± 0,496	-42	0,0000*

*– statistiškai reikšmingas skirtumas (p <0,05), SN – standartinis nuokrypis, KS – kvartilų skirtumas.

Tyrimo metu taip pat apskaičiuotos ir palygintos bendros karotenoidų koncentracijos 2012 ir 2018 metais (**3.2 pav.**). Kadangi daugumos pavienių karotenoidų koncentracijos buvo sumažėjusios,

tad ir bendra karotenoidų koncentracija per 6 metų trukmės laikotarpį taip pat sumažėjo. 42 procentų sumažėjimas buvo nustatytas kaip statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$).



3.2 pav. Bendra karotenoidų vidutinė koncentracija 2012 ir 2018 metais.

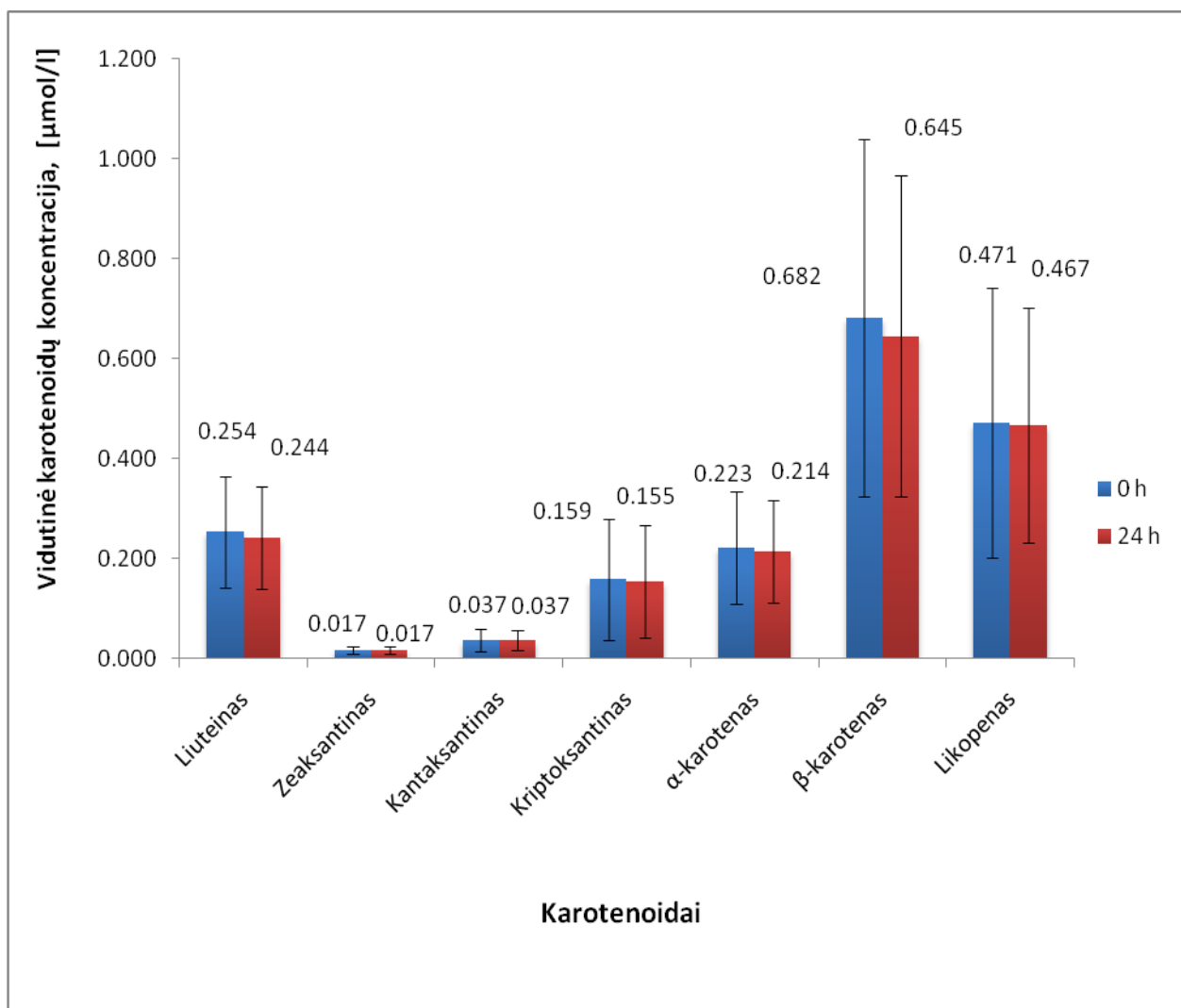
3.2. Kraujo serumo karotenoidų koncentracijos stabilumas po ekstrakcijos

Karotenoidai tampa ypač jautrūs įvairiems veiksniams po jų ekstrakcijos iš biologinių mėginių, o jų koncentracijos nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu gali užtrukti ar ne visada gali būti atliktas tą pačią dieną. Siekiant nustatyti ar mėginio laikymo laikas tam tikromis sąlygomis turi įtakos karotenoidų koncentracijoms, iš kraujo serumo išskirti karotenoidų mėginiai buvo laikomi kambario temperatūroje (22°C) ir tam tikrais laiko momentais nustatytos jų koncentracijos. Pirmiausia buvo nustatytos pradinės koncentracijos (0 h), kada mėginiai išanalizuoti iškart po išskyrimo, o vėliau koncentracijos vėl nustatytos po 24, 72 ir 168 valandų.

Iš pradžių, dėl riboto mėginio tūrio (250 µl) ir tirpiklio garavimo, buvo nustatyta 24 valandų trukmės įtaka karotenoidų koncentracijoms, o su kita mėginių grupe nustatytas 72 valandų ir 168 valandų išskirto mėginio laikymo trukmės poveikis karotenoidų koncentracijai.

3.2.1. 24 valandų trukmės iš kraujo serumo išskirtų mėginių laikymo poveikis karotenoidų koncentracijai

Po ekstrakcijos mėginiai buvo iškart išanalizuoti ESCh metodu ir apskaičiuotos pradinės karotenoidų koncentracijų vertės. Vėliau mėginiai laikyti ESCh sistemoje, 22 °C temperatūroje ir po 24 valandų pakartotinai išmatuotos jų karotenoidų koncentracijos. **3.3 paveiksle** pavaizduotos vidutinės pavienių karotenoidų koncentracijos nustatytos pradiniu laiku (0 h) ir po 24 valandų (24 h). Pastebėta, kad kai kurių pavienių karotenoidų koncentracijos, kaip liuteino, kriptoksantino, α ir β karotenų ir likopeno, koncentracijos sumažėja jau po 24 valandų, o zeaksantino ir kantaksantino vidutinės koncentracijos visiškai nesiskiria. Tačiau įvertinus skirtumų reikšmingumą, buvo nustatyta, kad visi skirtumai yra statistiškai nereikšmingi ($p > 0,05$) (**3.2 lentelė**).

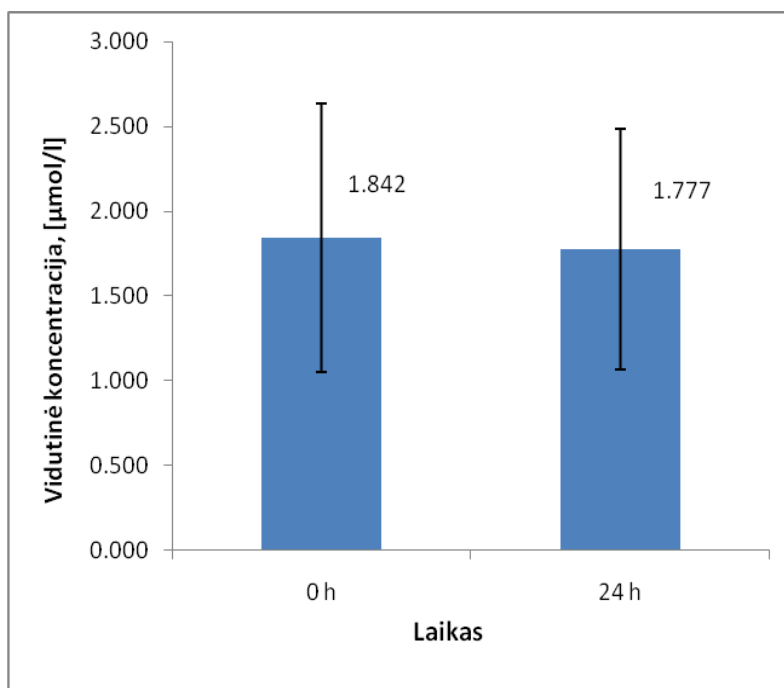


3.3 pav. Vidutinės pavienių karotenoidų koncentracijos iškart po ekstrakcijos (0 h) ir praėjus 24 valandoms (24 h).

3.2 lentelė. Karotenoidų koncentracijų, matuotų iškart po ekstrakcijos ir po 24 valandų, aprašomosios charakteristikos, procentinis pokytis ir p reikšmės.

	Karotenoidų koncentracija ($\mu\text{mol/l}$)				Pokytis (%)	p reikšmė
	Vidurkis \pm SN		Mediana \pm KS			
	0 h	24 h	0 h	24 h		
Liuteinas	0,254 \pm 0,111	0,241 \pm 0,102	0,209 \pm 0,136	0,195 \pm 0,124	-5	0,0984
Zeaksantinas	0,017 \pm 0,007	0,017 \pm 0,007	0,014 \pm 0,007	0,015 \pm 0,008	-2	0,5958
Kantaksantinas	0,037 \pm 0,022	0,037 \pm 0,020	0,031 \pm 0,024	0,029 \pm 0,019	0	0,7841
Kriptoksantinas	0,159 \pm 0,122	0,155 \pm 0,112	0,111 \pm 0,165	0,120 \pm 0,172	-2	0,0637
α-karotenas	0,223 \pm 0,112	0,214 \pm 0,102	0,234 \pm 0,209	0,233 \pm 0,193	-4	0,6048
β-karotenas	0,682 \pm 0,358	0,645 \pm 0,322	0,698 \pm 0,622	0,650 \pm 0,500	-5	0,3625
Likopenas	0,471 \pm 0,270	0,467 \pm 0,235	0,406 \pm 0,302	0,387 \pm 0,269	-1	0,8695
Bendra koncentracija	1,842 \pm 0,793	1,77 \pm 0,711	1,865 \pm 1,298	1,855 \pm 1,123	-4	0,2990

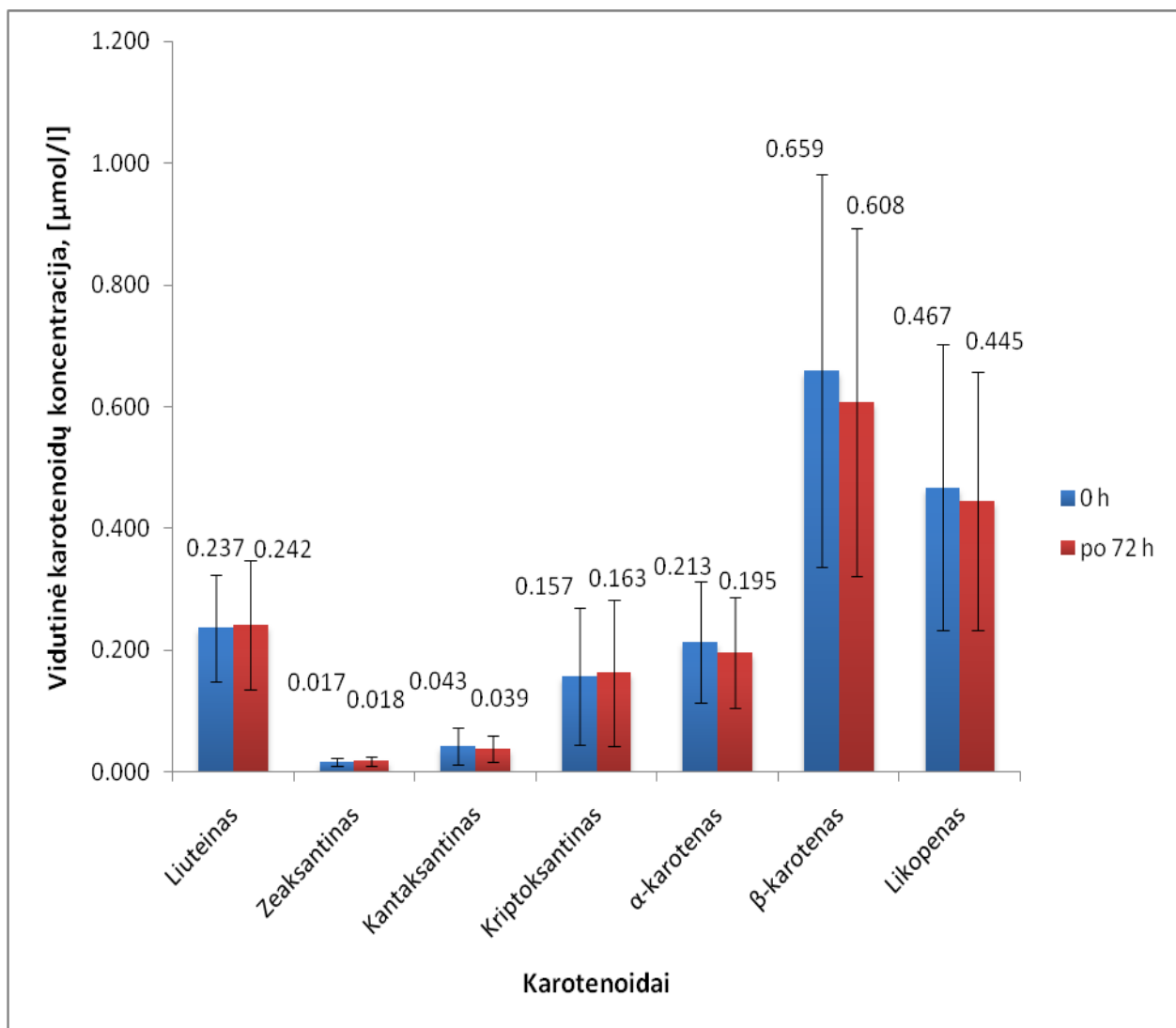
SN – standartinis nuokrypis, KS – kvartilų skirtumas.



3.4 pav. Bendra karotenoidų koncentracija iškart po ekstrakcijos (0 h) ir po 24 valandų išskirto mėginio laikymo 22 °C temperatūroje (24 h).

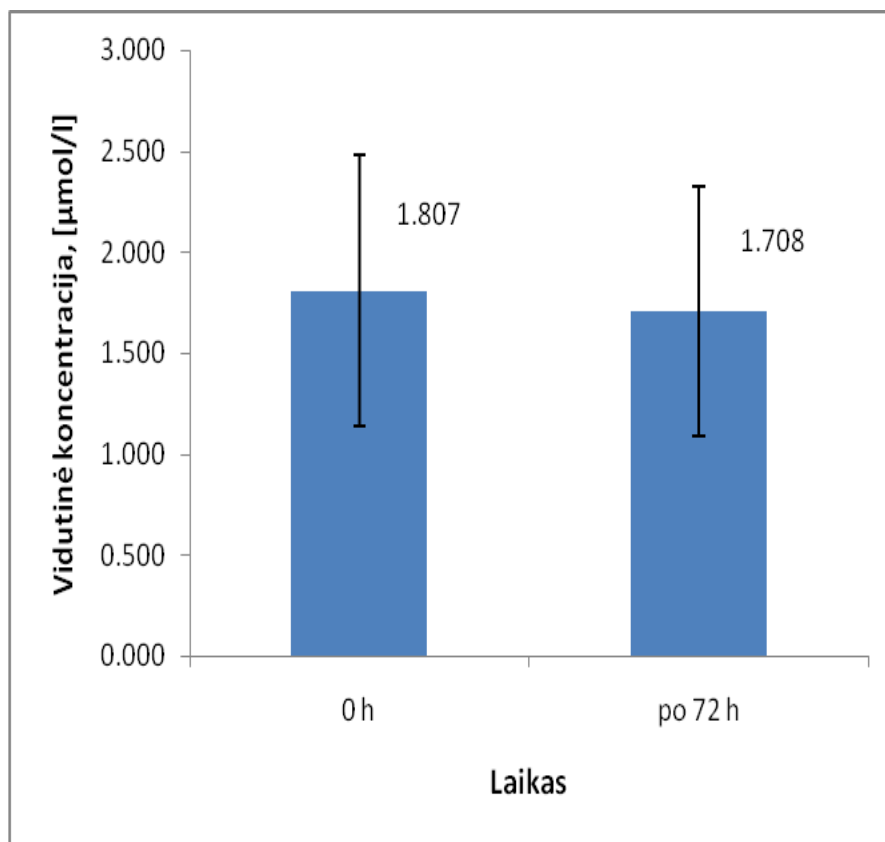
Taip pat apskaičiuota bendra karotenoidų koncentracija ir palygintas vidutinis koncentracijos pokytis po 24 valandų (**3.4 pav.**). Kaip ir pavienių karotenoidų, taip ir bendra karotenoidų koncentracija po 24 valandų išskirto mėginio laikymo statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo pradžioje išmatuotos koncentracijos (**3.2 lentelė**).

3.2.2. 72 valandų iš kraujo serumo išskirtų mėginių laikymo poveikis karotenoidų koncentracijai



3.5 pav. Vidutinės pavienių karotenoidų koncentracijos iškart po ekstrakcijos (0 h) ir po 72 valandų išskirto mėginio laikymo 22 °C temperatūroje.

Iškart po ekstrakcijos nustatytos pradinės karotenoidų koncentracijų vertės ir mėginiai palikti ESCh sistemoje, 22°C temperatūroje. Po 72 valandų vėl nustatytos tų pačių mėginių karotenoidų koncentracijos. **3.6 paveiksle** pavaizduotas bendros karotenoidų vidutinės koncentracijos pokytis po 72 valandų, o vidutinės pavienių karotenoidų koncentracijos pradžioje ir po 72 valandų trukmės laikymo pavaizduotos **3.5 paveiksle**. Matoma, kad kai kurių karotenoidų koncentracijos sumažėja, o kai kurių padidėja. Liuteino, zeaksantino ir kriptoksantino koncentracijos padidėja, o α ir β karoteno, kantaksantino bei likopeno koncentracijos sumažėja. Statistiškai reikšmingas pokytis nustatytas tik α -karoteno atveju ($p < 0,05$). Jo koncentracija po 72 valandų trukmės išskirto mėginio laikymo sumažėja 9 proc. Visų kitų pavienių karotenoidų ir bendros karotenoidų koncentracijos pokyčiai lyginant pradines koncentracijas ir po 72 valandų buvo statistiškai nereikšmingos (**3.3 lentelė**).



3.6 pav. Bendra karotenoidų koncentracija iškart po ekstrakcijos (0 h) ir po 72 valandų išskirto mėginio laikymo 22 °C temperatūroje.

3.3 lentelė. Karotenoidų koncentracijų, matuotų iškart po ekstrakcijos ir 72 valandų, aprašomosios charakteristikos, procentinis pokytis ir p reikšmės.

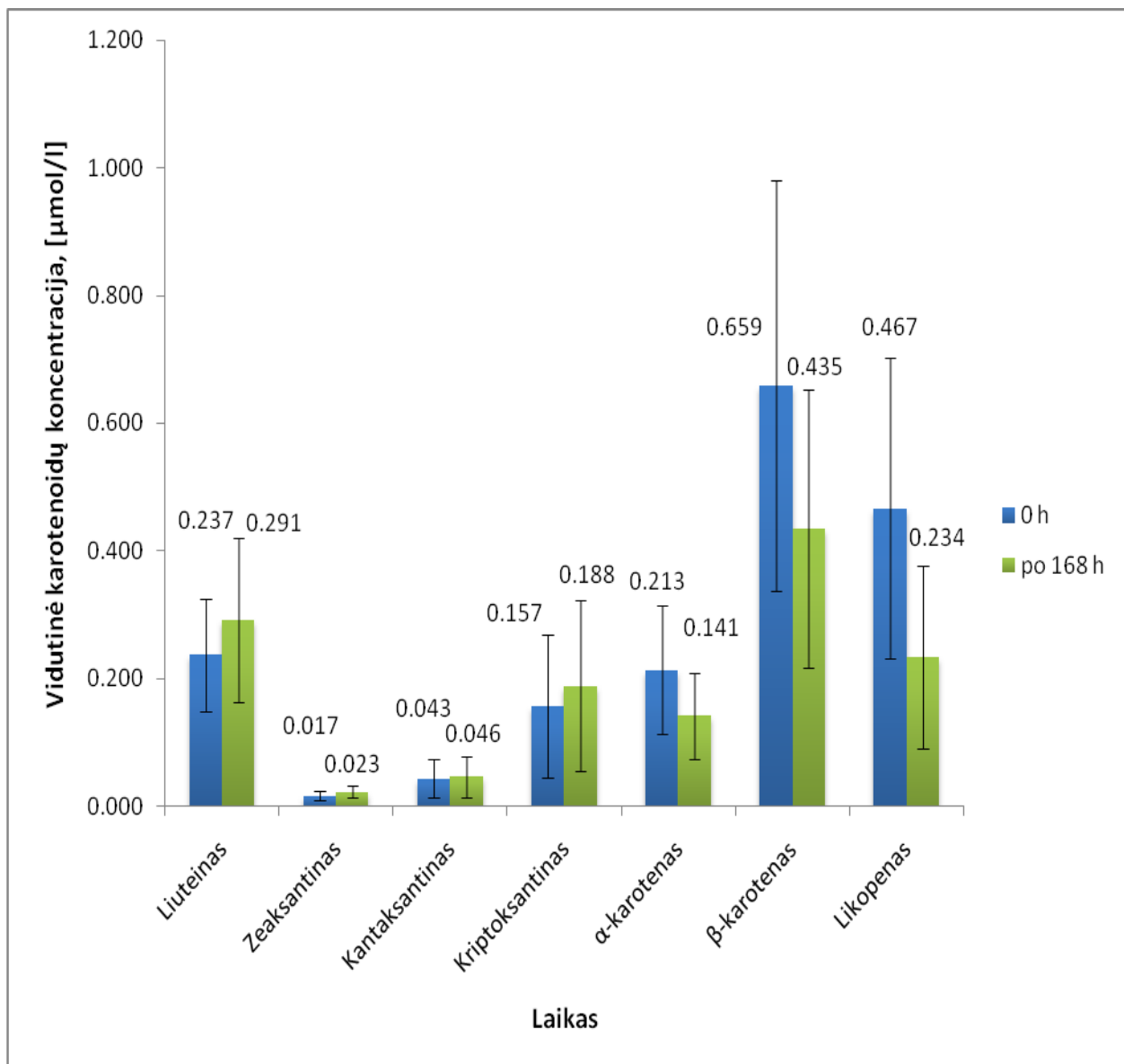
	Karotenoidų koncentracija (µmol/l)				Pokytis (%)	p reikšmė
	Vidurkis ± SN		Mediana ± KS			
	0 h	72 h	0 h	72 h		
Liuteinas	0,237 ± 0,088	0,242 ± 0,106	0,233 ± 0,119	0,207 ± 0,141	+2	0,4091
Zeaksantinas	0,017 ± 0,006	0,018 ± 0,007	0,016 ± 0,007	0,016 ± 0,009	+7	0,1055
Kantaksantinas	0,043 ± 0,030	0,039 ± 0,022	0,032 ± 0,034	0,031 ± 0,026	-9	0,9854
Kriptoksantinas	0,157 ± 0,112	0,163 ± 0,121	0,128 ± 0,156	0,121 ± 0,153	+4	0,2024
α-karotenas	0,213 ± 0,100	0,195 ± 0,091	0,217 ± 0,119	0,203 ± 0,151	-9	0,0244*
β-karotenas	0,659 ± 0,322	0,608 ± 0,286	0,690 ± 0,385	0,610 ± 0,424	-8	0,0677
Likopenas	0,467 ± 0,235	0,445 ± 0,212	0,379 ± 0,370	0,408 ± 0,318	-5	0,0826
Bendra koncentracija	1,792 ± 0,671	1,708 ± 0,620	1,889 ± 0,920	1,705 ± 0,765	-5	0,1116

*– statistiškai reikšmingas skirtumas (p < 0,05), SN – standartinis nuokrypis, KS – kvartilų skirtumas.

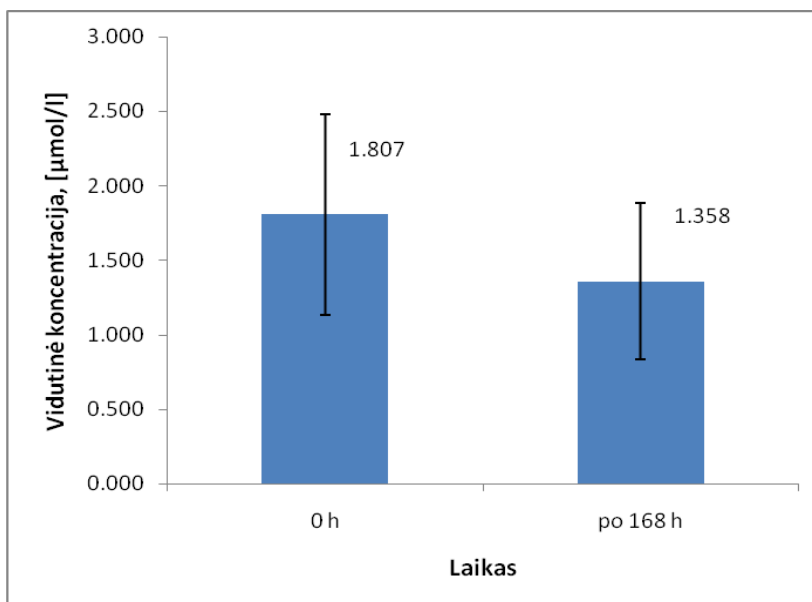
3.2.3. 168 valandų iš kraujo serumo išskirtų mėginių laikymo poveikis karotenoidų koncentracijai

Tie patys iš kraujo serumo išskirti karotenoidų mėginiai, kurie buvo išmatuoti po 72 valandų trukmės laikymo, buvo toliau palikti ESCh sistemoje, 22 °C temperatūroje, ir vėl išmatuotos jų koncentracijos praėjus 168 valandoms (savaitė). **3.7 paveiksle** pavaizduotos vidutinės pavienių karotenoidų koncentracijos nustatytos tyrimo pradžioje ir po 168 valandų. Kaip ir 72 valandų atveju, taip ir po 168 valandų stebimas tų pačių pavienių karotenoidų koncentracijos mažėjimas (α ir β karoteno, likopeno) ar didėjimas (liuteino, zeaksantino, kriptoksantino). Bendra karotenoidų koncentracija išskirtuose mėginiuose taip pat sumažėja kaip ir kai kurių pavienių karotenoidų koncentracijos (**3.8 pav.**). Išskirtus karotenoidų mėginius laikant savaitę 22°C temperatūroje stebimi didesni procentiniai pokyčiai. Labiausiai šiuo atveju sumažėja likopeno koncentracija – palyginus su

pradinė koncentracija vertė sumažėja perpus (50 proc.). Mažiausias procentinis pokytis po savaitės stebimas kantaksantino koncentracijos atveju (padidėja 7 proc.). Likusiųjų pavienių karotenoidų, kaip ir bendros karotenoidų koncentracijos pokyčiai svyruoja apie 20-30 proc. Įvertinus pokyčių statistinį reikšmingumą, nustatyta, kad po ekstrakcijos mėginius laikant savaitę 22 °C temperatūroje, visų pavienių karotenoidų ir bendra karotenoidų koncentracija skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) (3.4 lentelė).



3.7 pav. Vidutinės pavienių karotenoidų koncentracijos iškart po ekstrakcijos (0 h) ir praėjus 168 valandoms po išskirto mėginio laikymo 22 °C temperatūroje.



3.8 pav. Bendra karotenoidų koncentracija iškart po ekstrakcijos (0 h) ir po 168 valandų.

3.4 lentelė. Karotenoidų koncentracijų, matuotų iškart po ekstrakcijos, 72 valandų ir 168 valandų aprašomosios charakteristikos, procentinis pokytis ir p reikšmės.

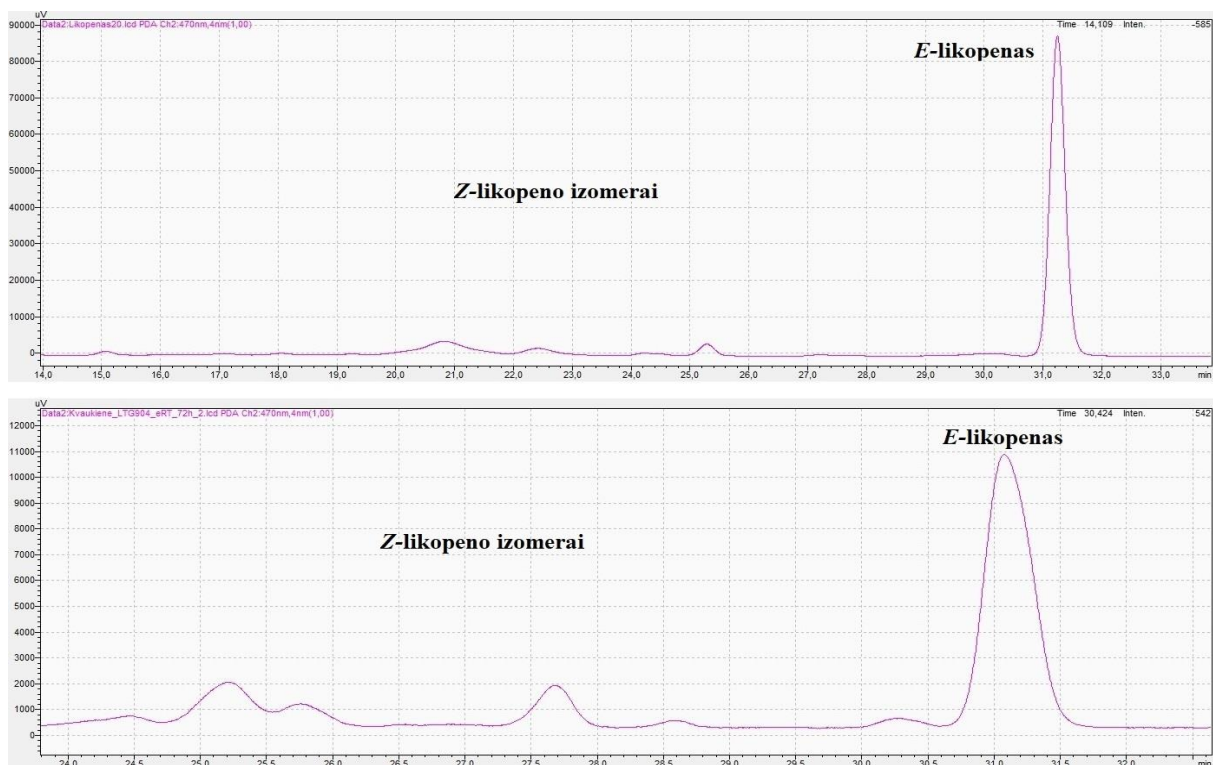
	Karotenoidų koncentracija (µmol/l)				Pokytis (%)	p reikšmė
	Vidurkis ± SN		Mediana ± KS			
	0 h	168 h	0 h	168 h		
Liuteinas	0,237 ± 0,088	0,291 ± 0,129	0,233 ± 0,119	0,265 ± 0,174	+23	0,0003*
Zeaksantinas	0,017 ± 0,006	0,023 ± 0,009	0,016 ± 0,007	0,021 ± 0,013	+23	0,0000*
Kantaksantinas	0,043 ± 0,030	0,046 ± 0,032	0,032 ± 0,034	0,034 ± 0,025	+7	0,0192*
Kriptoksantinas	0,157 ± 0,112	0,188 ± 0,133	0,128 ± 0,156	0,162 ± 0,172	+20	0,0000*
α-karotenas	0,213 ± 0,100	0,141 ± 0,068	0,217 ± 0,119	0,147 ± 0,098	-34	0,0000*
β-karotenas	0,659 ± 0,322	0,435 ± 0,219	0,690 ± 0,385	0,421 ± 0,342	-34	0,0000*
Likopenas	0,467 ± 0,235	0,234 ± 0,143	0,379 ± 0,370	0,214 ± 0,110	-50	0,0000*
Bendra koncentracija	1,792 ± 0,671	1,358 ± 0,524	1,889 ± 0,920	1,376 ± 0,702	-24	0,0000*

*– statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$), SN – standartinis nuokrypis, KS – kvartilų skirtumas.

3.3. *E*-likopeno ir *Z*-likopeno izomerų pokyčiai iš kraujo serumo išskirtuose ir 24, 72 ir 168 valandas laikytuose mėginiuose

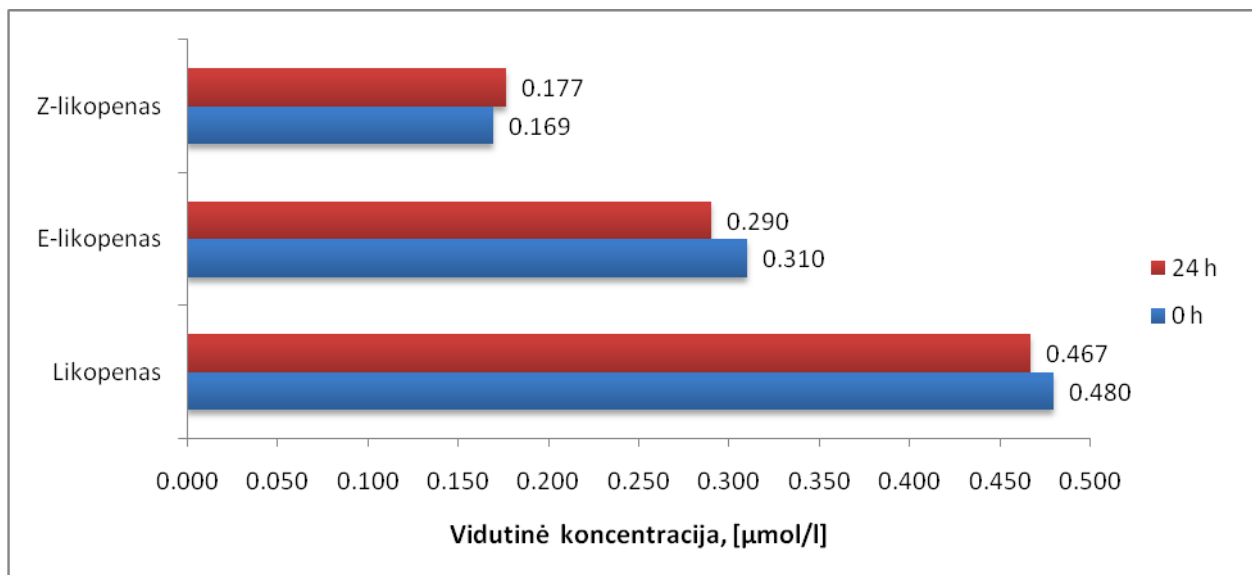
Yra žinoma, jog likopenas tampa jautrus veikiant įvairiems išoriniams aplinkos veiksniams ir yra ypač linkęs izomerizuotis. Manoma, kad mažėjant *E*-likopeno, *Z*-likopenas yra linkęs didėti [56]. Kadangi mūsų tyrimo metu likopenas nustatytas kaip pats jautriausias karotenoidas, buvo analizuojami *E*-likopeno ir *Z*-likopeno koncentracijos pokyčiai laiko atžvilgiu.

3.9 paveiksle pateikiamos likopeno standartinės medžiagos ir vieno iš tiriamųjų kraujo serumo karotenoidų mėginio chromatogramos, kuriose išskiriamas *E*-likopeno pikas ir *Z*-likopeno pikai. Tyrime pateikiama bendra *Z*-likopeno izomerų koncentracija, neįvardijant tikslių izomerų (5-*Z*, 9-*Z*, 13-*Z*, 15-*Z* ir kt.).



3.9 pav. *E*-likopeno ir *Z*-likopeno izomerų chromatogramų pavyzdžiai. Viršuje likopeno standartinės medžiagos (skiedimas 1:10) chromatograma, apačioje iš paciento kraujo serumo išskirto likopeno chromatograma.

3.10 paveiksle pavaizduota kaip keičiasi bendro likopeno, *E*-likopeno ir *Z*-likopeno vidutinės koncentracijos, po ekstrakcijos mėginius laikant 24 valandas. Pastebėta, kad po 24 valandų likopeno ir *E*-likopeno koncentracija sumažėja o *Z*-likopeno izomerų padidėja.



3.10 pav. Bendro likopeno, *E*-likopeno ir *Z*-likopeno pokyčiai po 24 valandų trukmės išskirto mėginio laikymo.

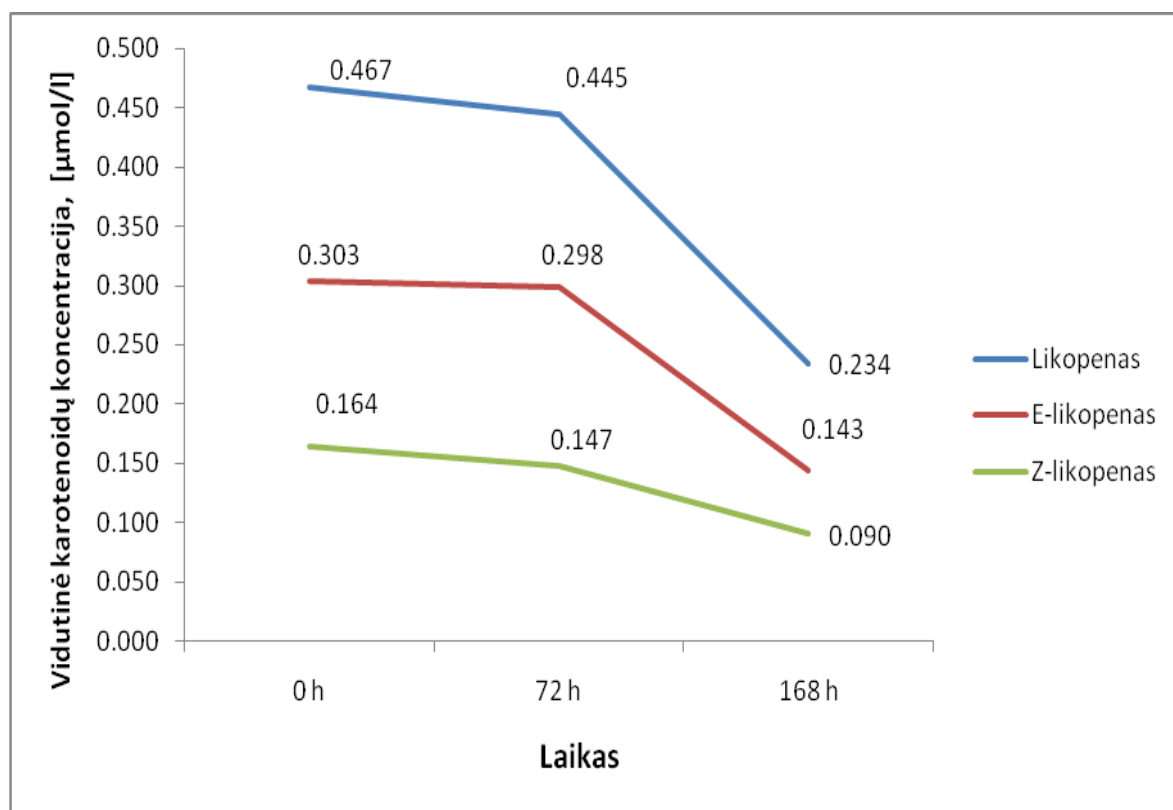
Pokyčius išreiškus procentais ir statistiškai patikrinus jų reikšmingumą, nustatyta, kad *E*-likopeno sumažėjimas yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$), kai tuo tarpu *Z*-likopeno padidėjimas visgi laikomas statistiškai nereikšmingu ($p=0,2943$) (**3.5 lentelė**).

3.5 lentelė. *E*-likopeno ir *Z*-likopeno koncentracijų, matuotų iškart po ekstrakcijos ir 24 valandų aprašomosios charakteristikos, procentinis pokytis ir p reikšmės.

	Karotenoidų koncentracija ($\mu\text{mol/l}$)				Pokytis (%)	p reikšmė
	Vidurkis \pm SN		Mediana \pm KS			
	0 h	24 h	0 h	24 h		
<i>E</i>-likopenas	0,310 \pm 0,188	0,290 \pm 0,168	0,270 \pm 0,162	0,254 \pm 0,159	-6	0,0001*
<i>Z</i>-likopenas	0,169 \pm 0,082	0,177 \pm 0,071	0,158 \pm 0,095	0,155 \pm 0,103	+4	0,2943

*– statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$), SN – standartinis nuokrypis, KS – kvartilų skirtumas.

Nagrinėjant rezultatus mėginių, kurie buvo laikomi 72 valandas ir 168 valandas, nebuvo pastebėta, kad mažėjant likopeno koncentracijai, *Z*-izomerų sparčiai didėtų (**3.11 pav.**). Priešingai, *Z*-likopeno izomerų koncentracija sumažėjo tiek po 72 valandų (10 proc.), tiek po 168 valandų (45 proc.).



3.11 pav. Bendro likopeno, *E*-likopeno ir *Z*-likopeno pokyčiai po 72 ir po 168 valandų trukmės išskirto mėginio laikymo.

Tačiau reiktų paminėti, kad bendra likopeno koncentracija ir *E*-likopeno koncentracija linkusi mažėti panašiu greičiu. Tuo tarpu *Z*-likopeno koncentracija po 72 valandų sumažėja greičiau nei *E*-likopeno, tačiau po 168 valandų *Z*-likopeno sumažėja 45 proc. lyginant su *E*-likopeno 54 proc. Sumažėjusi koncentracija po 72 valandų nustatyta kaip statistiškai nereikšmingas pokytis, tuo tarpu koncentracijos sumažėjimas po 168 valandų yra statistiškai reikšmingas tiek *E*-likopeno, tiek *Z*-likopeno atveju (**3.6 lentelė**).

3.6 lentelė. E-likopeno ir Z-likopeno koncentracijų, matuotų iškart po ekstrakcijos, 72 valandų ir 168 valandų aprašomosios charakteristikos, procentinis pokytis ir p reikšmės.

	Karotenoidų koncentracija (µmol/l)						Pokytis (%)		p reikšmė	
	Vidurkis ± SN			Mediana ± KS			72 h	168 h	72 h	168 h
	0 h	72 h	168 h	0 h	72 h	168 h				
E-likopenas	0,303 ± 0,170	0,298 ± 0,176	0,143 ± 0,100	0,241 ± 0,269	0,268 ± 0,278	0,139 ± 0,092	-2	-54	0,68 62	0,0000 *
Z-likopenas	0,164 ± 0,087	0,147 ± 0,055	0,090 ± 0,047	0,149 ± 0,071	0,135 ± 0,056	0,078 ± 0,048	-10	-45	0,05 32	0,0000 *

*– statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$), SN – standartinis nuokrypis, KS – kvartilų skirtumas.

3.4. Rezultatų aptarimas

Vertinant karotenoidų stabilumą kraujo serumo mėginiuose, laikytuose $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 6 metus, pastebėta, kad tiek pavienių, tiek bendra karotenoidų koncentracija pakinta reikšmingai ($p < 0,05$): liuteino sumažėja 31 proc., kantaksantino 30 proc., kriptoksantino 41 proc., α -karoteno 19 proc., β -karoteno 40 proc., bendra koncentracija 42 proc. Stabiliausias šiuo atveju buvo zeaksantinas, kurio koncentracija pakilo 15 proc. (nuo $0,007 \pm 0,004$ iki $0,008 \pm 0,004$ µmol/l). Tai vienintelis karotenoidas, kurio koncentracija šio tyrimo metu padidėjo ir pokytis buvo nustatytas kaip statistiškai nereikšmingas ($p = 0,2943$). Tačiau, tokia išimtis kaip manoma galėjo įvykti dėl itin mažos zeaksantino koncentracijos ir tyrimų metu, 2012 ir 2018 metais, naudotų skirtingų kalibracinių kreivių. Analizuojant duomenis nustatyta, kad likopeno koncentracija pasikeitė labiausiai – sumažėjo 53 proc. (nuo $0,711 \pm 0,418$ iki $0,334 \pm 0,175$ µmol/l). Mokslinių straipsnių duomenimis ilgalaikiam stabilumui užtikrinti rekomenduojama $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ir žemesnė temperatūra, tačiau dėl mėginių laikymo trukmės mokslinių tyrimų rezultatai yra priešaringi. Pagal Su ir kt. [24], mėginius laikant $-77\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje karotenoidų koncentracijos stabilios išlieka tik iki 4 metų, nors Tworoger ir Hankinson [15] teigia, jog laikant mėginius $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje karotenoidų stabilumas mėginyje gali išsilaikyti iki 10 metų.

Dauguma mokslinių tyrimų nagrinėja karotenoidų stabilumą iki mėginio ekstrakcijos – kaip karotenoidų koncentraciją veikia įvairūs veiksniai jiems dar esant kraujyje, kraujo plazmoje ar serume. Tokių tyrimų, kurie analizuotų kaip keičiasi mėginio stabilumas po ekstrakcijos nėra daug, tik yra žinoma, jog išskyrimo metu karotenoidai tampa ypač jautrūs šilumai, šviesai, deguoniui ir

rūgštims [59]. Mūsų tyrimo metu buvo nustatyta kaip keičiasi iš kraujo serumo išskirtų karotenoidų koncentracijos laiko atžvilgiu, mėginius laikant kambario temperatūroje (22 °C). Tiriant 24 valandų trukmės laikymo poveikį, tyrimas patvirtino prieš tai atliktų mokslinių tyrimų rezultatus, kad išskirti karotenoidai 24 valandas išlieka visiškai stabilūs nepriklausomai nuo temperatūros. Tyrimo metu gauti karotenoidų vidutinių koncentracijų skirtumai buvo nustatyti kaip statistiškai nereikšmingi ($p > 0,05$).

Po 72 valandų trukmės laikymo buvo pastebėta, jog dauguma pavienių karotenoidų ir bendra karotenoidų koncentracija išlieka stabilios, išskyrus α -karoteną, kurio koncentracija po 72 valandų statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėja 9 proc. Kitų mokslininkų tyrimuose randami panašūs rezultatai – Karppi ir kt. [14] atlikto tyrimo metu α -karoteno koncentracija sumažėjo 11 proc. jau po 2 dienų laikant išskirtus mėginius 4 °C temperatūroje.

Vertinant savaitės laikymo trukmės rezultatus galima teigti, jog tiek pavienių karotenoidų, tiek bendros karotenoidų koncentracijos pokyčiai yra statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) ir tokių mėginių vertinimas jau nėra tinkamas. Tokių pavienių karotenoidų kaip liuteino, zeaksantino, kantaksantino ir kriptokantino koncentracijų laipsnišką didėjimą galime sieti su mėginio tirpiklio garavimu, kadangi laikymo metu mėginiai nebuvo saugomi nuo garavimo, todėl galėjo koncentruotis. Tačiau tokių pavienių karotenoidų kaip likopeno, α ir β karotenų koncentracijos buvo linkusios mažėti, taigi ir mėginiui koncentruojantis, šių karotenoidų degradacija yra pakankamai greita. Aiškiai išsiskyrė ir vienu jautriausiu karotenoidu tyrimo metu nustatytas likopenas, kurio koncentracija po 168 valandų sumažėjo 50 proc. Lyginant su kitų mokslininkų pateiktomis išvadomis, rezultatai yra gana panašūs. Vieno tyrimo metu nustatyta, kad išskirtus mėginius savaitę laikant 4 °C temperatūroje, likopeno ir α -karoteno koncentracijos sumažėja daugiau nei 20 proc. [14]. Tačiau pateikiami ir tokie tyrimo rezultatai, kurių metu išskirtus mėginius laikant 4 °C ir –20 °C temperatūroje, koncentracijų skirtumai nustatyti statistiškai reikšmingais, o laikant mėginius kambario temperatūroje, rezultatų kintamumas buvo mažesnis [24].

Tyrimų metu nustatyta, kad iš visų tirtų pavienių karotenoidų, likopenas yra vienas jautriausių ir jo koncentracija yra linkusi mažėti daugiausiai. Tai patvirtinantys rezultatai buvo gauti tiriant tiek 6 metų kraujo serumo karotenoidų koncentracijas, tiek išskirtų karotenoidų mėginius laikant tam tikrą laiką. Kai kuriuose moksliniuose straipsniuose teigiama, kad likopeno jautrumas priklauso nuo jo polinkio izomerizuotis ir mažėjant *E*-likopeno koncentracijai, *Z*-likopeno izomerų daugėja [24, 56]. Todėl šiame tyrime buvo bandyta ieškoti sąsajų tarp likopeno koncentracijos mažėjimo ir *Z*-likopeno izomerų koncentracijos. Buvo pastebėta, kad po 24 valandų laikymo *E*-likopeno koncentracija sumažėja, o *Z*-likopeno izomerų padidėja, tačiau labai nežymiai

(4 proc., $p=0,2943$). Tuo tarpu 72 valandų ir 168 valandų laikymo atveju pokyčius įvertinti tiksliai yra gana sunku, kadangi tiek *E*-likopeno, tiek *Z*-likopeno per savaitę laiko gana stipriai sumažėja. Tokie rezultatai iš dalies patvirtina Murakami ir kt. [49] pateiktas išvadas, kad *E*-likopeno ir *Z*-likopeno stabilumas yra pakankamai panašus. Tačiau verta paminėti, jog po savaitės laikymo laiko palyginus likopeno rezultatus, pastebėta, kad *E*-likopenas sumažėja labiau (54 proc.), negu *Z*-likopenas (45 proc.). Visgi siekiant patvirtinti *E*-likopeno ir *Z*-likopeno sąsajas, reikėtų tiksliau iširti konkrečius *Z*-likopeno izomerus ir jų koncentracijų pokyčius.

Apibendrinant gautus tyrimų rezultatus, galima teigti, jog iš kraujo serumo išskirtų karotenoidų mėginiai gali būti laikomi 22 °C temperatūroje, 24 valandas, be jokių statistiškai reikšmingų koncentracijos pokyčių tiek bendros, tiek pavienių karotenoidų koncentracijos atžvilgiu.

IŠVADOS

1. Kraujo serumo mėginių, skirtų karotenoidų koncentracijai tirti, saugojimas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 6 metus sumažina karotenoidų koncentracijas statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$): liuteino 31 proc., kantaksantino 30 proc., kriptoksantino 41 proc., α -karoteno 19 proc., β -karoteno 40 proc., likopeno 53 proc., bendra karotenoidų koncentracija 42 proc.
2. Iš kraujo serumo išskirti karotenoidai, $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, išlieka stabilūs iki 3 parų, išskyrus α -karoteną, kurio koncentracija sumažėja 9 proc. ($p < 0,05$). Po 168 valandų mėginių laikymo trukmės, nustatyta, kad tiek pavienių karotenoidų, tiek bendra karotenoidų koncentracija statistiškai reikšmingai pakito lyginant su pradinėmis koncentracijomis.
3. *Z*-likopeno izomerų vidutinės koncentracijos kitimas laike yra panašus kaip *E*-likopeno. Tyrimo metu nepastebėta, kad mažėjant *E*-likopeno koncentracijai, *Z*-likopeno koncentracija būtų linkusi didėti.

SUMMARY

Effects of sample preparation and storage conditions on serum carotenoid concentrations

The aim of the study: To evaluate the effects of sample preparation and storage conditions on serum carotenoid concentrations.

Objectives: To determine changes of carotenoid concentrations in serum samples that were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. To determine changes of carotenoid concentrations, extracted from serum sample, considering the time taken before the analysis. To evaluate concentration changes of lycopene isomers from extracted serum samples after 24, 72 and 168 hours.

Methods: 60 serum samples of different patients were used in this research. 20 of the samples were involved in a long term investigation, where carotenoid concentrations were determined and compared in 2012 and in 2018. 40 patients serum samples were used in carotenoid stability analysis, where extracted serum samples were stored at $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24, 72 and 168 hours. Concentration of carotenoids was measured using a high performance liquid chromatography (HPLC) method. Microsoft Office Excel 2007 and R 3.5.0 programs were used for the statistical analysis.

Results and conclusions: Carotenoid concentrations decreased significantly ($p < 0,05$) when serum samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for six years: lutein by 31 %, canthaxanthin by 30 %, cryptoxanthin by 41 %, α -carotene by 19 %, β -carotene by 40 %, lycopene by 53 % and the total carotenoid concentration by 42 %. It was found that carotenoids extracted from serum samples were stable at 22°C for up to 72 hours, except α -carotene, which concentration decreased significantly ($p < 0,05$). After 168 hours initial concentration of all carotenoids was changed significantly. It was also determined that concentration of *Z*-lycopene isomer changes are similar to *E*-lycopene's and it was not detected that decreasing of *E*-lycopene's concentration is related to increasing of *Z*-lycopene isomers concentration.

Key words: carotenoids, stability, HPLC.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Wolak T, Paran E. Can carotenoids attenuate vascular aging?. *Vascul Pharmacol.* 2013; 59(3-4):63-6.
2. Silva MM, Nora L, Fernando Flores Cantillano R, Paese K, Stanisçuaski Guterres S, Pohlmann M, Haas Costa T, Rios A. The Production, Characterization, and the Stability of Carotenoids Loaded in Lipid-Core Nanocapsules. *Food and Bioprocess Technology* 2016; 9. 10.1007/s11947-016-1704-3.
3. Oddoze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin Biochem.* 2012; 45(6):464-9.
4. Clark S, Youngman LD, Chukwurah B, Palmer A, Parish S, Peto R, Collins R. Effect of temperature and light on the stability of fat-soluble vitamins in whole blood over several days: implications for epidemiological studies. *Int J Epidemiol.* 2004; 33(3):518-25.
5. Wang Y, Chung SJ, McCullough ML, Song WO, Fernandez ML, Koo SI, Chun OK. Dietary carotenoids are associated with cardiovascular disease risk biomarkers mediated by serum carotenoid concentrations. *Journal of Nutrition* 2014; 144(7), 1067-1074.
6. Eldahshan OA, Singab ANB. Carotenoids. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2013; 225.
7. Qian C, Decker EA, Xiao H, McClemens DJ. Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chemistry* 2011; 132 (2012) 1221–1229.
8. Hamułka J, Wawrzyniak A, Sulich A. The assessment of beta-carotene, lycopene and lutein intake selected group of adults. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2012; 63(2):179-85.
9. Hannoufa A, Hossain Z. Regulation of carotenoid accumulation in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2012; 1. 198–202.
10. Mezzomo N, Ferreira S. Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. *Journal of Chemistry* 2016; 3164312, 16.
11. Jomova K, Valko M. ChemInform Abstract: Health Protective Effects of Carotenoids and Their Interactions with Other Biological Antioxidants. *European journal of medicinal chemistry* 2013; 70C. 102-110.

12. Giasson J, Hernandez M, Chen Y. Stability of Serum Carotene at Various Light and Temperature Conditions. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2011; 135. 1529-30.
13. Tzeng MS, Wang GS, Yang FL, And H, Chen BH. Determination of Major Carotenoids in Human Serum by Liquid Chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis* 2004; 12.
14. Karppi J, Kurl S, Ronkainen K, Kauhanen J, Laukkanen JA. Serum Carotenoids Reduce Progression of Early Atherosclerosis in the Carotid Artery Wall among Eastern Finnish Men. *PLoS ONE* 2013; 8(5): e64107.
15. Tworoger SS, Hankinson SE. Collection, Processing, and Storage of Biological Samples in Epidemiologic Studies: Sex Hormones, Carotenoids, Inflammatory Markers, and Proteomics as Examples. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2006; (15) (9) 1578-1581.
16. Cuerq C, Peretti N, Chikh K, Mialon A, Guillaumont M, Drai J, Blond E. ANNALS EXPRESS: Overview of the in vitro stability of commonly measured vitamins and carotenoids in whole blood. *Annals of clinical biochemistry* 2014; 52 (2).
17. Uhl K. Understanding Variables that Impact Plasma Carotenoid Stability during Storage for High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis. 2017.
18. Mendes-Pinto MM, Sansiaume E, Hashimoto H, Pascal AA, Gall A, Robert B. Electronic absorption and ground state structure of carotenoid molecules. *J Phys Chem B*. 2013; 117(38):11015-21.
19. Fiedor J, Burda K. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients* 2014; 6(2):466-88.
20. Zhu CH, Gertz E, Cai Y, Burri B. Consumption of canned citrus fruit meals increases human plasma beta-cryptoxanthin concentration whereas lycopene and beta-carotene concentrations did not change in healthy adults. *Nutrition Research* 2016; 36(7).
21. Islam KMS, Mahmoud K, Männer K, Raila J, Rawel H, Zentek J, Schweigert F. Effect of dietary α -tocopherol on the bioavailability of lutein in laying hen. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2016; 100(5).
22. Boon CS, McClements DJ, Weiss J, Decker EA. Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2010; 50:6, 515-532.
23. Sy C, Gleize B, Dangles O, Landrier JF, Caris-Veyrat C, Borel P. Effects of physicochemical properties of carotenoids on their bioaccessibility, intestinal cell uptake, and blood and tissue concentrations. *Molecular nutrition & food research* 2012; 56. 1385-97.

24. Su Q, Rowley KG, D H Balazs N. Carotenoids: Separation methods applicable to biological samples. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2003; 781. 393-418.
25. Corte-Real J, Richling E, Hoffmann L, Bohn T. Selective factors governing in vitro β -carotene bioaccessibility: Negative influence of low filtration cutoffs and alterations by emulsifiers and food matrices. *Nutrition Research* 2014; 34.
26. Goltz SR, Campbell WW, Chitchumroonchokchai C, Failla ML, Ferruzzi MG. Meal triacylglycerol profile modulates postprandial absorption of carotenoids in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2012; 56(6):866-77.
27. Porrini M, Riso P. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 2009; 18. 647-50.
28. Dutta D, Ray Chaudhuri U, Chakraborty R. Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 2005; 4(13). 1510-1520
29. Courraud J, Berger J, Cristol JP, Avallone S. Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion. *Food Chem.* 2013; 136(2):871-7.
30. Kiokias S, Proestos C, Varzakas T. A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. *Curr Res Nutr Food Sci* 2016; 4(Special Issue Carotenoids March 2016).
31. Sensoy I. A review on the relationship between food structure, processing, and bioavailability. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014; 54(7):902-9.
32. Darvin M, Sterry W, Lademann J, Vergou T. The Role of Carotenoids in Human Skin. *Molecules* 2011; 16. 10491-10506.
33. R Kristal A, B King I, Albanes D, Pollak M, Z Stanzyk F, Santella R, Hoque A. Centralized Blood Processing for the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial: Effects of Delayed Processing on Carotenoids, Tocopherols, Insulin-Like Growth Factor-I, Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3, Steroid Hormones, and Lymphocyte Viability. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2005. 14. 727-30.
34. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease *Journal of Clinical Pathology* 2001; 54:176-186.

35. Xu XR, Zou ZY, Huang YM, Xiao X, Ma L, Lin XM. Serum carotenoids in relation to risk factors for development of atherosclerosis. *Clin Biochem.* 2012; 45(16-17):1357-61.
36. Drammeh BS, Schleicher RL, Pfeiffer CM, Jain RB, Zhang M, Nguyen PH. Effects of delayed sample processing and freezing on serum concentrations of selected nutritional indicators. *Clin Chem* 2008; 54(11):1883-91.
37. Greaves RF, Woollard GA, Hoad KE, Walmsley TA, Johnson LA, Briscoe S, Koetsier S, Harrower T, Gill JP. Laboratory Medicine Best Practice Guideline: Vitamins A, E and the Carotenoids in Blood. *The Clinical Biochemist Reviews* 2014; 35(2), 81–113.
38. Karppi J, Nurmi T, Nyssonen K. Simultaneous measurement of retinol, alpha-tocopherol, carotenoids and xanthins in human plasma by using an isocratic reversed-phase HPLC method. *Journal of Chromatography B* 2008; 867(2):226-32
39. Talwar D, Ha TK, Cooney J, Brownlee C, St JO'Reilly D. A routine method for the simultaneous measurement of retinol, α -tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC. *Clin Chim Acta* 1998; 270:85–100.
40. Su Q, Rowley KG, O'Dea K. Stability of individual carotenoids, retinol and tocopherols in human plasma during exposure to light and after extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 729(1-2):191-8.
41. Craft NE, Brown ED, Smith JC Jr. Effects of storage and handling conditions on concentrations of individual carotenoids, retinol, and tocopherol in plasma. *Clin Chem.* 1988; 34(1):44-8.
42. Cavina G, Gallinella B, Porrà R, Pecora P, Suraci C. Carotenoids, retinoids and alpha-tocopherol in human serum: Identification and determination by reversed-phase HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 1988; 6(3):259-69.
43. Kotikova Z, Šulc M, Lachman J, Pivec V, Orsák M, Hamouz K. Carotenoid profile and retention in yellow-, purple- and red-fleshed potatoes after thermal processing. *Food Chemistry* 2015; 197.
44. Siems W, Wiswedel I, Salerno C, Crifò C, Augustin W, Schild L, Langhans CD, Sommerburg O. Beta-carotene breakdown products may impair mitochondrial functions—Potential side effects of high-dose beta-carotene supplementation. *The Journal of nutritional biochemistry* 2005; 16. 385-97.
45. Rahman A, Bokhari SSI, Waqar MA. Beta-carotene degradation by cigarette smoke in hexane solution in vitro *Nutrition Research* 2001; Elsevier

46. Serra S. Recent Advances in the Synthesis of Carotenoid-Derived Flavours and Fragrances. *Molecules* 2015; 20(7):12817-40.
47. Jaeschke D, Marczak L, Mercali G. Evaluation of non-thermal effects of electricity on ascorbic acid and carotenoid degradation in acerola pulp during ohmic heating. *Food Chemistry* 2015; 199.
48. Hurst JS, Contreras JE, Siems WG, Van Kuijk FJ. Oxidation of carotenoids by heat and tobacco smoke. *Biofactors*. 2004; 20(1):23-35.
49. Murakami K, Honda M, Takemura R, Fukaya T, Diono W, Kanda H, Goto M. Effect of thermal treatment and light irradiation on the stability of lycopene with high Z -isomers content. *Food Chemistry* 2018; 250.
50. Froehlich K, Kaufmann K, Bitsch R, Boehm V. Effects of ingestion of tomatoes, tomato juice and tomato purée on contents of lycopene isomers, tocopherols and ascorbic acid in human plasma as well as on lycopene isomer pattern. *Br J Nutr* 2006; 95: 734-741.
51. Olmedilla-Alonso B, Granado-Lorencio F, Blanco-Navarro I. Carotenoids, retinol and tocopherols in blood: Comparability between serum and plasma (Li-heparin) values. *Clinical biochemistry* 2005; 38. 444-9.
52. Guerendiain M, Mayneris-Perxachs J, Montes R, López-Belmonte G, Martín-Matillas M, Castellote AI, Martín-Bautista E, Martí A, Martínez JA, Moreno L, Garagorri JM^a, Wärnberg J, Caballero J, Marcos A, López-Sabater MC, Campoy C. Relation between plasma antioxidant vitamin levels, adiposity and cardio-metabolic profile in adolescents: Effects of a multidisciplinary obesity programme. *Clinical Nutrition* 2017; 36. 209-217.
53. Kirti K, Amita S, Priti S, Kumar AM, Saxena J. Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. *Advances in Biology* 2014; 13. 10.1155/2014/837891.
54. Rivera S, Canela R. Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in maize. *Molecules*. 2012; 17(9):11255-68.
55. Mendelova A, Fikselova M, Mendel L. Carotenoids and lycopene content in fresh and dried tomato fruits and tomato juice. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 2013; 5. 1329–1337.
56. Luterotti S, Marković K, Franko M, Bicanic D, Madžgalj A, Kljak K. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods. *Food Chem*. 2013; 140(1-2):390-7.
57. Rivera SM, Canela-Garayoa R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *J Chromatogr A*. 2012; 1224:1-10.

58. Bohn T. Bioavailability of Non-Provitamin A Carotenoids. *Current Nutrition & Food Science* 2008; 4.
59. Regal P, Amorim-Carrilho KT, Cepeda A, Fente C. Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2014; 56.
60. Gueguen S, Herbeth B, Siest G, Leroy P. An Isocratic Liquid Chromatographic Method with Diode-Array Detection for the Simultaneous Determination of α -Tocopherol, Retinol, and Five Carotenoids in Human Serum. *Journal of chromatographic science* 2002; 40. 69-76.
61. Rodriguez A, S. Costa H. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006; 19. 97-111.
62. Saini RK, Keum YS. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem.* 2018; 240:90-103.
63. Furr HC. Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unsolved. *J Nutr.* 2004; 134(1):281S-285S.
64. Scott KJ. UNIT F2.2 Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry. Published Online 2001; DOI: 10.1002/0471142913.faf0202s00.
65. Franke AA, Morrison CM, Custer LJ, Li X, Lai JF. Simultaneous analysis of circulating 25-hydroxy-vitamin D₃, 25-hydroxy-vitamin D₂, retinol, tocopherols, carotenoids, and oxidized and reduced coenzyme Q₁₀ by high performance liquid chromatography with photo diode-array detection using C₁₈ and C₃₀ columns alone or in combination. *Journal of chromatography A.* 2013; 1301:1-9.
66. Rebecca J, Sharmila D, Das MP, Seshiah C. Extraction and purification of carotenoids from vegetables. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2014; 6. 594-598.
67. Petrovic S, Zvezdanović J, D. Anđelković T, Marković D. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Savremene tehnologije* 2012; 1. 16-24.
68. Song BJ, Jouni ZE, Ferruzzi MG. Assessment of phytochemical content in human milk during different stages of lactation. *Nutrition* 2013; 29(1):195-202.
69. Ho NH, Inbaraj BS, Chen BH. Utilization of Microemulsions from *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz to Improve Carotenoid Bioavailability. *Sci Rep.* 2016; 6:25426.
70. Key T, Oakes S, Davey G, et al. Stability of vitamins A, C, and E, carotenoids, lipids, and testosterone in whole blood stored at 4°C for 6 and 24 hours before separation of serum and plasma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5:811 – 4.

71. Di Pietro N, Di Tomo P, Pandolfi A. Carotenoids in Cardiovascular Disease Prevention. *JSM Atherosclerosis* 2016; 201610.13140/RG.2.1.2635.9921.
72. Hankinson SE, London SJ, Chute CG, et al. Effect of transport conditions on the stability of biochemical markers in blood. *Clin Chem* 1989; 35: 2313 – 6.
73. Varzakas T, Zakyntinos G. Carotenoids: From Plants to Food Industry. *Current Research in Nutrition and Food Science*. 2016; 4.
74. Holzapfel NP, Holzapfel BM, Champ S, Feldthusen J, Clements J, Hutmacher DW. The potential role of lycopene for the prevention and therapy of prostate cancer: from molecular mechanisms to clinical evidence. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(7):14620-46.
75. Richelle M, Sanchez B, Tavazzi I, Lambelet P, Bortlik K, Williamson G. Lycopene isomerisation takes place within enterocytes during absorption in human subjects. *Br J Nutr*. 2010; 103(12):1800-7.
76. Zou Y, Sun Q, Li J, Yang C, Yang J, Zhang L. Effects of E/Z isomers of lycopene on experimental prostatic hyperplasia in mice. *Fitoterapia*. 2014;99:211-7.
77. A. Cox B, T. Crow W, Johnson L. Current nutritional considerations for prevention of cervical cancer. *Osteopathic Family Physician*. 2012; 4. 81–84.
78. Konijeti R, Henning S, Moro A, Sheikh A, Elashoff D, Shapiro A, Ku M, Said JW, Heber D, Cohen P, Aronson WJ. Chemoprevention of prostate cancer with lycopene in the TRAMP model. *Prostate*. 2010; 70(14):1547-54.