فصلنامه علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال اول، شماره۳، زمستان ۱۳۸۵ ، صفحات ۴۵ تا ۵۰

اندازه‌گیری همزمان لیکوپن و بتا-کاروتن سرم به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

تیرنگ نیستانی[۱]، اعظم غروی[۲]

۱- نویسنده مسئول: استادیار پژوهشی (پژوهشگر) انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
پست الکترونیکی: tneyestani@nnftri.ac.ir
۲- محقق گروه تحقیقات تغذیه، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۷ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۳۰

چکیده

سابقه و هدف: لیکوپن و بتا-کاروتن، کاروتنوئیدهایی با خاصیت آنتی اکسیدانی قوی هستند که اساساً از طریق سبزی و میوه وارد بدن می‌شوند. اندازه‌گیری سطوح سرمی کاروتنوئیدها برای ارزیابی وضعیت آنتی اکسیدانی بدن و نیز برای تعیین روایی پرسشنامه‌های بررسی مصرف سبزیها و میوه‌ها کاربرد دارد.

مواد و روشها: این مطالعه با هدف راه اندازی یک روش آزمایشگاهی معتبر، نسبتاً سریع و کم هزینه برمبنای کروماتوگرافی با کارایی بالا برای اندازه گیری سطوح سرمی لیکوپن و بتا-کاروتن انجام شد. در این مطالعه، پس از آزمودن شرایط گوناگون کروماتوگرافی، نخست پروتئین‌های سرم به کمک اتانول رسوب داده شدند و سپس لیکوپن و بتا-کاروتن با هگزان استخراج شدند. فاز آلی در دمای ۴۰ °C تحت گاز ازت، تبخیر شد و مادهٔ باقیمانده در آمیزه‌ای از فاز متحرک (متانول: استونیتریل: تتراهیدروفوران، نسبت ۵۰:۴۵:۵، حجمی، حاوی ۰/۰۱درصد هیدروکسی تولوئن بوتیله) و دی‌اتیل‌اتر (نسبت ۲ به ۱ حجمی) حل و ۲۰µL از آن به ستون Novopack C18 تزریق شد.

یافته ها: زمان بازداری لیکوپن و بتا-کاروتن در میزان جریان ۱/۵ mL/min و طول موج ۴۷۲ nm به ترتیب ۵/۱ و ۸/۶ دقیقه و کل زمان کروماتوگرافی ۱۱ دقیقه به دست آمد. میانگین و انحراف معیار درصد بازیافت لیکوپن و بتا-کاروتن در آزمایشهای متعدد به ترتیب معادل ۷/۸±۹۵/۵٪ و ۷±۹۵/۲٪ به دست آمد. تغییرات درون و میان سنجشی برای لیکوپن به ترتیب معادل ۱/۶ و ۵/۷۵ درصد و برای بتا-کاروتن به ترتیب ۳ و ۳/۵ درصد بود.

نتیجه‌گیری: آزمونهای کنترل کیفی حاکی از حساسیت و دقت بالای این روش بودند. علاوه براینکه زمان و هزینهٔ نسبتاً اندک آزمایش، آن را برای مقاصد پژوهشی و به ویژه مطالعات جمعیتی مناسب می‌کند، در عین حال، این روش نیز مانند هر روش آزمایشگاهی دیگری محدودیتهایی هم دارد. به طور مثال، معلوم نیست با این روش تا چند آنالیت را می‌توان همزمان اندازه‌گیری نمود. روشن کردن این مساله نیازمند مطالعات بیشتری است.

واژگان کلیدی: HPLC، لیکوپن، بتا-کاروتن

• مقدمه

لیکوپن که رنگدانهٔ طبیعی گوجه‌فرنگی و فراورده‌های آن است، پیش‌ساز ویتامین A نیست، اما یک آنتی‌اکسیدان قوی است (۳-۱). فعالیت آنتی‌اکسیدانی لیکوپن که در چندین مطالعه تجربی (۶-۴) و انسانی (۷، ۸) نشان داده شده است، ظاهراً با ویتامین E اثر هم افزاینده (سینرژیستیک synergistic) دارد (۹). بتا-کاروتن، برخلاف لیکوپن، یکی از کاروتنوئیدهای پیش‌ساز ویتامین A است که خواص آنتی اکسیدانی دارد (۱۰، ۱۱). در برخی مطالعات، اثرات محافظتی سطوح سرمی بالای بتا-کاروتن در برابر بیماریهای قلبی‌عروقی گزارش شده است (۱۲) اما برخی مطالعات دیگر، مؤید آن نبوده‌اند (۱۳).

در عین حال، اثرات ضدسرطانی کاروتنوئیدها، شامل لیکوپن و بتا-کاروتن هم نشان داده شده است (۱۴، ۱۵).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-01]

در بیشتر این مطالعات، از اندازه‌گیری غلظت کاروتنوئیدها در خون برای ارزیابی وضعیت آنتی اکسیدانی یا ارتباط آن با ابتلا به بیماریها استفاده شده است. از سوی دیگر، اندازه‌گیری سطوح سرمی کاروتنوئیدها برای ارزیابی روایی پرسشنامه‌های بررسی مصرف سبزی و میوه هم به کار رفته است (۱۹-۱۶). از این رو، در اختیار داشتن یک روش مناسب، معتبر و نسبتاً سریع برای اندازه‌گیری سطوح خونی کاروتنوئیدها به عنوان یک ابزار پژوهشی در بسیاری از مطالعات تغذیه‌ای روی استرس اکسیداتیو و ارتباط آن با بیماریها یا روایی پرسشنامه‌های بررسی مصرف کاملاً ضرورت دارد. در این مطالعه، روش اندازه‌گیری همزمان سطوح سرمی دوتا از فراوانترین کاروتنوئیدهای غذایی، بتا-کاروتن و لیکوپن، با دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا high-performance liquid chromatography (HPLC) راه‌اندازی و سپس آزمونهای متعدد کنترل کیفی برروی آن انجام شد. نتایج این آزمونها حاکی از دقت و اعتبار نسبتاً بالای این روش بودند.

• مواد و روشها

مبانی: به منظور راه‌اندازی روش، از یک نمونهٔ سرم آمیخته (pool serum) استفاده شد. ابتدا پروتئین‌های سرم به کمک اتانول رسوب داده شدند و سپس، لیکوپن و بتا-کاروتن با هگزان استخراج شدند. فاز آلی در دمای ۴۰°C تحت گاز ازت، تبخیر شد و مادهٔ باقیمانده در آمیزه‌ای از فاز متحرک و دی اتیل اتر (نسبت ۲:۱ حجمی) حل و به ستون تزریق شد.

مواد: متانول، اتانول، n-هگزان،هیدروکسی تولوئن بوتیله butylated hydroxyl toluene (BHT)، استونیتریل و تتراهیدروفوران، همگی با درجهٔ خلوص HPLC (Romil, UK)، دی اتیل اتر (BDH, India)، استاندارد لیکوپن (Sigma Aldrich, Cat.No. L9879)، و استاندارد بتا-کاروتن (Fluka, Cat.No. 22040)

ابزارها: دستگاه HPLC مجهز به آشکارساز فرابنفش UV730D (همگی از Young Lin, South Korea)، ستون Novopack C18 (Waters, USA) و چاپگر.

روش کار

تهیهٔ محلولهای استاندارد: استانداردهای مختلف لیکوپن (۶، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میکروگرم در دسی لیتر) و بتا-کاروتن (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم در دسی‌لیتر) در فاز متحرک تهیه شد.

آماده سازی نمونه: برای رسوب دادن پروتئین‌ها، ۱۰۰۰µL اتانول به ۵۰۰ µL نمونهٔ سرم، افزوده و ۲۰ ثانیه با همزن برقی هم زده شد. سپس ۱۰۰۰µL هگزان به آن افزوده و ۶۰ ثانیهٔ دیگر با همزن مخلوط شد (مرحلهٔ استخراج). فاز رویی به یک ویال تزریق، منتقل شد. مرحلهٔ استخراج، دوباره تکرار شد. فاز آلی هگزان در ۴۰°C زیر جریان گاز ازت، تبخیر و رسوب حاصله با فاز متحرک حاوی دی اتیل اتر (نسبت ۲ به ۱ حجمی) به حجم ۵۰۰µL رسانده شد. این نمونه به ستون تزریق شد.

شرایط کروماتوگرافی: ستون Novo Pack C18, 4 µm, 20cm، میزان جریان ۱/۵ mL/min، فشار ۱۳۵۰ psi، فاز متحرک متشکل از متانول:استونیتریل:تتراهیدروفوران (۵:۴۵:۵۰، v/v/v) حاوی ۰/۰۱٪ BHT، حجم تزریق sample loop: ۲۰ µL، طول موج آشکارساز: ۴۷۲ nm. همهٔ مراحل آزمایش در دمای اتاق انجام شد. غلظت نمونه ها با استفاده از نرم افزار Autochrom 2000 محاسبه شد.

آزمونهای کنترل کیفی: برای تعیین درستی و دقت روش، از تعیین دامنهٔ خطی بودن، حد آشکارسازی، درصد بازیافت و تکرارپذیری آن در یک روز و روزهای متوالی استفاده شد.

الف) دامنهٔ خطی بودن (range of linearity): برای لیکوپن با غلظتهای ۶، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میکروگرم در دسی‌لیتر و برای بتا-کاروتن با غلظتهای ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم در دسی‌لیتر منحنی استاندارد تهیه شد.

ب) حد آشکارسازی (detection limit): حد آشکارسازی با رقیق سازی متوالی کمترین غلظت به کاررفته برای تهیهٔ منحنی استاندارد (برای لیکوپن ۶ و برای بتا-کاروتن ۱۰ میکروگرم در دسی‌لیتر) که دارای پیک قابل تشخیص باشد، تعیین شد.

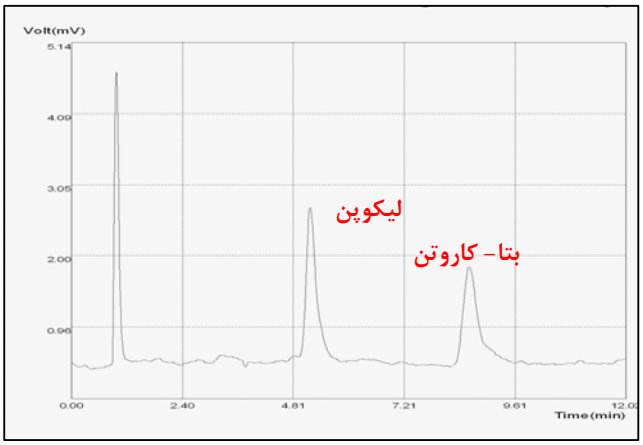
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-01]

ج) درصد بازیافت (recovery percent): برای غنی سازی نمونهٔ سرم، ۲۰ µL از استاندارد لیکوپن (۱۵۰µg/dL) و بتا-کاروتن (۲۵۰µg/dL) به ۵۰۰ µL نمونهٔ سرم افزوده و مانند نمونهٔ معمولی آماده شد. سپس ۲۰µL از آن (حاوی ۱/۲ ng لیکوپن و ۲/۰ng بتا-کاروتن اضافی) به ستون، تزریق و سپس درصد بازیافت، محاسبه شد.

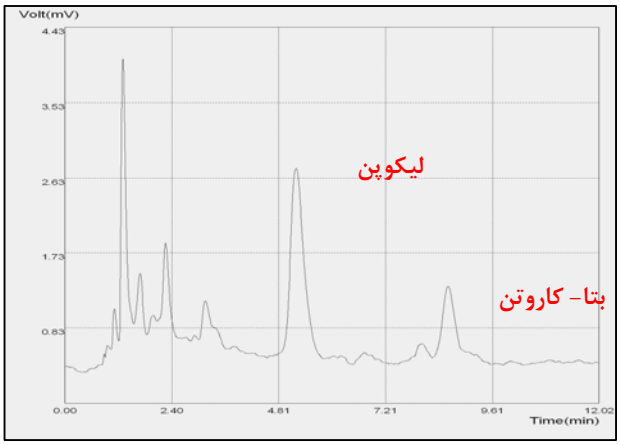
د) دقت (precision) : برای تعیین تکرارپذیری آزمایش، با آزمایش مکرر یک نمونهٔ واحد سرم آمیخته در یک روز و روزهای متوالی، به ترتیب تغییرات درون و میان-سنجشی intra-and inter-assay variations تعیین شد.

• یافته ها

زمان بازداری (retention time) برای لیکوپن و بتا-کاروتن به ترتیب ۵/۱ و ۸/۶ دقیقه و کل زمان کروماتوگرافی ۱۱ دقیقه به دست آمد (شکلهای ۱ و ۲). منحنی استاندارد هردو کاروتنوئید تا غلظت نهایی به شکل خطی بود (شکل ۳). حد اشکارسازی برای لیکوپن و بتا-کاروتن به ترتیب ۱/۴ و ۳/۵ میکروگرم در دسی‌لیتر بود. میانگین و انحراف معیار درصد بازیافت لیکوپن و بتا-کاروتن در آزمایشهای متعدد به ترتیب ۷/۸±۹۵/۵٪ و ۷±۹۵/۲٪ به دست آمد. تغییرات درون و میان-سنجشی برای لیکوپن به ترتیب معادل ۱/۶٪ و ۵/۷۵٪ و برای بتا-کاروتن به ترتیب ۳٪ و ۳/۵٪ بود.

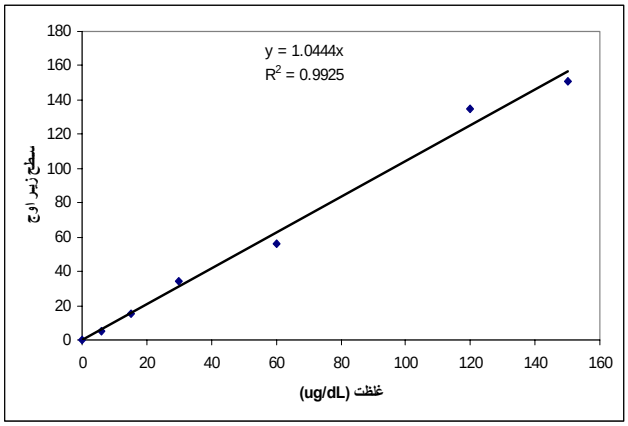


شکل ۱- کروماتوگرام استانداردهای لیکوپن و بتا-کاروتن

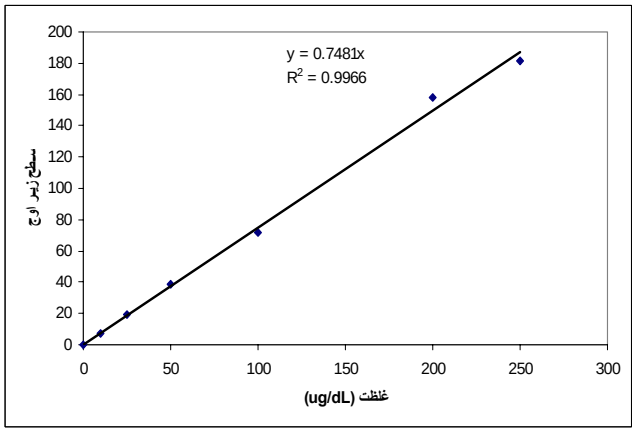


شکل ۲- پیک‌های لیکوپن و بتا-کاروتن در نمونهٔ سرم. پیک کوچک نزدیک به بتا-کاروتن، احتمالاً مربوط به آلفا-کاروتن است.

(الف)



(ب)



شکل ۳- منحنی های کالیبراسیون لیکوپن (الف) و بتا-کاروتن (ب). سطح زیر منحنی برای لیکوپن و بتا-کاروتن به ترتیب تا ۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر دسی لیتر به طور خطی افزایش می یافت (غلظتهای بالاتر آزمایش نشد.)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-01]

• بحث

امروزه اعتقاد بر این است که استرس اکسیداتیو، یا عدم تعادل میان آنتی‌اکسیدان‌ها و پرواکسیدان‌ها به سوی پرواکسیدان‌ها، در ایجاد بسیاری از بیماریها یا عوارض آنها، مانند بیماریهای قلبی عروقی در مبتلایان به دیابت (۲۰، ۲۱)، اختلالات اعصاب محیطی (۲۲)، آسیب عروقی (۲۳)، و نارسایی قلبی (۲۴) دخالت دارد. از این رو، ارزیابی وضعیت آنتی‌اکسیدانی، دست کم به عنوان یک ابزار پژوهشی، اهمیت ویژه‌ای دارد. حتی گاهی ضرورت می‌یابد که سطوح سرمی آنتی‌اکسیدان‌های مهمی که از راه غذا دریافت می‌شوند، اندازه‌گیری شود (۲۵، ۲۶).

از سوی دیگر، مطالعات گوناگون نشان داده‌اند که اندازه‌گیری سطوح سرمی کاروتنوئیدها ممکن است در تعیین روایی پرسشنامه‌های بررسی مصرف میوه و سبزی کارایی داشته باشند (۱۹-۱۶). در مطالعه‌ای که به تازگی در تایوان انجام پذیرفت، فراوانترین کاروتنوئیدهای خون به ترتیب بتا-کاروتن و لیکوپن گزارش شد (۲۷). بنابراین، دراختیار داشتن روشی نسبتاً ساده و قابل اعتماد برای اندازه‌گیری این دو کاروتنوئید می تواند در گسترهٔ نسبتاً وسیعی از مطالعات تغذیه‌ای به کار آید.

در مطالعه‌ای که برای مقاصد دامپزشکی روی اندازه‌گیری لیکوپن سرم سگ به روش HPLC انجام شد، پژوهشگران از ستون BDS RP-C18 column (150 mm x 4.6 mm), 5 µm و فاز متحرک استونیتریل: متانول (به نسبت ۵۰:۵۰ حجمی) با میزان جریان ۱/۵ mL/min استفاده کردند. در این حال، دامنهٔ خطی بودن را ۳-۲۰۰µg/dL و درصد بازیافت را بالای ۹۷٪ گزارش کردند. از مزایای این روش عبارت بودند از به کارگیری استاندارد داخلی اتیل-بتا-آپو-'۸-کاروتنات، زمان بازداری نسبتاً مناسب (برای لیکوپن و استاندارد داخلی به ترتیب ۱۱ و ۵ دقیقه) و دقت نسبتاً بالا (تغییرات درون- و میان-سنجشی به ترتیب ۱/۸ و ۳/۱ درصد) (۲۸). با این حال، در این روش، بر خلاف مطالعه کنونی، تنها یک کاروتنوئید اندازه‌گیری شد.

در مطالعهٔ جالب دیگری، پژوهشگران با استفاده از روش گرادیان و غلظتهای مختلف متانول و کلریدمتیلن در زمانهای متفاوت توانستند غلظت خونی ۵۱ کاروتنوئید (شامل لیکوپن و بتا-کاروتن) را تعیین نمایند (۲۷). هرچند این مطالعه از بُعد پژوهشی بسیار درخور توجه است، در بیشتر مطالعات تغذیه‌ای عملاً اندازه‌گیری همگی این کاروتنوئیدها ضرورت نمی یابد و در عین حال، تعداد زیاد آنالیت‌های مورد سنجش آزمایش را بسیار طولانی و وقت‌گیر (بیش از یک ساعت) و تعداد نمونه‌های قابل آزمایش در یک روز را بسیار محدود می‌کند. در حالی که با روش معرفی شده در این مطالعه به طور متوسط آزمایش ۱۵ تا ۲۰ نمونه در هر روز کاری امکان‌پذیر می باشد.

پژوهشگران فرانسوی برای اندازه‌گیری همزمان آلفا-توکوفرول، رتینول و ۵ کاروتنوئید (شامل بتا-کاروتن و لیکوپن) در سرم انسان به روش HPLC از ترکیب مشابهی ولی با نسبتهای متفاوتی از مواد برای فاز متحرک استفاده کردند (متانول: استونیتریل:THF، به نسبت ۵:۲۰:۷۵ حجمی) ولی برای آشکارسازی آنالیت‌ها به جای آشکارساز فرابنفش معمولی از photodiode array (PDA) در سه طول موج ۲۹۰، ۳۲۵ و ۴۵۰ نانومتر استفاده کردند. به این ترتیب، کروماتوگرافی را به روش ایزوکراتیک و در عرض ۲۰ دقیقه انجام دادند. جالب اینکه در این مطالعه، با وجود استفاده از استاندارد داخلی و افزودن آنتی‌اکسیدان به نمونه در ضمن استخراج با هگزان، میزان بازیافت کاروتنوئیدها ۸۵٪ به بالا و تغییرات درون-سنجشی برای لیکوپن ۹/۵٪ گزارش شد (۲۹). روش معرفی شده در این مطالعه افزون بر سادگی بیشتر، بازیافت بالاتر و تغییرات درون سنجشی بسیار کمتری را نشان داد که حاکی از دقت نسبتاً بالای آن می‌باشد.

با اینکه از روشهای پیشرفته تر، مانند طیف سنجی جرمی (mass spectrometry) هم برای اندازه‌گیری کاروتنوئیدهای سرم، به ویژه بتا-کاروتن و لیکوپن، استفاده شده، ولی در بیشتر این مطالعات، به نسبت روشهای ارزانتر، دقت بالاتری گزارش نشده است. به طورمثال، در مطالعه‌ای برای اندازه‌گیری لیکوپن، آلفا و

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-01]

بتـا-کـاروتن سـرم بـا HPLC بـه روش پیچیـدۀ atomospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS) و بـا فـاز متحـرک متـانول: استونیتریل (۷۰:۳۰، حجمـی) تغییـرات درون-سنجـشی ۱۰٪ و ۵/۳٪ و تغییرات میان-سنجشی ۱۱/۲٪ و ۶/۵٪ به ترتیب برای لیکوپن و بتا-کاروتن به دست آمد (۳۰) کـه در مقایسه بـا روش معرفـی شـده در ایـن مطالعـه دقـت بیشتر را نشان نمی‌دهد.

نتـایج مطالعـۀ کنـونی حـاکی از دقـت، حـساسیت و تکرارپذیری بسیار بالای روش معرفی شـده اسـت، عـلاوه براینکه زمان و هزینۀ نسبتاً انـدک آزمـایش، آن را بـرای مقاصد پژوهشی و بـه ویـژه مطالعـات جمعیتـی مناسـب می‌کند. در عـین حـال، ایـن روش نیـز ماننـد هـر روش آزمایشگاهی دیگری محدودیتهایی هم دارد. به طور مثال، معلوم نیست بـا ایـن روش تـا چنـد آنالیـت را مـی‌تـوان همزمان انـدازه گیـری نمـود. روشـن کـردن ایـن مـساله نیازمند مطالعات بیشتری است.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب یـک طـرح پژوهـشی بـا بودجـۀ انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور و تمامـاً در آزمایشگاه پژوهشهای تغذیه‌ای آن مرکـز انجـام شـده است که بدینوسیله مراتـب تـشکر و قـدردانی خـود را از مسئولان و همکاران محترم اعلام می‌داریم.

• References

1. Weisburger JH. Lycopene and tomato products in health promotion. Exp Biol Med 2002;227:924-7.
2. Khachik F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir G, Zhao DY, Katz NB. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. Exp Biol Med 2002;227:845-51.
3. Gerster H. The potential role of lycopene for human health. J Am Coll Nutr 1997;16:109-26.
4. Karahan I, Atessahin A, Yilmaz S, Ceribasi AO, Sakin F. Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. Toxicology. 2005 Nov 15;215(3):198-204.
5. Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. Toxicology. 2005;212:116-23.
6. Reifen R, Nissenkorn A, Matas Z, Bujanover Y. 5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis. J Gastroenterol. 2004;39:514-9.
7. Neuman I, Nahum H, Ben-Amotz A. Reduction of exercise-induced asthma oxidative stress by lycopene, a natural antioxidant. Allergy. 2000;55:1184-9.
8. Porrini M, Riso P, Brusamolino A, Berti C, Guarnieri S, Visioli F. Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. Br J Nutr. 2005;93:93-9.
9. Shi J, Kakuda Y, Yeung D. Antioxidative properties of lycopene and other carotenoids from tomatoes: synergistic effects. Biofactors. 2004;21:203-10.
10. Galassetti P, Pontello A. Dietary effects on oxidation of low-density lipoprotein and atherogenesis. Curr Atheroscler Rep. 2006;8:523-9.
11. Chichili GR, Nohr D, Frank J, Flaccus A, Fraser PD, Enfissi EM, Biesalski HK. Protective effects of tomato extract with elevated beta-carotene levels on oxidative stress in ARPE-19 cells. Br J Nutr. 2006;96:643-9.
12. Ito Y, Kurata M, Suzuki K, Hamajima N, Hishida H, Aoki K. Cardiovascular disease mortality and serum carotenoid levels: a Japanese population-based follow-up study. J Epidemiol. 2006;16:154-60.
13. Paterson E, Gordon MH, Niwat C, George TW, Parr L, Waroonphan S, Lovegrove JA.Supplementation with fruit and vegetable soups and beverages increases plasma carotenoid concentrations but does not alter markers of oxidative stress or cardiovascular risk factors. J Nutr. 2006;136:2849-55.
14. Hung RJ, Zhang ZF, Rao JY, Pantuck A, Reuter VE, Heber D, Lu QY. Protective effects of plasma carotenoids on the risk of bladder cancer. J Urol. 2006;176:1192-7.
15. Maillard V, Hoinard C, Arab K, Jourdan ML, Bougnoux P, Chajes V. Dietary beta-carotene inhibits mammary carcinogenesis in rats depending on dietary alpha-linolenic acid content. Br J Nutr. 2006;96:18-21.
16. Coyne T, Ibiebele TI, McNaughton S, Rutishauser IH, O'Dea K, Hodge AM, McClintock C, Findlay MG, Lee A. Evaluation of brief dietary questions to estimate vegetable and fruit consumption - using serum carotenoids and red-cell folate. Public Health Nutr. 2005;8:298-308.
17. van Kappel AL, Steghens JP, Zeleniuch-Jacquotte A, Chajes V, Toniolo P, Riboli E. Serum carotenoids as biomarkers of fruit and vegetable consumption in the New York Women's Health Study. Public Health Nutr. 2001;4:829-35.
18. Smith-Warner SA, Elmer PJ, Tharp TM, Fosdick L, Randall B, Gross M, Wood J, Potter JD. Increasing vegetable and fruit intake: randomized intervention and

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-01]

monitoring in an at-risk population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000;9:307-17.

19. Su LJ, Arab L. Salad and raw vegetable consumption and nutritional status in the adult US population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. J Am Diet Assoc. 2006; 106: 1394-404.
20. Stephens JW, Gable DR, Hurel SJ, Miller GJ, Cooper JA, Humphries SE. Increased Plasma Markers of Oxidative Stress Are Associated with Coronary Heart Disease in Males with Diabetes Mellitus and with 10-Year Risk in a Prospective Sample of Males. Clin Chem. 2006;52:446-52.
21. Lankin VZ, Lisina MO, Arzamastseva NE, Konovalova GG, Nedosugova LV, Kaminnyi AI, Tikhaze AK, Ageev FT, Kukharchuk VV, Belenkov YN. Oxidative stress in atherosclerosis and diabetes. Bull Exp Biol Med. 2005;140:41-3.
22. Kellogg AP, Pop-Busui R. Peripheral nerve dysfunction in experimental diabetes is mediated by cyclooxygenase-2 and oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 2005;7:1521-9.
23. Minuz P, Fava C, Cominacini L. Oxidative stress, antioxidants, and vascular damage. Br J Clin Pharmacol. 2006;61:774-7.
24. Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. Heart. 2006; [Epub ahead of print]
25. Kiefer I, Prock P, Lawrence C, Wise J, Bieger W, Bayer P, Rathmanner T, Kunze M, Rieder A. Supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased serum antioxidants and folate in healthy adults. J Am Coll Nutr. 2004;23:205-11.
26. Samman S, Sivarajah G, Man JC, Ahmad ZI, Petocz P, Caterson ID. A mixed fruit and vegetable concentrate increases plasma antioxidant vitamins and folate and lowers plasma homocysteine in men. J Nutr. 2003;133:2188-93.
27. Rajendran V, Pu YS, Chen BH. An improved HPLC method for determination of carotenoids in human serum. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005; 824:99-106.
28. Vertzoni MV, Reppas C, Archontaki HA. Optimized determination of lycopene in canine plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005;819:149-54.
29. Gueguen S, Herbeth B, Siest G, Leroy P. An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol, and five carotenoids in human serum. J Chromatogr Sci. 2002;40:69-76.
30. Hagiwara T, Yasuno T, Funayama K, Suzuki S. Determination of lycopene, alpha-carotene and beta-carotene in serum by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected-ion monitoring. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1998;708:67-73.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-01]