

**Isomerisierung von Carotinoiden und deren Bedeutung für  
die Lebensmittelauthentizität und *in vivo***

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II

Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Thomas Heymann

geb. am 14.11.1984 in Merseburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Marcus A. Glomb

2. Gutachter: PD Dr. Volker Böhm

Halle (Saale), 15.07.2015

I. Vorwort.....	1
II. Danksagung.....	2
1. Einleitung .....	3
1.1 Allgemeines.....	3
1.2 Vorkommen, Eigenschaften und Biosynthese .....	3
1.3. Isomerisierungsprozess von Lycopin und $\beta$ -Carotin.....	5
1.3.1. Theoretische Grundlagen .....	5
1.3.2 Thermische Isomerisierung von Lycopin und $\beta$ -Carotin .....	7
1.3.3 Photochemische Isomerisierung von Lycopin und $\beta$ -Carotin .....	11
1.3.4 Chemische Isomerisierung von Lycopin und $\beta$ -Carotin .....	14
1.4. Carotinoide <i>in vivo</i> – Isomerenmuster und Bioverfügbarkeit .....	20
2. Zielstellung.....	25
3. Diskussion der Ergebnisse .....	26
4. Publikationen.....	40
4.1 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61, 11133 – 11139.....	40
4.2 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62, 4960 – 4967.....	47
4.3 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, XX, XXXXX – XXXXX.....	55
5. Zusammenfassung der Dissertation .....	87
6. Abstract .....	89
7. Literaturverzeichnis.....	91
8. Abbildungsverzeichnis .....	100
9. Tabellenverzeichnis.....	101
10. Anhang .....	102
10.1 Supporting Information zu <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 2013, 61, 11133–11139.....	102
10.2 Supporting Information zu <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 2014, 62, 4960–4967.....	106
10.3 Supporting Information zu <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 2015, XX, XXXX–XXXXX.....	109
11. Publikationsliste .....	113
12. Lebenslauf .....	114
13. Eidesstattliche Erklärung.....	115

## I. Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde vom Mai 2010 bis Juli 2014 an der Martin-Luther-Universität am Institut für Chemie, Fachbereich Lebensmittelchemie und Umweltchemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Marcus A. Glomb angefertigt.

Nach Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt wurde das Projekt vom Mai 2010 bis April 2012 finanziert.

Die Veröffentlichung von Forschungsergebnissen erfolgte in internationalen Fachzeitschriften. Die Dissertation wurde in kumulativer Form angefertigt. Die Darstellung von experimentellen Daten, deren Einordnung, Bewertung und Diskussion erfolgte dabei in den beigefügten Publikationen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die wissenschaftlichen Einzelaspekte aus den Veröffentlichungen zusammenzufassen und in den Kontext des Titels „Isomerisierung von Carotinoiden und deren Bedeutung für die Lebensmittelauthentizität und *in vivo*“ einzuordnen.

## II. Danksagung

In erster Linie bedanke ich mich bei Prof. Dr. Marcus Glomb, der mir die Arbeit an einem sehr abwechslungsreichen und spannenden Thema ermöglicht hat. Außerdem war er stets zu Diskussionen bereit und gab entscheidende Impulse zum Gelingen der Arbeit und ermöglichte eine fachübergreifende Zusammenarbeit.

Ein großer Dank geht an das Institut für Pflanzenbiochemie in Halle. Insbesondere danke ich Prof. Dr. Ludger Wessjohann und Frau Dr. Lore Westphal, die mit mir den Anbau der authentischen Gewächshausproben ermöglicht haben. Ohne diese Kooperation wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Vielen Dank dass ich bei Ihnen arbeiten durfte.

Gleichermaßen geht mein Dank an Abteilung klinische Medizin der Medizinischen Fakultät der Universitätsklinik der MLU Halle-Wittenberg. Dank Prof. Girndt und seinem Team konnten im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen in humanen Plasma durchgeführt werden, wodurch die Arbeit zusätzlich an Bedeutung gewinnen konnte. Vielen Dank an Kristin Liehr, die mir die Organisation der Blutentnahme fast vollständig abgenommen hat. Dank natürlich auch an die Freiwilligen, die im Namen der Wissenschaft ihr Blut gelassen haben.

Großer Dank gebührt ebenfalls meinen Diplomanden Julia Raeke, Karsten Konradi und Phillip Heinz sowie Nicole Janz, die tatkräftig zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Ohne euch wäre die vorliegende Arbeit nicht in diesem Umfang zustande gekommen.

Außerdem gilt dem NMR-Team um Dr. Strobel ein großer Dank, für die Messung der unzähligen Spektren, die während der Synthese der Carotinoid-Standards angefallen sind.

Ein Dankeschön auch an den gesamten Arbeitskreis Glomb, der nicht nur durch fachliche Kompetenz und eine stete Diskussionsbereitschaft gekennzeichnet ist, sondern auch in der einen oder anderen Pause für die nötige Abwechslung gesorgt wurde. Ein gesonderter Dank geht an Stefan Rakete und Robert Berger, die mir den Weg dank guter Laune und Spaß deutlich erleichtert haben (neben der fachlichen Kompetenz).

Ein gleiches Maß an Dank gilt meiner gesamten Familie, die mich während der gesamten Zeit in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben und mir nahezu jedes Wochenende die nötige Erholung vom Uni-Alltag geboten haben und mich beim Anbau und der Ernte diverser Freiland-Proben unterstützt haben.

Zu guter Letzt danke ich meiner Partnerin Annelie Ulrich, die mich nach der Arbeit jeden Tag ertragen musste. Vielen Dank für deine Unterstützung. Es ist schön dass es dich (bzw. euch) gibt.

## 1. Einleitung

### 1.1 Allgemeines

Carotinoide sind als Pigmente ubiquitär in der Natur verbreitet und für die charakteristische Färbung verschiedener Pflanzen und Organismen verantwortlich.<sup>1</sup>

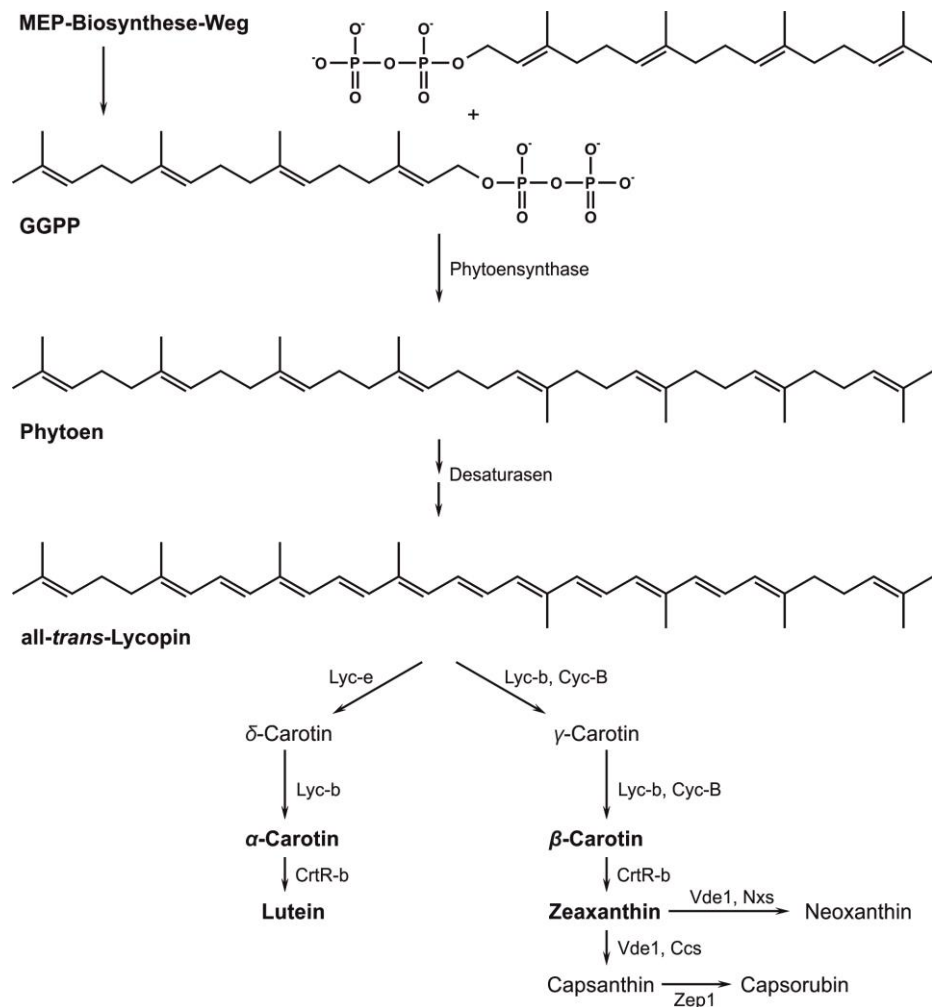
Neben den farbgebenden Eigenschaften, erfüllen Carotinoide aber auch eine Vielzahl von biologischen Funktionen. In höheren Pflanzen dienen sie unter anderem als Antennenpigment im Lichtsammelkomplex und optimieren so die Lichtausbeute während der Photosynthese.<sup>1,2</sup> Darüber hinaus besitzen Carotinoide eine hohe antioxidative Kapazität und wirken so reaktiven Sauerstoffspezies und anderen oxidativ wirksamen Substanzen entgegen.<sup>3</sup> Carotinoide bieten damit Schutz gegenüber Singulett-Sauerstoff, der während zu starker Sonneneinstrahlung in den Chloroplasten gebildet werden kann.<sup>2,4</sup> Diese Wirkung gegen zytotoxischen Verbindungen ist auch für den tierischen Organismus von Bedeutung. Präventive Funktionen gegenüber verschiedenen degenerativen, kardiovaskulären Erkrankungen wie Krebs, Bluthochdruck oder Arteriosklerose werden in diesem Zusammenhang diskutiert.<sup>5-8</sup> Eine Carotinoid-induzierte Verstärkung der Zell-Zell-Kommunikation über sogenannte „gap-junctions“ ist ebenfalls in der Literatur beschrieben.<sup>9,10</sup> Demnach können Carotinoide Einfluss auf die Regulation von Wachstums- und Entwicklungsprozessen nehmen.<sup>9,10</sup> Zudem besitzen einige Carotinoide, wie das  $\beta$ -Carotin, eine Provitamin-A-Aktivität und leisten u.a. einen Beitrag zur Funktion des Sehprozesses und wirken an der Gesunderhaltung der Augen mit.<sup>11-13</sup> In aktuellen Studien werden vor allem auch den Carotinoid-Metaboliten zahlreiche Funktionen im menschlichen Organismus zugeschrieben. Allerdings ist der komplexe Metabolismus der Carotinoide und die daraus resultierenden Funktionen und Eigenschaften potenter Abbaustrukturen bisher nur wenig erforscht. Aufgrund der möglichen gesundheitsfördernden Eigenschaften von Carotinoiden, gewinnen diese nicht nur ernährungsphysiologisch an Bedeutung, sondern stehen auch immer mehr im Fokus von aktuellen Forschungsarbeiten.<sup>14-16</sup>

### 1.2 Vorkommen, Eigenschaften und Biosynthese

Aktuell werden etwa 700 verschiedene Verbindungen dieser Stoffklasse zugeordnet. Strukturell verbindet alle ein langkettiges Kohlenwasserstoff-Grundgerüst, das durch ein ausgedehntes Doppelbindungssystem charakterisiert ist. Klassisch unterscheidet man zwischen den Carotinen, als reine Kohlenwasserstoff-Verbindungen, und den Xanthophyllen, die zusätzlich verschiedenartige Sauerstofffunktionalitäten besitzen.<sup>17</sup>

Carotinoide werden ausschließlich in Pflanzen und Photosynthese betreibenden Mikroorganismen gebildet. In höheren Pflanzen erfolgt die Biosynthese in den Plastiden, wie schematisch in Abb. 1 dargestellt. Als wichtigste Vorläuferstruktur für verschiedene Isoprenoide wird zunächst das Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) über den Methylerythritolphosphatweg (MEP) gebildet. Als wichtigster Schritt der Carotinoid-Biosynthese kann die enzymatische „head-to-head“ Verknüpfung zweier GGPP-Moleküle angesehen

werden. Über weitere Zwischenschritte entsteht das farblose Phytoen, das die erste Carotinoidgrundstruktur im Synthesepfad darstellt. Aus diesem Tetraterpen wird in Gegenwart von Desaturasen in einem mehrstufigen Prozess zunächst all-*trans*-Lycopin generiert. Dieses dient stets als Ausgangspunkt für die Synthese anderer Carotinoide. Durch die Ausbildung von Ionon-Ringen an beiden Enden des Lycopin-Moleküls kann  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin generiert werden. Diese bilden dann wiederum den Ausgangspunkt für diverse Xanthophylle. Auch hier findet der Einbau verschiedener Sauerstofffunktionalitäten enzymkatalysiert statt.<sup>17</sup>



**Abb. 1: Biosynthese von Carotinoiden in höheren Pflanzen**

Da tierische Organismen nicht zur Biosynthese von Carotinoiden befähigt sind, werden diese ausschließlich über die Ernährung zugeführt.<sup>18</sup> Die tägliche Aufnahme in Europa liegt zwischen 9,5 und 16,1 mg. Dabei werden diese Mengen nahezu ausschließlich durch den Verzehr von Obst und Gemüse gedeckt. Insgesamt werden etwa 50 verschiedene Carotinoide mit der Ernährung zugeführt.<sup>19</sup> Tatsächlich sind aber nur sechs Strukturen für die menschliche Ernährung von essentieller Bedeutung. Lycopin,  $\beta$ -Carotin,  $\alpha$ -Carotin, Lutein, Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin stellen mehr als 95 % der im Blut nachgewiesenen Carotinoide dar (siehe Abb. 2).<sup>20</sup> Gleichzeitig entfallen bei der täglichen Aufnahme etwa 35 % auf  $\beta$ -Carotin, 30 % auf Lycopin und weitere 16 % auf Lutein,<sup>21</sup> sodass diese drei Verbindungen besonders relevant für wissenschaftliche Untersuchungen sind.

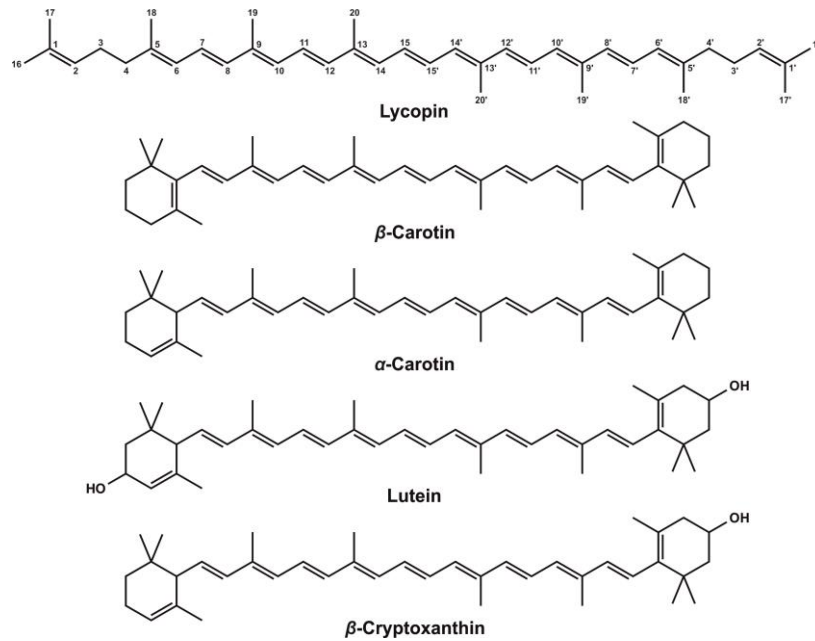


Abb. 2: Strukturen der ernährungsphysiologisch bedeutsamsten Carotinoide

Weltweit stellen Tomaten die Hauptquelle für Lycopin in der menschlichen Ernährung dar. So werden bis zu 97 % der täglich aufgenommenen Menge durch Tomaten und vor allem auch durch verarbeitete Tomatenprodukte zugeführt. Als Nahrungsquelle für  $\beta$ -Carotin dienen hauptsächlich Karotten (bis zu 60 %), Spinat (bis zu 26 %) und Tomaten (bis zu 13 %).<sup>21</sup>

### 1.3. Isomerisierungsprozess von Lycopin und $\beta$ -Carotin

#### 1.3.1. Theoretische Grundlagen

Die Struktur der Carotinoide ist durch ein ausgedehntes konjugiertes Doppelbindungssystem geprägt. Die übliche Nummerierung der Kohlenstoffatome im Carotinoid-Molekül ist am Beispiel des Lycopins unter Abb. 2 dargestellt. Die Nummerierung der einzelnen Kohlenstoffatome erfolgt stets vom terminalen Ende des Kohlenwasserstoff-Grundgerüsts bis zum C-Atom der zentralen Doppelbindung (C1 – C15), die in der Regel die Spiegelebene des symmetrischen Carotinoid-Rückgrats bildet. Die Benennung der folgenden Atome erfolgt dann in umgekehrter Reihenfolge von C15' bis C1'. Die Nummerierung der verbleibenden Methyl-Substituenten erfolgt ebenfalls von terminal zu zentral liegenden Gruppen (C16 – C20 bzw. C16' – C20'). Anhand dieser Nomenklatur ist eine eindeutige Beschreibung der *cis*-Isomere von Carotinoiden möglich. Erfolgt beispielsweise die Isomerisierung an der Doppelbindung zwischen dem C5- und C6-Atom wird in der Folge vom 5-*cis*-Carotinoid gesprochen. Bereits geringe Aktivierungsenergien führen innerhalb des Polyengrundgerüsts zur Anhebung eines Elektrons vom bindenden  $\pi$ -Orbital in das anti-bindende  $\pi^*$ -Orbital der Doppelbindungen. Über den Rotationsmechanismus kann sich die angeregte Doppelbindung leicht verdrillen, wie in Abb. 3 dargestellt. Beim erneuten Übergang in den Grundzustand kann dies zur Ausbildung von *cis*-Isomeren führen.<sup>1,22</sup>

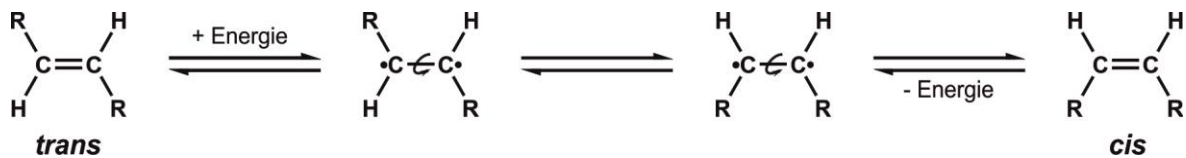
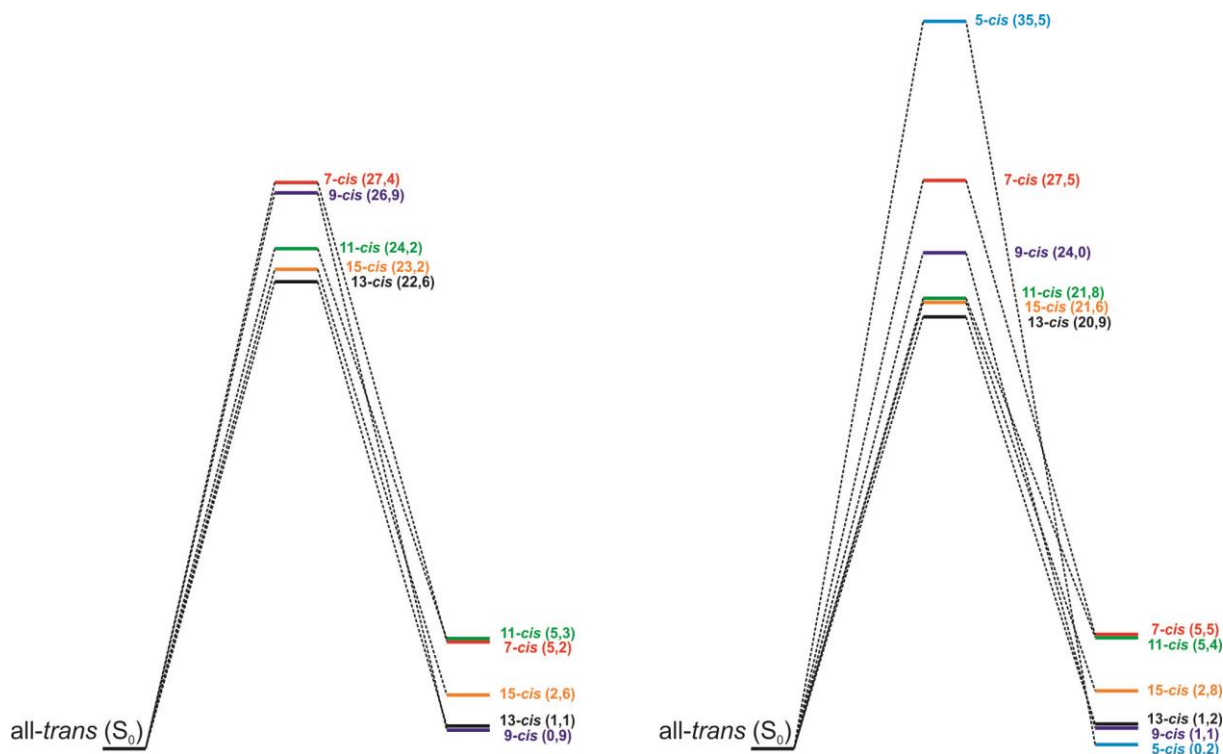


Abb. 3: Rotationsmechanismus zur Ausbildung von *cis*-Isomeren

So können theoretisch an jeder Doppelbindung eines Carotinoids zwei Konfigurationen ausgebildet werden, wobei in der Natur tatsächlich aber nur wenige dieser möglichen Isomere nachgewiesen wurden. Dabei handelt es sich vor allem um mono-*cis*- und einige di-*cis*-Isomere. Die Bildung von *cis*-Isomeren verläuft dabei nicht zufällig, sondern ist abhängig von den benötigten Anregungsenergien und den Stabilitäten der einzelnen Isomere. Diese wurden durch *ab initio* Studien von Chasse et al. und Guo et al. ausführlich beschrieben.<sup>23,24</sup> Demnach besitzen all-*trans*- $\beta$ -Carotin und all-*trans*-Lycopin die niedrigste potentielle Energie. *Cis*-Isomere mit einer Methyl-Gruppe an der betreffenden Doppelbindung (5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis*) sind stets durch niedrigere Energieniveaus im Vergleich zu den nicht methyl-substituierten *cis*-Isomeren (7-*cis*, 11-*cis*, 15-*cis*) gekennzeichnet. Gleichzeitig ist die potentielle Energie umso niedriger, je dezentraler die *cis*-Bindung lokalisiert ist (5-*cis* < 9-*cis* < 13-*cis*). Darüber hinaus ist die Isomerisierung von all-*trans* zu zentralen *cis*-Isomeren durch niedrige Anregungsenergien begünstigt. Die Bildung von 9-*cis*, 7-*cis* oder 5-*cis* im Falle von Lycopin sind wie aus Abb. 4 ersichtlich stark gehindert. 5-*cis*-Lycopin sticht mit einer benötigten Anregungsenergie von 35.2 kcal/mol im Vergleich zu allen anderen Isomeren besonders hervor. Die Stabilitäten von mono-*cis*-Isomeren werden durch die Rotationsbarriere ( $\Delta E_r^\ddagger$ ) beschrieben. Diese gibt an, welche Menge an Energie benötigt wird, um eine Rückreaktion zum *trans*-Isomer zu ermöglichen. Die Rotationsbarriere ergibt sich dabei aus der Differenz der Anregungsenergie zur Bildung von *cis* aus *trans* und der potentiellen Energie des betreffenden Isomers. Daraus ergibt sich folgende Reihenfolge für die Stabilität von *cis*-Isomeren: all-*trans*, 5-*cis*-Lycopin > 9-*cis* > 7-*cis* > 13-*cis* > 15-*cis* > 11-*cis*.<sup>24</sup>

Diese theoretischen Abhandlungen bilden die Grundlage zur Interpretation verschiedenartiger Isomerisierungsprozesse und können die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen hinreichend erklären. Laut Guo et al. stellen die 11-*cis*-Isomere aufgrund der niedrigsten Rotationsbarriere (18,9 kcal/mol für  $\beta$ -Carotin und 16,8 kcal/mol für Lycopin) aller mono-*cis*-Isomere die labilsten Verbindungen innerhalb der Carotinoide dar.<sup>24</sup> Dementsprechend konnte bisher kein experimenteller Nachweis über die Existenz von 11-*cis*-Carotinen erbracht werden.





**Abb. 4: Potentielle-Energie-Diagramme von  $\beta$ -Carotin (links) und Lycopin (rechts) im Grundzustand  $S_0$  (alle angegebenen Energien (kcal/mol) sind auf das all-*trans*-Isomer referenziert) nach Guo et al.<sup>24</sup>**

Neben den in der Natur dominant auftretenden all-*trans*-Carotinoiden sind vor allem 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- und 15-*cis*-Lycopin sowie 9-*cis*-, 13-*cis*- und 15-*cis*- $\beta$ -Carotin von Bedeutung. Wie aus den theoretischen Studien hervorgeht, können diese Verbindungen bereits unter milden, lebensmitteltypischen Bedingungen gebildet werden und besitzen gleichzeitig eine hinreichende Stabilität.<sup>23,24</sup>

### 1.3.2 Thermische Isomerisierung von Lycopin und $\beta$ -Carotin

Generell kann die Anregung und die damit verbundene Isomerisierung thermisch, photochemisch oder chemisch induziert werden. In der Literatur ist vor allem der thermische Isomerisierungsprozess ausführlich beschrieben. Bereits 1970 konnten Sweeney und Marsh zeigen, dass die thermische Behandlung von Lebensmitteln zum Verlust von Carotinoiden führte. Gleichzeitig wiesen sie einen Pro-Vitamin-A-Verlust von 15 – 35 % in behandeltem Gemüse nach und begründeten dies durch die Umwandlung von all-*trans*- $\beta$ -Carotin in *cis*-Isomere.<sup>25</sup> Erst die Entwicklung leistungsfähiger Analyseverfahren erlaubte eine nähere Charakterisierung der entstandenen Strukturen. So identifizierten Tsukida et al. (1982) mittels NMR-Spektroskopie die bis dahin durch Zechmeister et al. (1944) beschriebenen neo- $\beta$ -Carotin B und neo- $\beta$ -Carotin U als 13-*cis*- und 9-*cis*- $\beta$ -Carotin.<sup>26,27,28</sup> Eine ausführliche Beschreibung zur thermischen Isomerisierung gelang Kuki et al. im Jahr 1991.<sup>29</sup> Eine dreißigminütige Erhitzung von all-*trans*- $\beta$ -Carotin bei 80 °C führte hier zur dominanten Bildung des 13-*cis*-Isomers (Isomeren-Anteil ca. 20 %). Die Bildung von 15-*cis* und 9-*cis* (je 5 %) wurde in einem deutlich geringeren Ausmaß beobachtet. Der Isomerisierungsverlauf war durch einen schnellen Anstieg zu Beginn der Inkubation gekennzeichnet, wohingegen im späteren Verlauf für alle Isomeren Gleichgewichtskonzentrationen angestrebt wurden. Der Reiso-merisierungsprozess von *cis*-Isomeren konnte durch diese Studie ebenfalls beschrieben

werden. Die thermische Behandlung von 13-*cis*- $\beta$ -Carotin führte nahezu ausschließlich zur Umwandlung in die all-*trans*-Konfiguration. Ähnliche Ergebnisse zeigte der Umsatz von reinem 15-*cis*- $\beta$ -Carotin, allerdings entstanden hier zusätzlich nennenswerte Mengen an 13-*cis*. Diese Versuche liefern damit die Begründung für die Einstellung der zuvor beobachteten Gleichgewichtskonzentration, da es sich bei der *trans/cis*-Isomerisierung um einen reversiblen Prozess handelt. Interessanterweise wurde das 9-*cis*-Isomer nur in geringen Anteilen zum all-*trans* zurückgeführt.<sup>29</sup> Dies verdeutlicht eine erhöhte Stabilität im Vergleich zu 15- oder 13-*cis* und bestätigt die zuvor beschriebene theoretische Abhandlung.<sup>24</sup> Die Bedeutung von 15-*cis*- und vor allem 13-*cis*- $\beta$ -Carotin für thermische Behandlungen wurde durch weitere Studien belegt.<sup>30-33</sup> Die Entstehung der beiden Strukturen wurde auch bei milden Temperaturen (37 °C) als unvermeidbar eingestuft, auch wenn die Bildung in diesem Fall nur langsam voranschreitet.<sup>32</sup> So wurde beispielsweise ein Isomeren-Anteil von lediglich 3 % 13-*cis*- $\beta$ -Carotin nach 6-tägiger Inkubation bei Raumtemperatur nachgewiesen, wohingegen der Umsatz bei 70 °C bereits nach 5 Minuten in 11 % des Isomers resultierte.<sup>31</sup> Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Bildung von 9-*cis*- $\beta$ -Carotin meist erst nach deutlich längeren Erhitzungsphasen oder bei drastischeren Temperaturbedingungen beobachtet.<sup>33</sup> Durch eine Behandlung bei 110 °C über 90 Minuten zeigten Zeb et al. eine nahezu vollständige Umwandlung der all-*trans*-Konfiguration in das 9-*cis*-Isomer (von 1,7 % auf 69,2 %). Das 13-*cis*-Isomer wurde unter diesen Bedingungen nicht gebildet, wohingegen ein deutlicher Anstieg des 9,13-di-*cis*-Isomers auf einen Anteil von 9,4 % beobachtet wurde.<sup>34</sup>

Im Gegensatz zu  $\beta$ -Carotin wird der thermische Isomerisierungsprozess von Lycopin in der Literatur kontrovers diskutiert. Der zu erwartende thermisch induzierte Abbau von all-*trans*-Lycopin konnte in einigen Studien nicht beobachtet werden. Lee et al. postulierten sogar einen marginalen Anstieg an all-*trans*-Lycopin nach 8-tägiger Behandlung bei 50 °C, wohingegen alle betrachteten *cis*-Isomere (5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis*, 15-*cis*) abgebaut wurden.<sup>35</sup> Diese Ergebnisse wurden zum Teil durch Shi et al. bestätigt. Eine Erhitzung bei 100 °C (6 h) führte lediglich zu einem signifikant erhöhten Gehalt des all-*trans*-Isomers.<sup>36</sup> Interessanterweise konnte aber bei einer milderen Behandlung (60 °C) oder einer stärkeren Erhitzung (120 °C) ein deutlicher Anstieg an *cis*-Isomeren festgestellt werden. Eine nähere Charakterisierung der entstehenden *cis*-Isomere erfolgte während dieser Arbeiten nicht.<sup>36</sup> Andererseits wurden selbst unter sehr milden Bedingungen starke Umsetzungsraten beobachtet. So konnten bereits 16,0 % 13-*cis*-Lycopin nach eintägiger Lagerung (Raumtemperatur) eines all-*trans*-Standards nachgewiesen werden, währenddessen andere Isomere nur in Spuren gebildet wurden.<sup>37</sup> Erst nach 33 Tagen entstanden relevante Mengen an 5-*cis*- (12,2 %) und 9-*cis*-Lycopin (4,2 %). Die Konzentration an 13-*cis* änderte sich während dieser Zeit nur noch geringfügig, sodass sich auch in diesem Fall bereits ein Gleichgewicht eingestellt hatte.<sup>37</sup> Colle et al. bestätigten diese Ergebnisse im Anschluss.<sup>38</sup> Die Bestimmung der Gleichgewichtskonzentrationen der einzelnen Isomere führte zu einer linearen Abhängigkeit von der Temperatur. Demnach wird das Gleichgewicht mit steigenden Temperaturen auf die Seite der *cis*-Isomere verschoben. Beträgt die Gleichgewichtskonzentration des all-*trans*-Isomers bei 80 °C noch 71,5 %, so verschiebt sich der Anteil bei 140 °C auf lediglich 44,8 %. Die Gleichgewichtskonzentrationen der einzeln betrachteten *cis*-Isomere waren im Gegensatz dazu nicht von der Temperatur abhängig. 5-*cis*, 9-*cis* und 13-*cis* strebten stets vergleichbare Gleichgewichtskonzentrationen an. Bemerkenswert ist dabei, dass

5-*cis* und 9-*cis* erst bei Temperaturen ab 100 °C generiert werden konnten, wohingegen 13-*cis*-Lycopin bereits bei 80 °C eine Endkonzentration von etwa 9 % erzielte.<sup>38</sup> Auch Takehara et al. konnten die bevorzugte Bildung von 13-*cis*-Lycopin unter milden Bedingungen (50 °C) bestätigen. Demnach entsprach die Bildungsrate des 13-*cis* nahezu der Abbaurate des eingesetzten all-*trans*-Standards und erreichte bereits nach 10 Stunden sein Maximum. Weitere *cis*-Isomere, wie 9-*cis* oder 5-*cis*, waren auch hier erst im späteren Verlauf von Bedeutung und erreichten nach etwa 144 Stunden ihre Maximalkonzentrationen.<sup>39</sup>

Für Lycopin wurde im Vergleich zu  $\beta$ -Carotin ein ähnlicher Mechanismus während der thermischen Behandlung beobachtet. Vor allem die terminalen Isomere, wie 5-*cis* und 9-*cis*, zeigten über einen Zeitraum von 33 Tagen eine vergleichsweise hohe Stabilität. Die Umwandlung zu all-*trans*-Lycopin erfolgte nur in sehr geringen Anteilen (etwa 10 %). Im Gegensatz dazu war das 13-*cis*-Isomer durch eine deutlich geringere Stabilität gekennzeichnet. Bereits nach zwei Tagen Lagerung bei Raumtemperatur wurde eine Isomeren-Reinheit von lediglich 49,2 % bestimmt. Nach 33 Tagen konnten nur noch 25,4 % 13-*cis* nachgewiesen werden, wohingegen 50,5 % in all-*trans*-Konfiguration vorlagen.<sup>37</sup> Gleichzeitig konnte innerhalb dieser Studie gezeigt werden, dass der Isomerisierungsprozess stark lösungsmittelabhängig ist. Vor allem Dichlormethan führte zu einem deutlich höheren Isomerisierungsgrad im Vergleich zu *n*-Hexan oder Diethylether. Des Weiteren führt der Einsatz verschiedener Lösungsmittel zu unterschiedlichen Isomeren-Mustern. Beispielsweise konnte eine bevorzugte Bildung von 5-*cis*- und 9-*cis*-Lycopin in Dichlormethan beobachtet werden, wohingegen in Diethylether und *n*-Hexan vor allem 13-*cis* gebildet wurde.<sup>37</sup>

Unter Berücksichtigung der theoretischen und experimentellen Studien können die zentralen *cis*-Isomere als kinetisch kontrollierte Reaktionsprodukte angesehen werden, da sie vor allem zu Beginn der thermischen Behandlung in großem Umfang gebildet werden. Die vergleichsweise niedrigen Aktivierungsenergien belegen diese Kinetik. Erst bei deutlich längeren oder drastischeren Reaktionsbedingungen werden energetisch gehinderte Isomere, wie das 5-*cis* oder 9-*cis*, ausgebildet und stellen dann die dominant gebildeten Reaktionsprodukte dar. Es handelt sich somit um die thermodynamisch kontrollierten Produkte.<sup>24</sup>

Zusammenfassend lassen sich die 15-*cis*- und vor allem die 13-*cis*-Isomere als die wichtigsten Strukturen im thermisch induzierten Isomerisierungsprozess von  $\beta$ -Carotin und Lycopin identifizieren. Darüber hinaus findet auch 9-*cis*- $\beta$ -Carotin in der Literatur Erwähnung, allerdings wird dieses nur in geringem Ausmaß oder erst bei deutlich erhöhten Temperaturen gebildet. Vergleichbare Ergebnisse werden für 9-*cis*- und 5-*cis*-Lycopin beschrieben, da auch hier die Bildung der endständigen *cis*-Isomere energetisch gehindert ist.

Insgesamt sind die umfangreichen Ergebnisse zur thermisch induzierten Isomerisierung von Carotinoiden nur bedingt vergleichbar, da der Prozess von sehr vielen Parametern (Wahl der Temperatur, Lösungsmittel, Anwesenheit von Sauerstoff oder Licht) abhängig ist und keine einheitlichen Modellsysteme existieren. Dies liefert eine mögliche Erklärung für die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse innerhalb der aktuellen Literatur. Gleichzeitig stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage nach der Übertragbarkeit auf komplexe Matrizes, wie Lebensmittel oder lebende Organismen.

In der Literatur existiert eine Vielzahl an Studien, die sich mit der thermisch induzierten Isomerisierung von Carotinoiden im Lebensmittel beschäftigen. Tab. 1 stellt eine Übersicht über ausgewählte Ergebnisse zum Isomerisierungsgrad von frischen und thermisch behandelten Lebensmitteln dar.

**Tab. 1: Übersicht zur Isomerenzusammensetzung in frischen und thermisch behandelten Lebensmitteln**

Lebensmittel	Anteile an $\beta$ -Carotin in %				Anteile an Lycopin in %				
	all-trans	9-cis	13-cis	15-cis	all-trans	5-cis	9-cis	13-cis	15-cis
Brokkoli <sup>a</sup>									
frisch	70,5	12,1	8,0	4,8					
gekocht	70,2	13,3	8,1	4,2					
Kohl <sup>a</sup>									
frisch	75,0	12,2	5,7	3,1					
konserviert	56,0	31,4	4,6	2,2					
Spinat									
frisch <sup>a</sup>	78,5	9,7	6,2	-					
konserviert <sup>a</sup>	65,5	20,5	6,0	3,1					
konserviert <sup>b</sup>	58,4	26,3	15,3						
Pfirsich <sup>a</sup>									
frisch	73,3	10,0	16,7	-					
konserviert	60,0	13,3	26,7	-					
Tomate									
frisch <sup>a</sup>	87,0	5,9	7,1	-					
konserviert <sup>a</sup>	68,8	7,7	16,8	6,7					
konserviert <sup>b</sup>	53,0	8,2	38,8	-					
Süßkartoffel <sup>b</sup>									
frisch	100,0	0,0	0,0						
konserviert	75,4	8,9	15,7						
Kürbis <sup>b</sup>									
frisch	75,0	9,7	15,3						
konserviert	66,6	11,4	22,0						
Karotte <sup>b</sup>									
frisch	100,0	0,0	0,0						
konserviert	72,8	8,1	19,1						
Karottensaft <sup>c</sup>									
unbehandelt	100,0	-	0,0						
pasteurisiert	91,9	-	7,7						
sterilisiert	86,6	2,2	11,7						
Tomate <sup>d</sup>									
frisch					89,0	7,0		$\Sigma$ x-cis: 4,1	
erhitzt					84,0	5,9		$\Sigma$ x-cis: 10,1	
Tomatenmark <sup>e</sup>									
unbehandelt					85,4	4,7	2,8	2,0	5,1*
pasteurisiert <sup>1</sup>					73,2	5,5	4,7	10,2	6,4*
sterilisiert T <sup>2</sup>					52,9	3,6	18,3	10,8	14,3*
sterilisiert HP <sup>3</sup>					81,5	5,1	3,1	4,3	5,9*
Bolognese Sauce <sup>f</sup>									
unbehandelt					67	14	6		5
erhitzt (10 min)					60	14	8		7

<sup>a</sup> nach Lessin et al. (1997)<sup>40</sup>, <sup>b</sup> Chandler et al. (1987)<sup>41</sup>, <sup>c</sup> Marx (2003)<sup>42</sup>, <sup>d</sup> Colle (2010)<sup>38</sup>, <sup>e</sup> Knockaert (2012)<sup>43</sup>, <sup>f</sup> Schierle (1996)<sup>44</sup>, - nicht detektiert, pasteurisiert (100 °C, 30 min), sterilisiert (100 °C, 30 min), erhitzt (140 °C, 30 min), \* andere cis, <sup>1</sup> intensive thermische Pasteurisierung, <sup>2</sup> thermische Sterilisation F<sub>0</sub> = 1,5 min, <sup>3</sup> Hochdrucksterilisation F<sub>0</sub> = 1,5 min

Unter Betrachtung dieser Ergebnisse kann man feststellen, dass der Einfluss einer thermischen Behandlung von Lebensmitteln auf die Carotinoid-Isomerenzusammensetzung ausführlich untersucht wurde. Im Allgemeinen konnten die Beobachtungen aus der thermischen Isomerisierung von einfachen Standardlösungen auf komplexe Lebensmittelmatrizes übertragen werden. Unabhängig von der Art der Behandlung oder der Art des Lebensmittels kann während der thermischen Behandlung bei nahezu allen Studien eine Abnahme der all-trans-Isomere beobachtet werden. Dabei findet auf Seiten des  $\beta$ -Carotins

eine bevorzugte Umwandlung zum 13-*cis*-Isomer statt. Gleichzeitig konnte stets ein signifikanter Anstieg der 9-*cis*- $\beta$ -Carotin-Konzentration festgestellt werden. Allerdings wurde dieses Isomer meist nur in deutlich geringeren Mengen im Vergleich zum 13-*cis* ausgebildet. Damit konnten die erwarteten Beobachtungen aus den Modellversuchen bestätigt werden. Inwieweit 15-*cis*- $\beta$ -Carotin als möglicher Marker für eine thermische Behandlung angesehen werden kann, ist anhand der aktuellen Literatur nur bedingt möglich, da dieses Isomers nur in wenigen Studien in die Betrachtungen mit einbezogen wurde.

Für Lycopin können derart charakteristische Marker für eine thermische Erhitzung von Lebensmittel nicht ohne weiteres identifiziert werden. Oft werden bei Studien lediglich die Gesamtgehalte oder die Summe an *cis*-Lycopin-Isomeren betrachtet, wodurch keine klaren Trends im Isomerisierungsverhalten abgeleitet werden können. Beispielsweise beobachteten Shi et al. einen Anstieg von *cis*-Lycopin-Isomeren von 26,4 % auf 32,8 % während einer 6-stündiger Erhitzung (60 °C) von Tomatenmark, ohne jedoch die Isomere einzeln zu bestimmen.<sup>36</sup> Gleichzeitig wird der Isomerisierungsverlauf wie bereits erwähnt sehr stark von der Art der thermischen Behandlung beeinflusst. Vergleichsweise milde Behandlungsverfahren, wie beispielsweise die thermische Pasteurisierung, führten bevorzugt zur Bildung von 13-*cis*-Lycopin, aber auch zu signifikanten Mengen an 9-*cis*.<sup>42-44</sup> Beim thermischen Sterilisierungsprozess kehrten sich die Verhältnisse der beiden Isomere um. Hier stellte nun das 9-*cis*-Lycopin mit einem Anteil von 18,3 % das dominante *cis*-Isomer dar. Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von Hochdruck-Behandlungen zu einem stark abgeschwächten Isomerisierungsprozess, wobei lediglich 5-*cis*-Lycopin gesteigerte Bildungsraten im Vergleich zu den rein thermischen Verfahren zeigte.<sup>43</sup>

Auch hier ist eine direkte Vergleichbarkeit der in der Literatur bestimmten Ergebnisse aufgrund der Variabilität innerhalb der Behandlungsverfahren oder aber auch in Abhängigkeit der betreffenden Lebensmittelmatrix nur bedingt möglich. Zusammenfassend können trotzdem vor allem 13-*cis*- und 9-*cis*-Lycopin als Marker für eine thermische Belastung in Lebensmitteln angesehen werden. Das energetisch gehinderte 5-*cis*-Lycopin spielt bei den üblichen Behandlungsverfahren eine eher untergeordnete Rolle und wird anscheinend nur in Gegenwart von hohen Drücken gebildet.

### 1.3.3 Photochemische Isomerisierung von Lycopin und $\beta$ -Carotin

Die photochemisch induzierte Isomerisierung von Carotinoiden ist im Vergleich zum thermischen Prozess in deutlich geringerem Umfang untersucht und ist gleichzeitig von nahezu keiner praktischen Relevanz. Da wiederum keine einheitlichen Modellsysteme verwendet wurden, existieren bisher keine vergleichbaren Ergebnisse, wodurch der Isomerisierungsprozess aktuell sehr widersprüchlich diskutiert wird. Die umfangreichsten Studien zur Beschreibung der photochemisch-induzierten Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin erfolgten durch Kuki et al. Dabei wurde bei der Bestrahlung von all-*trans*- $\beta$ -Carotin hauptsächlich das 13-*cis*-Isomer gebildet, wohingegen 9-*cis* und 15-*cis* in geringerem Umfang generiert wurden. Dabei führte die Bestrahlung mit unterschiedlichen Wellenlängen (337 nm oder 488 nm) zu vergleichbaren Isomerenmustern, wobei alle Bildungsraten einem linearen Verlauf unterlagen. Im Gegensatz zur thermischen Isomerisierung wurden dementsprechend keine Gleichgewichtskonzentrationen beobachtet.<sup>29</sup> Des Weiteren wurde der

Isomerisierungsprozess der *cis*-Isomere untersucht, wobei die Bestrahlung mit unterschiedlichen Wellenlängen zu Veränderungen im Isomerenmuster führte. Beispielsweise wurde 13-*cis*- $\beta$ -Carotin nach Anregung bei 488 nm ausschließlich in die all-*trans*-Konfiguration überführt, wohingegen eine Bestrahlung bei 337 nm zusätzlich zu einer Bildung von 9-*cis*- $\beta$ -Carotin führte.<sup>29</sup> Weitere Studien bestätigen die Bedeutung von 13-*cis*- und 9-*cis*- $\beta$ -Carotin für die photochemisch induzierte Isomerisierung.<sup>45,46</sup> In diesem Fall wurde während der Bestrahlung das 9-*cis*- $\beta$ -Carotin als dominantes Isomer identifiziert, wohingegen 13-*cis* eine geringe Photostabilität zeigte.<sup>30</sup> Der Anteil an 9-*cis*- $\beta$ -Carotin stieg beispielsweise während einer 2-tägigen Lichtexposition von 1,5 % auf 5,1 % an, während sich der 13-*cis*-Anteil lediglich verdoppelte (von 3,0 % auf 6,5 %) und schließlich eine Gleichgewichtskonzentration erreichte.<sup>46</sup> Andere Studien widersprechen diesen Ergebnissen wiederum, da zum Teil keine signifikanten Änderungen während der lichtinduzierten Isomerisierung festgestellt wurden.<sup>31,33,47</sup> Aman et al. beobachteten lediglich geringfügige Anstiege der 9-*cis*- und 13-*cis*- $\beta$ -Carotin-Konzentrationen während der Bestrahlung einer all-*trans*-Standardlösung. Erst in Gegenwart von Sensibilisatoren, wie Chlorophyll, wurde ein signifikanter Anstieg an 9-*cis*- $\beta$ -Carotin beobachtet, wobei Gleichgewichtskonzentrationen von etwa 22 % erreicht wurden.<sup>33</sup>

Im Fall von Lycopin existieren nur wenige Studien, die den photochemischen Isomerisierungsprozess umfangreich beschreiben. Gleichzeitig führen die Studien im Allgemeinen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen, die eine einheitliche Bewertung der ablaufenden Prozesse nicht zulassen. Während einer 12-tägigen Belichtung von Tomatenmark beobachteten Shi et al. keine signifikante Änderung der Konzentration an all-*trans*-Lycopin, wohingegen die *cis*-Isomeren-Gehalte von 4,00 auf 2,80 mg/100g reduziert wurden. Im Ergebnis wurde damit den *cis*-Isomeren im Vergleich zur all-*trans*-Form eine geringere Stabilität gegenüber Licht zugesprochen.<sup>36</sup> Untersuchungen von Lee et al. widerlegen diese Ergebnisse, hier wurde nach 144 Stunden Bestrahlung ein starker Abbau von all-*trans*-Lycopin (-13,1 %) nachgewiesen. Dabei resultierte die Isomerisierung hauptsächlich in 13-*cis*-Lycopin (+5,3 %), während 15-*cis*, 9-*cis* und 5-*cis* in geringerem Ausmaß (zwischen 0,5 % und 1,5 %) gebildet wurden.<sup>35</sup> Nähere Beschreibungen zum detaillierten Isomerisierungsprozess sind in der aktuellen Literatur nicht vorhanden. Andere Studien beschreiben oftmals die Bildung von *cis*-Isomeren als Summenparameter und liefern so nur wenig Information zu spezifischen Reaktionsabläufen. Chen et al. beobachteten beispielsweise während der Bestrahlung von all-*trans*-Lycopin einen schnellen Anstieg der *cis*-Isomeren-Konzentration. Eine Bestrahlungsdauer von mehr als 24 Stunden führte allerdings zu einem vollständigen Abbau der *cis*-Isomeren, sodass diese erneut mit einer reduzierten Stabilität gegenüber Licht charakterisiert wurden.<sup>48</sup> Im Gegensatz dazu beobachteten Calvo et al. eine hinreichende Stabilität der *cis*-Isomere, hier strebten die gebildeten Strukturen nach 19 Tagen Lagerung sogar eine Gleichgewichtskonzentration an. Als mengenmäßig bedeutsamstes *cis*-Isomer wurde in diesem Fall vermutlich das stabile 5-*cis*-Lycopin identifiziert.<sup>49</sup> Eine gesicherte Beschreibung des gebildeten Isomers war innerhalb der beschriebenen Studie aufgrund von fehlendem Referenzmaterial nicht möglich, sodass die Zuordnung lediglich auf der Retentionsfolge basierte.<sup>49</sup> Prinzipiell ist die fehlende Betrachtung der gewählten Lichtquellen als mangelhaft zu betrachten, da wie bereits während der thermischen Isomerisierung oder in den theoretischen Studien von Guo et al. beschrieben, die eingesetzte Energiemenge einen

entscheidenden Einfluss auf den Isomerisierungsverlauf nimmt.<sup>24</sup> Dementsprechend wurden vor allem für Lycopin extrem unterschiedliche Eigenschaften gegenüber der Reaktion mit Licht publiziert.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist die photochemische Isomerisierung von nahezu keiner praktischen Relevanz. Pott et al. konnten zwar erhöhte Gehalte an 9-*cis*- $\beta$ -Carotin in sonnengetrockneten Mangos nachweisen, allerdings fehlten in dieser Studie authentische Vergleichsdaten innerhalb einer Varietät.<sup>45</sup> So wurde in der Varietät *Kaew* ein deutlich erhöhter Gehalt an 9-*cis*- $\beta$ -Carotin (2050  $\mu\text{g}/100\text{g TM}$ ) im Vergleich zur frischen Mango (1010  $\mu\text{g}/100\text{g TM}$ ) nachgewiesen, allerdings wurde der Einfluss einer konventionellen Trocknung nicht betrachtet, obwohl die Untersuchung einer weiteren Varietät (*Kent*) zeigte, dass auch das thermische Verfahren zur Bildung von 9-*cis*- $\beta$ -Carotin führte. Eine Differenzierung der Behandlungsverfahren ist somit nur bedingt möglich, da zusätzlich eine starke Sortenabhängigkeit festgestellt wurde.<sup>45</sup> Kuti et al. untersuchten unter anderem den Einfluss der Anbaubedingungen auf den Lycopin-Gehalt, sowie die Isomerenzusammensetzung in verschiedenen Tomaten-Genotypen.<sup>50</sup>

**Tab. 2: Lycopin-Gehalte und Isomerenzusammensetzung von Tomaten nach Kuti et al.<sup>50</sup>**

Varietät	Gehalt (mg/kg FG)	Gewächshaus		Gehalt (mg/kg FG)	Freiland	
		<i>cis</i> -Isomeren Anteil (%)	all- <i>trans</i> Anteil (%)		<i>cis</i> -Isomeren Anteil (%)	all- <i>trans</i> Anteil (%)
Better Boy	19,9	13,07	86,93	14,0	24,29	75,71
Monte Carlo	8,3	25,00	75,00	6,1	39,34	60,66
Druzba	29,7	13,13	86,87	23,6	11,86	88,14
Husky Red	33,6	10,42	89,58	10,8	23,15	76,85
Polish Giant	9,7	18,56	81,44	5,3	24,53	75,47
GS-114	33,3	13,81	86,19	12,6	36,51	63,49
TMT-521	35,4	14,69	85,31	21,6	38,89	61,11
Sun Cherry	57,3	11,13	88,87	82,5	1,45	98,55
Sugar Lump	63,6	4,25	95,75	116,7	6,17	93,83

Prinzipiell zeigte sich eine starke Variabilität der Isomerenzusammensetzung und der Lycopin-Gehalte zwischen den verschiedenen Sorten (Tab. 2). Beispielsweise schwankte der *cis*-Isomeren-Anteil innerhalb der runden Tomatenvarietäten unter Gewächshausbedingungen zwischen 8,33 und 35,71 %. Nichtsdestotrotz wurden deutliche Tendenzen im Vergleich der Anbaubedingungen festgestellt. Dabei zeigten Tomaten die unter Freilandbedingungen angebaut wurden in der Regel einen höheren Isomerisierungsgrad im Vergleich zu Tomaten der gleichen Varietät die im Gewächshaus kultiviert wurden. Lediglich bei 11 der 39 (28 % der Proben) untersuchten Sorten zeigten die Gewächshhaustomaten erhöhte *cis*-Isomeren-Anteile, wie in Tab. 2 an den Varietäten Druzba und Sun Cherry zu erkennen ist.<sup>50</sup> Im Ergebnis wurde den Anbaubedingungen und dem Genotyp ein starker Einfluss auf den Lycopin-Gehalt zugesprochen.<sup>50</sup> Gleichzeitig unterstreicht diese Studie den Einfluss unterschiedlicher Lichtregime auf den Isomerisierungsgrad von Carotinoiden. Eine klare Differenzierung der Anbaubedingungen war allerdings nicht möglich, da pro Varietät nur wenige Proben ( $n = 3$ ) untersucht wurden, was zum Teil in sehr großen Standardabweichungen resultierte. Mögliche Unterschiede im *cis*-Isomerenmuster wurden in dieser Studie nicht genauer betrachtet, da vor allem die Unterscheidung verschiedener Genotypen im Fokus der Untersuchungen stand.

Insgesamt betrachtet wurde die photochemische Isomerisierung von Carotinoiden bisher wenig einheitlich beschrieben und ermöglicht so keine klaren Aussagen zum Isomerisierungsverhalten unter verschiedenen Lichtbedingungen. Aufgrund dieser Sachlage existiert bis heute keine echte praktische Relevanz, obwohl einige Studien die Eignung der Isomeren-Analyse zur Differenzierung von Anbaubedingungen oder industriellen Behandlungsverfahren andeuten.

### 1.3.4 Chemische Isomerisierung von Lycopin und $\beta$ -Carotin

Carotinoide sind allgemein dafür bekannt gegen reaktive Sauerstoffspezies oder freie Radikale zu wirken und so den Organismus gegenüber oxidativem Stress zu schützen.<sup>51-55</sup> Carotinoide sind dementsprechend in der Lage derartige Spezies zu inaktivieren. Dieser sogenannte Quenching-Effekt kann dabei über zwei verschiedene Mechanismen verlaufen.<sup>56</sup> Beispielsweise führt die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit Carotinoiden zu einem Energietransfer, wodurch das Sauerstoff-Molekül in den Triplett-Grundzustand überführt wird.<sup>3</sup> Gleichzeitig kommt es zur Anregung des Carotinoid-Moleküls, das die aufgenommene Energie schnell an die Umgebung abgeben kann und so selbst wieder in den Grundzustand gelangt. Beim Übergang in den Grundzustand wird die zuvor aufgenommene Energie meist in Form von Wärme wieder abgegeben.<sup>3,57</sup> Gleichzeitig kann dieser Übergang auch mit einer Isomerisierung des Carotinoids verbunden sein.<sup>58</sup> Dieser Reaktionsmechanismus wird als physikalisches Quenching bezeichnet.<sup>3</sup> Einen zweiten Reaktionsmechanismus stellt das chemische Quenching (Scavenging) dar.<sup>56</sup> Dabei handelt es sich um chemische Reaktionen zwischen dem Carotinoid und den reaktiven Spezies, was üblicherweise zum oxidativen Abbau des Quenchers führt.<sup>56</sup>

In der Literatur wird vor allem das Quenching von Singulett-Sauerstoff durch verschiedene Carotinoide beschrieben. Die Inaktivierung der reaktiven Sauerstoff-Spezies erfolgt dabei nahezu ausschließlich über das physikalische Quenching, wohingegen der Anteil einer chemischen Reaktion bei lediglich 0,05 % liegt.<sup>59</sup> Umso erstaunlicher ist, dass keine Studien existieren, die den Singulett-Sauerstoff induzierten Isomerisierungsprozess von Carotinoiden hinreichend beschreiben. Laut Foote et al. führte die Umsetzung von 15-*cis*- $\beta$ -Carotin mit Singulett-Sauerstoff zu einer nahezu vollständigen Umwandlung in die all-*trans*-Konfiguration.<sup>58</sup> Vergleichbare Ergebnisse publizierten Manitto et al. Dabei wurde 13-*cis*-Crocetin, ein Ester der C20-Dicarbonsäure Crocetin, ebenfalls effektiv in die all-*trans*-Form überführt.<sup>60</sup> Weitere Studien zur chemischen Isomerisierung sind in der aktuellen Literatur nicht vorhanden, da oftmals die Quenching-Reaktion unter Wärmeabgabe ohne Veränderung des Carotinoids zugrunde gelegt wird. Zudem stehen in vielen Publikationen die antioxidativen Kapazitäten bzw. die Quenching-Kapazität einzelner Carotinoide im Fokus der Arbeiten. Prinzipiell stellt Lycopin den effektivsten Singulett-Sauerstoff-Quencher unter allen natürlichen Carotinoiden dar. Die Kapazität übertrifft die von  $\beta$ -Carotin um etwa das Doppelte und die von  $\alpha$ -Tocopherol um den Faktor 100.<sup>61,62</sup> Damit besitzt Lycopin die Fähigkeit, andere oxidierte Carotinoide zu regenerieren und parallel dazu selbst oxidiert zu werden.<sup>57</sup>



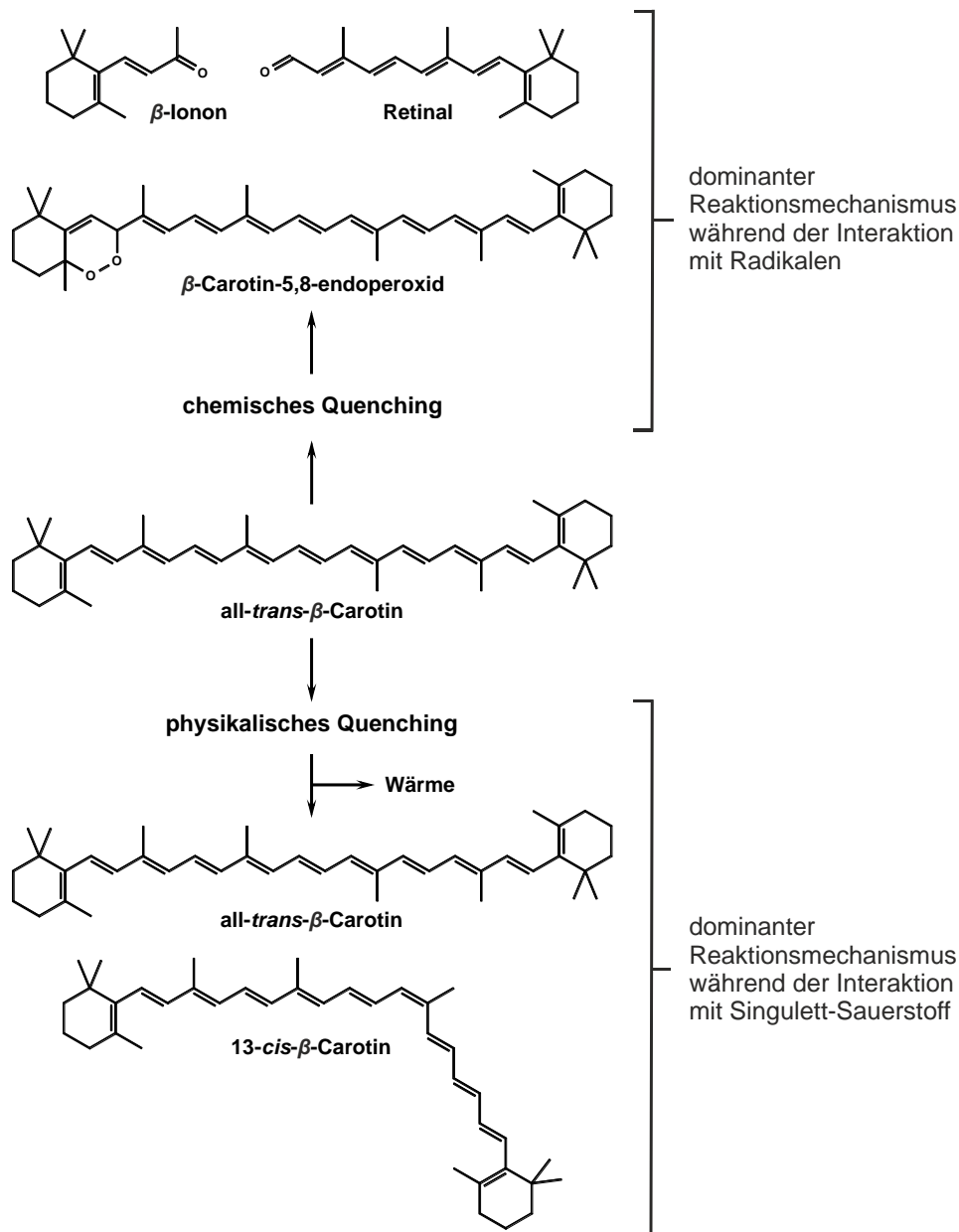


Abb. 5: Schematische Darstellung zur Quenching-Reaktion von  $\beta$ -Carotin mit reaktiven Spezies

Während das physikalische Quenching von Carotinoiden in der Literatur kaum Betrachtung findet, existieren im Gegensatz dazu zahlreiche Studien, die sich mit dem chemischen Quenching von Singulett-Sauerstoff und Carotinoiden beschäftigen.<sup>56</sup> Allerdings wurden auch hier durch *in vitro* Modelle nur wenige charakteristische Reaktionsprodukte für einen Singulett-Sauerstoff induzierten Abbau von Carotinoiden identifiziert. Demzufolge wurden auch *in vivo* nur wenige Carotinoid-Abbaustrukturen nachgewiesen. Dabei handelte es sich vor allem um Oxidationsprodukte, die entweder aus einer enzymatischen Spaltung oder aus Reaktionen mit Radikalen resultieren.<sup>63–67</sup> Theoretisch kann allerdings jede Doppelbindung des Carotinoid-Grundgerüsts durch Singulett-Sauerstoff direkt angegriffen werden, wodurch eine Vielzahl an Aldehyden und Ketonen entstehen kann.<sup>68,69</sup> Stratton et al. wiesen durch *in vitro* Modelle (photo-sensibilisierte Oxidation mittels Bengalrot) die Bildung von  $\beta$ -Apo-8'-,  $\beta$ -Apo-10'- und  $\beta$ -Apo-14'-Carotinal nach.<sup>68</sup> Andere Studien belegten die Bildung von Endoperoxiden, Epoxiden, und Lactonen, zu denen auch einige flüchtige Oxidationsprodukte

zählen, die somit auch an der Aromaausbildung von verschiedenen Lebensmitteln beteiligt sein können (siehe Abb. 6).<sup>69–71</sup> Unter all diesen Strukturen zählt das  $\beta$ -Carotin-5,8-endoperoxid als die quantitativ bedeutsamste Verbindung, die bei der photo-sensibilisierten Oxidation von  $\beta$ -Carotin durch Singulett-Sauerstoff entstehen kann (Abb. 5).<sup>68,72</sup> Eine Bildung über enzymatische Prozesse oder Reaktionen mit freien Radikalen ist dagegen ausgeschlossen, sodass der Nachweis dieser Endoperoxide als spezifischer Marker für die Anwesenheit von Singulett-Sauerstoff angesehen werden kann.<sup>4</sup> Einige dieser Abbauprodukte, unter anderem das spezifische  $\beta$ -Carotin-5,8-endoperoxid, wurden bereits in verschiedenen tierischen und menschlichen Geweben aber auch in Pflanzen nachgewiesen.<sup>56,63–65</sup> Einige dieser Metaboliten erfüllen sogar wichtige Funktionen im Photosynthese-Apparat von höheren Pflanzen und können als Signalstoffe wirken. Beispielsweise induzierte die stressbedingte Bildung von  $\beta$ -Cyclocitral eine verstärkte Genexpression der Singulett-Sauerstoff-Antwort, wodurch eine gesteigerte Toleranz gegenüber photo-oxidativem Stress erzielt wurde.<sup>4</sup>

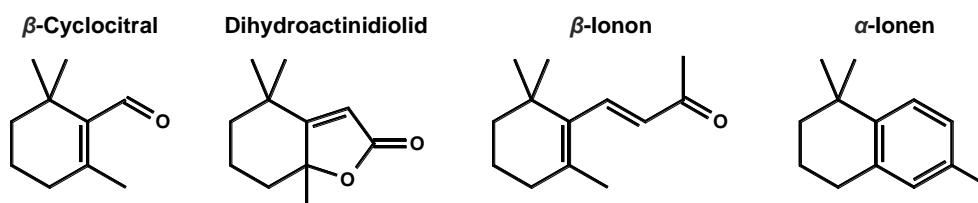
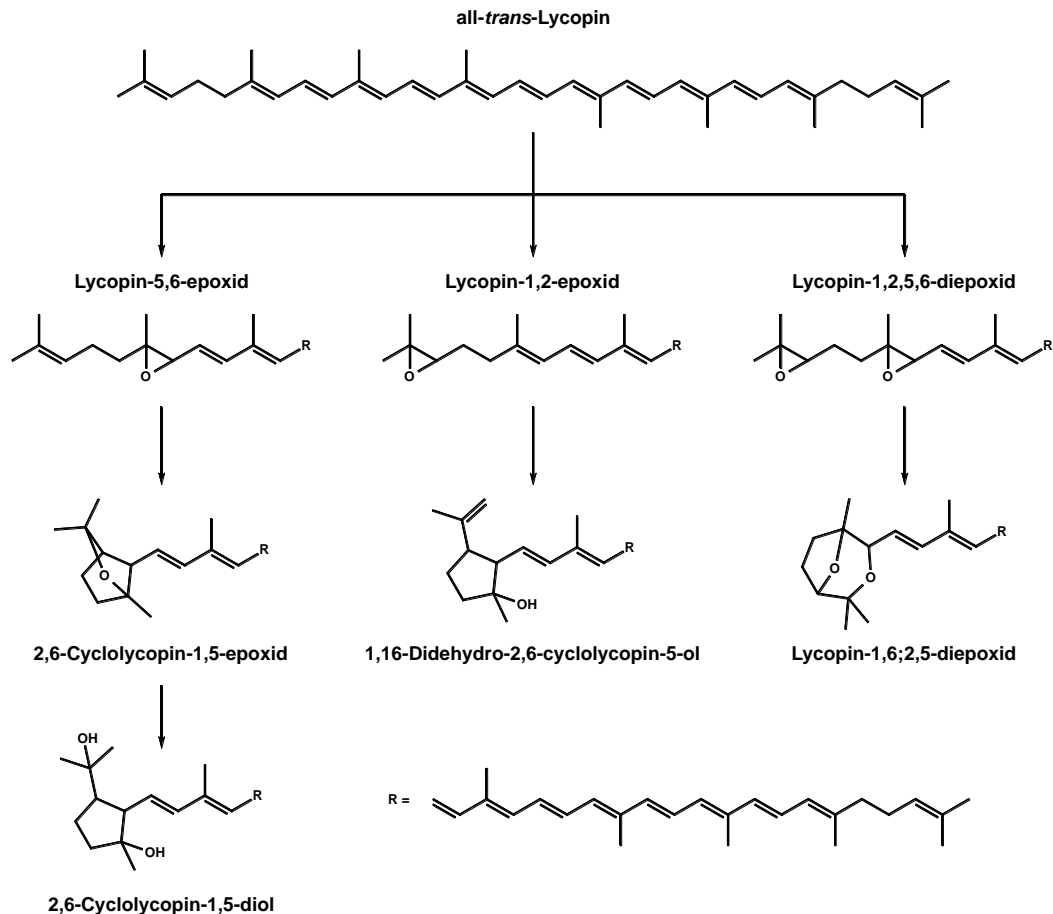


Abb. 6: flüchtige Reaktionsprodukte aus der Oxidation von  $\beta$ -Carotin

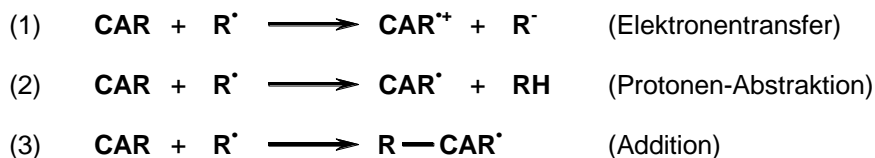
Strukturell vergleichbare Oxidationsprodukte wurden auch für den Abbau von Lycopin beobachtet. Durch Modellversuche mit Kaliumpermanganat wurde jede Doppelbindung im Lycopin-Grundgerüst oxidiert, sodass insgesamt 11 Apo-Lycopin-Aldehyde bzw. Apo-Lycopin-Ketone nachgewiesen wurden.<sup>73,74</sup> Darüber hinaus erfolgte in einer Studie von Caris-Veyrat et al. der Nachweis von mehreren Apo-Lycopin-Dialdehyden mit Kettenlängen zwischen 15 und 24 Kohlenstoff-Atomen.<sup>74</sup> Während der Oxidation von Lycopin mit MCPBA (*m*-Chlorperbenzoesäure) wurden dagegen das Lycopin-1,2-epoxid und das Lycopin-5,6-epoxid als Hauptprodukte identifiziert.<sup>73,75</sup> Diese beiden Epoxide und daraus resultierende Folgeprodukte, wie z.B. das 5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrolycopin, wurden im Anschluss in Tomatenmark und -saft nachgewiesen.<sup>76,77</sup> Im menschlichen Organismus wurden im Gegensatz dazu die beiden Diastereomere des 2,6-Cyclolycopin-1,5-diols in Serum und Milch identifiziert.<sup>19</sup> Diese Strukturen stammen aus einer Umlagerung des zuvor beschriebenen 5,6-Epoxids, da dieses extrem anfällig gegenüber Säuren ist.<sup>78</sup> Aufgrund der allgemeinen Labilität der Lycopin-Epoxide scheint ein Nachweis der *in vitro* dominant gebildeten Strukturen sehr unwahrscheinlich, da *in vivo* eine sofortige Umlagerung und Ringöffnung zu erwarten ist (Abb. 7).<sup>78</sup>

Insgesamt betrachtet wurden bisher erst wenige Lycopin-Metabolite *in vivo* nachgewiesen. Dieser Aspekt führt gleichermaßen zu einer uneinheitlichen und kritischen Diskussion zur Bioaktivität der oxidativ gebildeten Strukturen.<sup>14,15</sup>



**Abb. 7: In biologischen Systemen nachweisbare Reaktionsprodukte aus der Oxidation von Lycopin** <sup>78</sup>

Neben der Fähigkeit angeregte Zustände zu inaktivieren sind Carotinoide ebenfalls in der Lage mit freien Radikalen zu reagieren. Während bei der Reaktion mit Singulett-Sauerstoff lediglich ein Energietransfer (physikalisches Quenching) stattfindet, dominiert beim Umsatz mit freien Radikalen das chemische Quenching, wodurch die Carotinoide direkt einer strukturellen Veränderung unterliegen. Prinzipiell werden für diesen Prozess drei grundlegende Reaktionsmechanismen beschrieben (Abb. 8).<sup>57,79</sup>



**Abb. 8: Mögliche Reaktionsmechanismen bei der Reaktion von (oxidierenden) freien Radikalen (R<sup>•</sup>) und Carotinoiden (CAR)**<sup>57</sup>

Ein Elektronentransfer (Abb. 8 (1)) findet immer dann statt, wenn das Reduktionspotential des Radikals stärker oxidierend wirkt als die des entstandenen Carotinoid-Radikalkations selbst. Dieser Mechanismus wurde in der Literatur am häufigsten untersucht und wird unter anderem durch Stickstoffdioxid-, Peroxyl- und Sulfonyl-Radikale ausgelöst.<sup>57</sup> Andere Studien belegten die Bildung von Carotinoid-Radikal-Addukten, wobei vor allem schwefelhaltige oder auch Peroxyl-Radikale von Bedeutung sind.<sup>53,57</sup> Die Abspaltung und Übertragung von Protonen (Abb. 8 (2)) wurden vor allem bei der Reaktion mit Hydroxyl-Radikalen

beobachtet.<sup>57</sup> Aus Abb. 8 geht ebenfalls hervor, dass die entstandenen Carotinoid-Strukturen anfällig für Folgereaktionen sind, was in Anwesenheit von Sauerstoff oder anderen Radikalen zum Abbau oder zur Funktionalisierung der Antioxidantien führt. Demzufolge reagierten die durch Elektronentransfer gebildeten Carotinoid-Radikalkationen in Gegenwart von Sauerstoff direkt zu den entsprechenden 5,8-Peroxiden weiter.<sup>80</sup> In wässrigen Systemen wurde außerdem die Abgabe von Protonen beobachtet (Mechanismus (2)), sodass neutrale Carotinoid-Radikale einen weiteren Ausgangspunkt für verschiedenartige Folgeprodukte darstellen.<sup>81</sup> In Folge dessen gelang Gao et al. der Nachweis eines Carotinoid-Didehydromers.<sup>81</sup> Prinzipiell geht das chemische Quenching stets mit einem starken oxidativen Abbau einher. So führte beispielsweise die Umsetzung mit einer 500  $\mu\text{M}$  Hydrochlorid-Lösung zum vollständigen Abbau einer 50  $\mu\text{M}$  Lycopin-Lösung.<sup>82</sup>

Aufgrund der drei möglichen Reaktionsmechanismen und der Vielzahl an verschiedenartigen Radikalspezies gestaltet sich das Spektrum der Carotinoid-Abbauprodukte im Vergleich zum Umsatz mit Singulett-Sauerstoff als deutlich umfangreicher und komplexer.<sup>83</sup> So wurden zum einen wiederum die einfachen Spaltprodukte, wie Aldehyde und Ketone, während des chemischen Quenchings von Radikalen nachgewiesen.<sup>73,74</sup> Darüber hinaus führte z.B. der Einsatz von Hypochloriger Säure zur Bildung von Apo-Lycopinsäuren, wie unter anderem der Acyclo-Retinsäure. Beim Einsatz sehr großer Radikal-Konzentrationen wurde sogar ein Chlor-Addukt des Lycopins ( $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{ClO}_3$ ) identifiziert (Abb. 9, Mitte).<sup>82</sup>

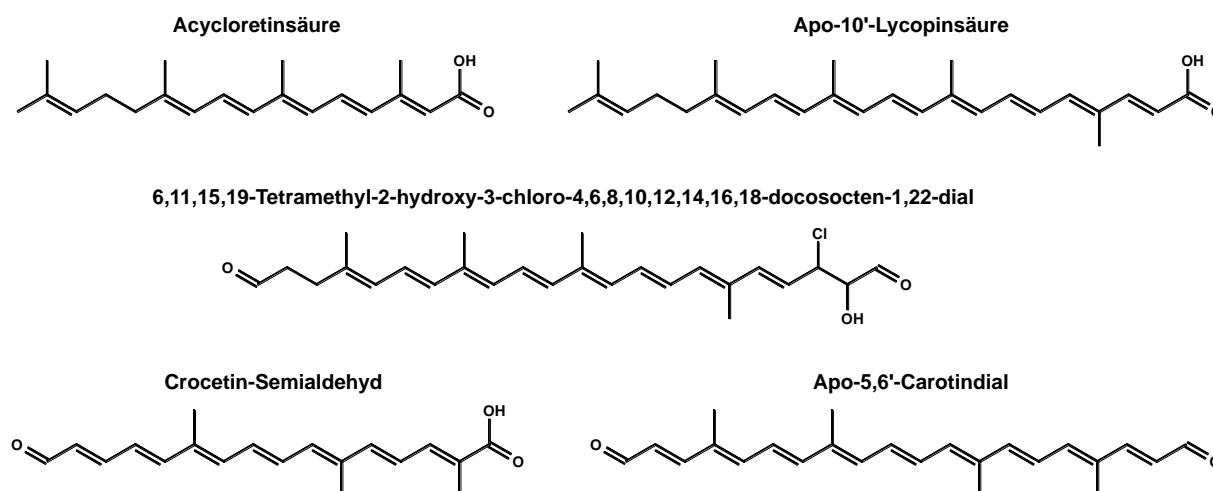


Abb. 9: Mögliche Abbauprodukte aus der Reaktion von Lycopin mit HOCl nach Pennathur et al.<sup>82</sup>

Kennedy et al. untersuchten dagegen die Reaktion von  $\beta$ -Carotin mit Peroxyl-Radikalen, die vor allem während der Autoxidation von Fetten entstehen.<sup>84</sup> Dabei wurde zunächst eine Additionsreaktion beobachtet, wobei das entstehende Radikal ( $\text{ROO-CAR}^*$ ) über das gesamte Polyen-Grundgerüst delocalisiert wurde. Die dargestellten Folgereaktionen (Abb. 10, A – C) resultieren somit lediglich in repräsentative Reaktionsprodukte, die ebenso an allen anderen Positionen im Molekül generiert werden können.<sup>84</sup>

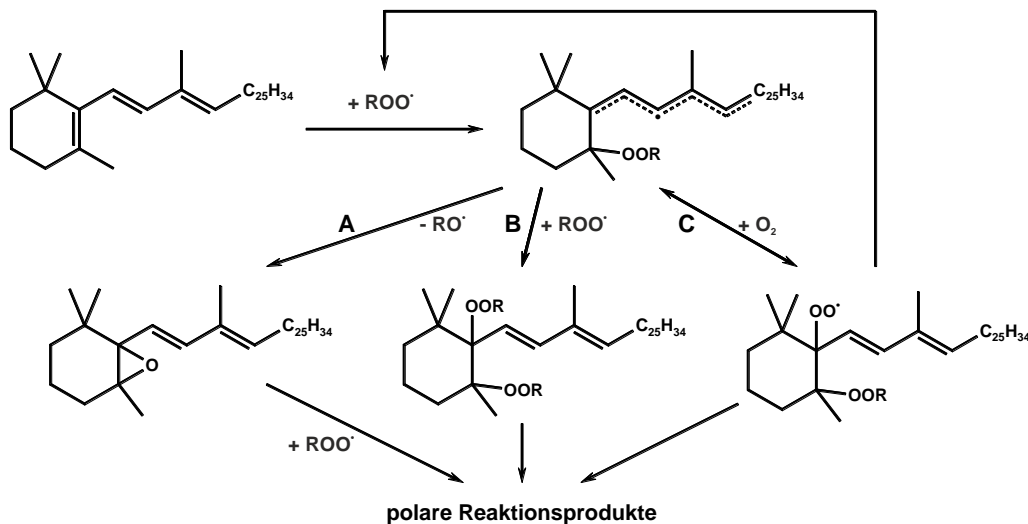


Abb. 10: Vorgeschlagene Mechanismen für die Reaktion von  $\beta$ -Carotin mit Peroxyl-Radikalen nach Kennedy et al.<sup>84</sup>

Zusammenfassend betrachtet ist die Umsetzungsrate sowie der zugrunde liegende Mechanismus (Vgl. Abb. 8) bei der Reaktion von Carotinoiden mit verschiedenen Radikalen von drei Parametern abhängig: der Struktur der Carotinoide, der Polarität des Mediums und der Reaktivität des Radikals.<sup>83</sup> Inwieweit die Ergebnisse aus den zahlreichen Studien auf biologische Systeme übertragbar sind, kann aufgrund der geringen Datenlage aus *in vitro* Modellen kaum abgeschätzt werden.<sup>83</sup>

Obwohl während der Reaktion von Carotinoiden und Radikalen das chemische Quenching dominiert, wurde 1994 erstmalig ein dazu parallel ablaufendes physikalisches Quenching nachgewiesen.<sup>85</sup> Jeevarajan et al. sowie Gao et al. beobachteten eine signifikante *trans/cis*-Isomerisierung während der elektrochemischen Oxidation von all-*trans*-Canthaxanthin und all-*trans*- $\beta$ -Carotin.<sup>85,86</sup> Die Isomerisierung verlief dabei über das Carotinoid-Radikalkation oder -dikation, die wie in Abb. 8 gezeigt nach einem Elektronentransfer während der Reaktion mit Radikalen gebildet werden.<sup>86</sup> Im Anschluss an diese Beobachtung wurde der folgende Reaktionsmechanismus für die Radikal-induzierte Isomerisierung postuliert (Abb. 11).

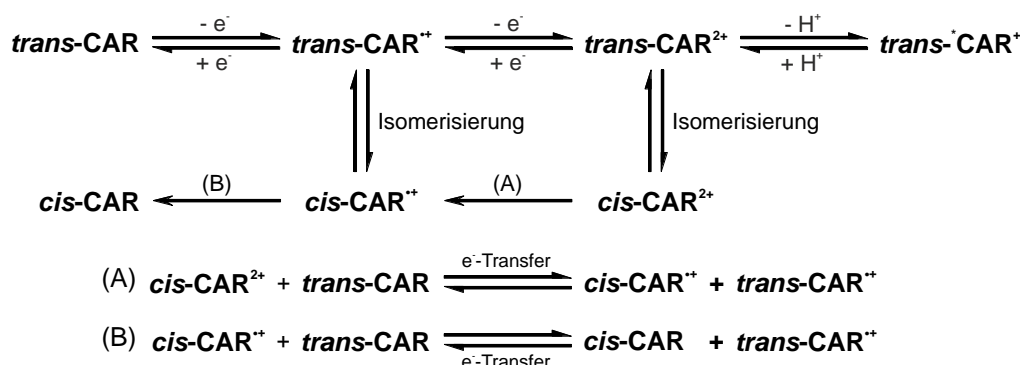


Abb. 11: Schema zur Isomerisierung von Carotinoiden während der elektrochemischen Oxidation<sup>86</sup>

Eine 5-minütige Elektrolyse bei 0,9 V führte zur Bildung von 15-*cis*-, 13-*cis*-, 9-*cis*- und 9,13-di-*cis*- $\beta$ -Carotin, sowie zu weiteren nicht näher charakterisierbaren Isomeren.<sup>86</sup> Im Fall von Canthaxanthin wurde während dieser kurzen Behandlungsdauer eine *trans/cis*-Isomerisierungsrate von 40 % erreicht.<sup>86</sup> Weiterführende Studien bestätigten diese Ergebnisse

auch für eine chemische Oxidation mittels Eisen(III)-chlorid, wobei die 13-*cis*- und 9-*cis*-Isomere dominant gebildet wurden.<sup>80,87</sup> Während dieser Untersuchungen wurden allerdings keine spezifischen Bildungsraten für die einzelnen *cis*-Isomere bestimmt, womit der Isomerisierungsprozess nicht im Detail beschrieben wurde. Nichtsdestotrotz beweisen diese Studien, dass neben der dominanten chemischen Oxidation von Carotinoiden stets auch ein physikalisches Quenching auftritt. Umso erstaunlicher ist, dass weitere Studien erst im Jahr 2009 an diese Ergebnisse anknüpften. Lowe et al. behandelten all-*trans*- $\beta$ -Carotin mit Zigarettenrauch und beobachteten zunächst einen sehr schnellen und vollständigen Verlust des Carotinoids unter Bildung einiger weniger Oxidationsprodukte, wie  $\beta$ -Cyclocitral,  $\beta$ -Ionon oder  $\beta$ -Ionon-5,6-epoxid.<sup>88</sup> Nach einer Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit wurden unter anderem 4-Nitro- $\beta$ -Carotin, einige geometrische Isomere dieser Verbindung und die 13-*cis*- und 9-*cis*-Isomere des  $\beta$ -Carotins nachgewiesen. Dabei wurden die *cis*-Isomere als vermutlich kurzlebige Intermediate bezeichnet, da diese unter drastischeren Bedingungen nicht nachweisbar waren und so möglicherweise als Vorstufe für einen beschleunigten oxidativen Abbau dienen.<sup>88</sup> Auch die Behandlung von all-*trans*-Lycopin mit Zigarettenrauch führte zu einem schnellen oxidativen Abbau, sodass durch die Behandlung mit dem Rauch von 10 Zigaretten nur noch 35 bis 40 % der ursprünglich eingesetzten Menge an Lycopin nachweisbar waren.<sup>89</sup> Parallel dazu stieg der Anteil an 5-*cis*-Lycopin von etwa 1,5 % auf 10 % an, wohingegen 9-*cis*- und vor allem 13-*cis*-Lycopin als bedeutende Zwischenprodukte identifiziert wurden.<sup>89,90</sup> Dieser Verlauf entspricht den thermodynamischen Betrachtungen nach Guo et al., wonach 5-*cis*-Lycopin durch eine hohe Stabilität und Rotationsbarriere als thermodynamisch kontrolliertes Reaktionsprodukt gilt und so im Vergleich zu anderen Isomeren unter drastischen Bedingungen stärker gebildet bzw. langsamer abgebaut wird.<sup>24,90</sup>

Zusammenfassend wurde das chemische Quenching in der Literatur sehr ausführlich untersucht, sodass je nach Reaktionsmechanismus und Art des Radikals unzählige Abbaustrukturen von Carotinoiden identifiziert wurden. Allerdings gestaltete sich der Nachweis *in vivo* deutlich komplizierter, sodass bis heute nur wenige Verbindungen tatsächlich in biologischen Systemen nachgewiesen wurden. Das physikalische Quenching wurde dagegen in deutlich geringerem Ausmaß untersucht. Prinzipiell wurde während dieser Isomerisierung ein zweistufiger Prozess festgestellt, sodass milde Reaktionsbedingungen (niedrige Temperatur, niedrige Radikal-Konzentrationen) zur Bildung verschiedener Isomere (u.a. 15-*cis*, 13-*cis*, 9,13-di-*cis*) führen, wohingegen drastische Bedingungen (hohe Temperaturen, hohe Radikal-Konzentration) in einer Verschiebung in Richtung der thermodynamisch kontrollierten Reaktionsprodukte (5-*cis*-Lycopin, 9-*cis*- $\beta$ -Carotin) resultieren.

#### 1.4. Carotinoide *in vivo* – Isomerenmuster und Bioverfügbarkeit

Wie bereits ausführlich beschrieben, sind in Carotinoid-haltigen Lebensmitteln aufgrund von verschiedenen Umwelteinflüssen oder einer nachträglichen Behandlung stets *cis*-Isomere nachweisbar. Nichtsdestotrotz werden über die menschliche Ernährung etwa 80 – 97 % der Carotinoide in der all-*trans*-Konfiguration aufgenommen.<sup>91</sup> Interessanterweise unterscheidet sich das Lycopin-Isomerenmuster *in vivo* drastisch von der Zusammensetzung, wie sie üblicherweise über die Nahrung zugeführt wird.<sup>92</sup> In humanem Plasma wurde für das in der

Natur dominante all-*trans*-Lycopin lediglich ein Anteil von 40 bis 60 % nachgewiesen.<sup>44,92-94</sup> Im Umkehrschluss dominieren *in vivo* die *cis*-Isomere, wobei sich je nach Studie etwa 30 % auf 5-*cis*, bis 40 % auf 9-*cis* und etwa 15 % auf 13-*cis* verteilen.<sup>44,93,94</sup> Damit stellen vor allem die peripheren Isomere den Hauptanteil dar, obwohl diese in Lebensmitteln mit Konzentrationen von maximal 20 % eine eher untergeordnete Rolle spielen.<sup>38,43</sup> Im Gegensatz dazu dominiert all-*trans*- $\beta$ -Carotin in allen tierischen Geweben und wurde in humanem Plasma mit Anteilen von über 90 % nachgewiesen.<sup>93,95</sup> Der Anteil an 13-*cis*- $\beta$ -Carotin lag im Bereich von 5 bis 15 %, während das 9-*cis*-Isomer lediglich in Spuren nachgewiesen wurde.<sup>94,95</sup>

Die stark abweichenden Isomerenmuster von  $\beta$ -Carotin und Lycopin werden in der Literatur durch verschiedene Theorien begründet. Zum einen werden erhöhte *cis*-Lycopin-Anteile durch einen Isomerisierungsprozess während der Verdauung begründet. Re et al. beobachteten einen starken Isomerisierungsprozess während der Behandlung von Lycopin mit einer Magensäure-Simulanzlösung (HCl, pH 1,6, 37 °C). Der ursprüngliche Anteil an all-*trans*-Lycopin sank bereits nach einer Minute Inkubationszeit von 81,8 % auf 55,3 % ab, während eine starke Bildung von 5-*cis*- (+12,5 %), 13-*cis*- (+7,3 %) und 9-*cis*-Lycopin (+6,7 %) beobachtet wurde.<sup>96</sup> Moraru et al. beobachteten unter vergleichbaren Bedingungen die Einstellung von Gleichgewichtskonzentrationen, wobei all-*trans*-Lycopin einem Anteil von 68 % anstrebte. 13-*cis*- und 9-*cis*-Lycopin erreichten beim pH-Wert des Magens eine Endkonzentration von jeweils 16 %.<sup>97</sup> In Gegenwart einer intakten Lebensmittelmatrix wurde eine derart stark ausgeprägte Isomerisierung allerdings nicht ausgelöst. Die Inkubation von Tomatenmark unter gleichen Bedingungen führte zu einer Abnahme von all-*trans* um lediglich 11,4 % und verlief damit deutlich schwächer im Vergleich zur Behandlung des reinen Lycopin-Standards.<sup>96</sup> Da das Lycopin in Tomaten und Tomatenprodukten in den Chromoplasten in kristalliner Form eingelagert wird,<sup>98</sup> ist die vorliegende Konfiguration im Vergleich zur Reinsubstanz deutlich stabiler und wird effektiv vor äußeren Einflüssen, wie starken Säuren, geschützt.<sup>28</sup> Die Kristalle werden erst nach dem Einwirken von Gallensäure gelöst und anschließend in Mizellen aufgenommen, wobei vor allem dieser Prozess den limitierenden Faktor für die Bilanz der Bioverfügbarkeit darstellt.<sup>99,100</sup> Die gleiche Speicherform wurde für  $\beta$ -Carotin nachgewiesen, das in Tomaten und Karotten ebenfalls in kristalliner Form in den Chromoplasten vorliegt, wodurch die *in vitro* Bioverfügbarkeit (gemessen während der Aufnahme in die Mizellen) bei lediglich 3,1 % (Tomate) bzw. 0,5 % (Karotte) lag.<sup>101</sup> Im Gegensatz dazu wurde mit 10,3 % aus Mangos und 5,3 % aus Papayas eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit bestimmt, die sich durch die Einlagerung in flüssig-kristalliner Form begründet.<sup>101</sup> In diesem Fall wurde die Isolierung aus der Lebensmittelmatrix und die folgende Aufnahme in die Mizellen deutlich erleichtert. Die nun in den Mizellen gelösten Carotinoide werden anschließend über die Darmzotten der Darmschleimhaut resorbiert.<sup>99,102</sup> Der weitere Transport in die Blutbahn und Zielgewebe erfolgt durch die Einlagerung in Chylomikronen.<sup>99,102</sup> Prinzipiell ist die Resorption von Carotinoiden sehr stark an den Fett-Verdau gebunden und unterliegt ähnlichen Prozessen bis diese schließlich in die Blutbahn gelangen. Die Isomerisierung von Carotinoiden kann somit frühestens nach dem Lösen der kristallinen Struktur durch thermische Prozesse oder Säure induziert werden.<sup>28</sup> Unter thermischen Prozessen bildet Lycopin im Vergleich zu  $\beta$ -Carotin deutlich schneller *cis*-Isomere. Während nach 3-stündiger Erhitzung in kochendem Petrolether der Anteil an *cis*-Lycopin (als Summenparameter bestimmt) bereits auf 55 % anstieg, wurden unter gleichen

Bedingungen lediglich 14 % des  $\beta$ -Carotins in *cis*-Konfiguration nachgewiesen.<sup>28</sup> Allerdings ist mehr als fraglich, inwieweit dieses Modellsystem für eine Übertragung auf *in vivo*-Systeme geeignet ist, da die Isomerisierung vor allem auch stark vom Lösungsmittel abhängt.<sup>37</sup> Dennoch gilt die Theorie der Isomerisierung von Carotinoiden innerhalb des Magen-Darm-Trakts als die plausibelste Erklärung für die *in vivo* nachgewiesenen *cis*-Isomeren-Anteile von  $\beta$ -Carotin und Lycopin.<sup>92</sup>

Eine zweite, kontrovers diskutierte Theorie basiert auf der These, dass *cis*-Lycopin-Isomere eine erhöhte Bioverfügbarkeit gegenüber der *all-trans*-Konfiguration besitzen. Demzufolge wird durch die Anwesenheit einer oder mehrerer *cis*-Bindungen die Länge des Moleküls (in Bezug zur räumlichen Ausbreitung) reduziert, was die Aufnahme in Mizellen erleichtert.<sup>91,102</sup> Gleichzeitig besitzen *cis*-Lycopin-Isomere eine geringere Tendenz zur Aggregation und sind leichter in Gallensäure-Mizellen löslich, wodurch diese wahrscheinlich leichter in die Chylomikronen eingebaut werden.<sup>102,103</sup> Andererseits wird vermutet, dass *all-trans*-Lycopin eher zur Aggregation neigt und im Darm Kristalle ausbildet, die nur sehr schlecht in die Mizellen aufgenommen werden und dementsprechend zu einer Anreicherung von *cis*-Isomeren im Plasma führen.<sup>1</sup>

Trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten und den damit verbundenen vergleichbaren physikalischen Eigenschaften verhalten sich die Isomere des  $\beta$ -Carotins während der Verdauung und Resorption völlig unterschiedlich im Vergleich zum Lycopin. Jensen et al. untersuchten die Gehalte von *all-trans*- und *9-cis*- $\beta$ -Carotin in humanem Serum vor und nach der Supplementierung mit verschiedenen Lebensmittelextrakten. Dabei zeigte sich ein deutlicher Anstieg der *all-trans*-Konzentration im Serum, wohingegen nur ein moderater Anstieg für *9-cis* beobachtet wurde.<sup>104</sup> Demzufolge besitzt im Gegensatz zum Lycopin die *all-trans*-Konfiguration eine höhere Bioverfügbarkeit als die entsprechenden *cis*-Isomere.<sup>104</sup> Yeum et al. beobachteten zusätzlich einen Anstieg der Plasma-Konzentration von *13-cis*- $\beta$ -Carotin, sodass in diesem Fall keine abweichende Bioverfügbarkeit im Vergleich zum *all-trans* festgestellt wurde.<sup>105</sup> Weitere Modelle zeigten, dass es keine Unterschiede im Mizellen-Lösungsverhalten von *9-cis* und *all-trans* bestehen.<sup>106</sup> Diese und weitere Studien beweisen, dass die Verdauung im Gegensatz zum Lycopin zu keiner Diskriminierung von  $\beta$ -Carotin-Isomeren führt.<sup>107,108</sup> Allerdings wurden in allen Geweben und Organen nur sehr geringe Mengen an *9-cis*- $\beta$ -Carotin nachgewiesen, sodass nach der Aufnahme über die Nahrung von einer Umwandlung ausgegangen werden muss. Parker et al. verabreichten Probanden <sup>13</sup>C-markiertes *9-cis*- $\beta$ -Carotin und untersuchten anschließend die Resorption ins Blut. Interessanterweise wurde im Serum kein markiertes *9-cis* wiedergefunden, wohingegen *all-trans*- $\beta$ -Carotin und *all-trans*-Retinol in Isotopen-markierter Form detektiert wurden.<sup>99</sup> Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde zwischen Nahrungsaufnahme und Sekretion ins Blut von einer eher untypischen *cis/trans*-Isomerisierung ausgegangen.<sup>94,99</sup> Folgeuntersuchen zeigen, dass diese Isomerisierung aber frühestens während der Absorption in die Mukosa erfolgt.<sup>106,108</sup> Andere Studien gehen von einer sofortigen Metabolisierung des aufgenommenen *9-cis*- $\beta$ -Carotins aus, sodass beispielsweise eine enzymatische Spaltung effektiv zur Bildung von *9-cis*-Retinal führt und es so formal zu einer Anreicherung der *all-trans*-Konfiguration kommt.<sup>95,99</sup>



Aufgrund der vorgestellten Studien zu unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten von Carotinoid-Isomeren kann die Diskrepanz der *cis*-Isomeren-Anteile von  $\beta$ -Carotins und Lycopin *in vivo* nur ansatzweise erklärt werden. Allerdings muss das Konzept einiger dieser Studien kritisch hinterfragt werden. Meist basieren diese Untersuchungen auf einer Applikation von Lycopin- oder  $\beta$ -Carotin-haltigen Lebensmitteln, wobei im Anschluss daran die Auswirkungen auf die Gehalte und Isomerenzusammensetzung im Blutplasma untersucht werden. Der Nachweis von hohen *cis*-Lycopin-Anteilen im Plasma führte dabei oft direkt zur der Schlussfolgerung, dass diese Isomere deutlich besser bioverfügbar sind, zumal in den verabreichten Supplementen die *all-trans*-Konfiguration dominierte.<sup>94,109</sup> Im Gegensatz dazu wurden die dominanten Anteile von *all-trans*- $\beta$ -Carotin durch erhöhte Bioverfügbarkeiten oder durch eine Isomerisierung der *cis*-Isomere begründet.<sup>94,110</sup> Direkte Beweise oder die Betrachtung der komplexen Prozesse während der Verdauung und Resorption wurden hierbei nicht betrachtet. In einer Studie von Stahl und Sies wurde Probanden unter anderem thermisch behandelte Tomatensaft verabreicht.<sup>109</sup> Dies resultierte erwartungsgemäß in einem Anstieg der Lycopin-Konzentration im Plasma der Testpersonen. Dabei wurden für 9-*cis* und 13-*cis* leicht stärkere Anstiege im Vergleich zum *all-trans*-Isomer beobachtet, was wiederum zur Annahme einer besseren Bioverfügbarkeit der *cis*-Isomere führte.<sup>109</sup> Allerdings wurden über den Tomatensaft nur sehr geringe Mengen an 9-*cis*-Lycopin zugeführt, wodurch die starken Anstiege im Plasma nicht erklärt werden konnten. Die Autoren vermuteten erstmals eine zusätzliche Isomerisierung *in vivo*, die möglicherweise enzymvermittelt abläuft.<sup>109</sup> Aktuell existieren demzufolge immer mehr Studien, die gegen die Theorie der unterschiedlichen Bioverfügbarkeit von Carotinoid-Isomeren argumentieren.<sup>105,107,111–113</sup> Dabei wurde beispielsweise durch den wiederholten Konsum von Wassermelonensaft ein stärkerer Anstieg der *all-trans*-Lycopin-Plasmakonzentration im Vergleich zu den *cis*-Isomeren nachgewiesen.<sup>112</sup> Unlu et al. vermuteten ebenfalls eine zusätzliche *in vivo* Isomerisierung, da allein über die Bioverfügbarkeit das drastische Ausmaß der *cis*-Lycopin-Isomere im Plasma nicht zu erklären ist.<sup>113</sup>

Insgesamt gesehen wurde die Bioverfügbarkeit sowie die Absorption von Carotinoiden ausführlich durch *in vitro* und *in vivo* Modellsysteme untersucht. Die Konsequenzen dieser einzelnen Ergebnisse sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt, sodass weitere Untersuchungen nötig sind, um die Absorptionswege und vor allem die spezifische Verhaltensweise der *cis*-Lycopin-Isomeren zu verstehen.<sup>91</sup> Aktuell scheint die Theorie der besseren Bioverfügbarkeit von *cis*-Isomeren des Lycopins überholt zu sein. Isomerisierungsprozesse die während dem Aufschluss, der Verdauung und der Resorption stattfinden, gelten als plausibelste Erklärung für die Unterschiede im Isomerenmuster von  $\beta$ -Carotin und Lycopin in biologischen Systemen.<sup>92</sup>

Allerdings sind die vorgestellten Theorien nicht in der Lage, eine Erklärung für die unterschiedlichen Lycopin-Isomerenmuster in verschiedenen Organen und Geweben zu liefern. Beispielsweise wurde in der Prostata ein auffällig niedriger Gehalt an *all-trans*-Lycopin nachgewiesen.<sup>114</sup> Während in dieser Studie in Serum-Proben zwischen 27 – 41 % in *all-trans*-Konfiguration vorlagen, wurden in der Prostata lediglich 12 bis maximal 21 % als *all-trans* identifiziert.<sup>114</sup> Untersuchungen durch Boileau et al. und Stahl et al. bestätigen diese Ergebnisse.<sup>93,103</sup> Hier wurden in unterschiedlichen Organen von Frettchen starke Unterschiede

im Isomerisierungsgrad festgestellt. Während in Lunge und Serum zwischen 48 und 53 % als *cis*-Lycopin vorlagen, wurden *cis*-Isomeren-Anteile von etwa 58 % in Leber und Mukosa nachgewiesen. Ein deutlich erhöhter Anteil von 77,4 % der *cis*-Isomere wurde in den Lymphen der Frettchen nachgewiesen.<sup>103</sup> Dagegen wurde in humanen Testikeln ein Anteil der *cis*-Isomere von lediglich 30 % ermittelt.<sup>93</sup> Im Gegensatz dazu wurden innerhalb des  $\beta$ -Carotin-Isomerenmusters deutlich geringere Schwankungen festgestellt. All-*trans*- $\beta$ -Carotin dominierte in allen untersuchten Geweben und Organen (Hoden, Serum, Lunge, Leber, Niere sowie Nebenniere) mit einem Anteil zwischen 70 und 95 %.<sup>93-95,103</sup> Diese Ergebnisse deuten auf die Existenz von weiteren Isomerisierungsprozessen hin, die folglich nach der Absorption in die Chylomikronen stattfinden müssen. Vor allem oxidativ ausgelöste Isomerisierungsprozesse (oxidativer Zellstress) sollten *in vivo* eine entscheidende Rolle spielen. Nachweise für diese Mechanismen wurden bisher allerdings nur durch wenige *in vitro* Modelle erbracht ohne dass eine Übertragbarkeit auf komplexe biologische Systeme möglich war (siehe 1.3.4).

## 2. Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in einer detaillierten Beschreibung der photochemisch und chemisch induzierten Isomerisierung von Carotinoiden. Lycopin und  $\beta$ -Carotin standen dabei als ernährungsphysiologisch bedeutsamste Vertreter im Fokus der Untersuchungen. Gleichzeitig sollte für die Isomerisierungsprozesse eine praktische Relevanz und somit eine Übertragung auf Lebensmittel und *in vivo* hergestellt werden.

Dazu wurde zunächst ein potentes Analysenverfahren etabliert, das eine umfassende Beschreibung der Isomerisierung von Lycopin und  $\beta$ -Carotin erlaubte. Dabei spielte die Synthese von authentischen Referenzmaterialien eine entscheidende Rolle, da nur so eine aussagekräftige Analytik ermöglicht werden konnte.

Basierend auf einer leistungsstarken Analytik wurden zunächst grundlegende Prozesse der photochemisch induzierten Isomerisierung festgestellt. Darüber hinaus wurde der Isomerisierungsprozess durch verschiedene Lichtregime ausgelöst und anschließend untersucht, um mögliche charakteristische Prozesse oder Marker-Verbindungen für ganz spezifische Lichtbedingungen zu beschreiben. Dabei wurden Modellsysteme etabliert, die die Lichtverhältnisse unter Freiland- und Gewächshausbedingungen realistisch darstellten. Basierend auf bisherigen Untersuchungen und den theoretischen Studien durch Guo et al. und Kuti et al. wurden hier signifikante Unterschiede im Isomerenmuster beobachtet.

Die Identifizierung möglicher Marker-Verbindungen für die photochemische Isomerisierung wurde anschließend aus den Modellsystemen auf reale Lebensmittelproben übertragen. Dabei stellte der Anbau von authentischen Freiland- und Gewächshausproben (z.B. Tomaten und Spinat) den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dar. Die Untersuchung eines entsprechenden Probenumfangs diente auch hier zum Nachweis möglicher Unterschiede im Isomerenmuster der authentischen Proben. Dementsprechend wurden basierend auf einer Carotinoid-Isomerenanalyse Aussagen zur Authentizität von Lebensmitteln getroffen. Eine derartige bedeutsame praktische Relevanz existiert in diesem Zusammenhang bisher nicht und unterstreicht die Bedeutung der vorliegenden Studie.

Gleichzeitig wurde die chemische Isomerisierung von Carotinoiden ausführlich beschrieben. Dazu war die Etablierung einfacher Modellsysteme zum Umsatz mit reaktiven Sauerstoffspezies und freien Radikalen grundlegend erforderlich. Auch hier erfolgten ausführliche Beschreibungen der Isomerisierung, da nahezu keine aktuellen Arbeiten zu diesem Themenkomplex existieren. Darüber hinaus wurden mögliche synergistische Effekte beim Einsatz mehrerer Carotinoide in einem System untersucht. Diese Modelle sollten dann vor allem oxidative Prozesse im biologischen System beschreiben. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Modellinkubationen auf biologische Systeme, wie humanem Plasma, wurde angestrebt. Die führte zu möglichen Erklärungen für die Diskrepanz der *cis*-Isomeren-Anteile von Lycopin und  $\beta$ -Carotin im Plasma bzw. in den verschiedenen Organen und Geweben. Bisherige Theorien können den starken Isomerisierungsgrad des Lycopins (60 % ) im Vergleich zu den dominant auftretenden Anteilen an  $\beta$ -Carotin (80 – 95 %) nicht hinreichend erklären, zumal die *cis*-Isomeren-Anteile des Lycopins innerhalb der verschiedenen Körperkompartimente stark variieren.

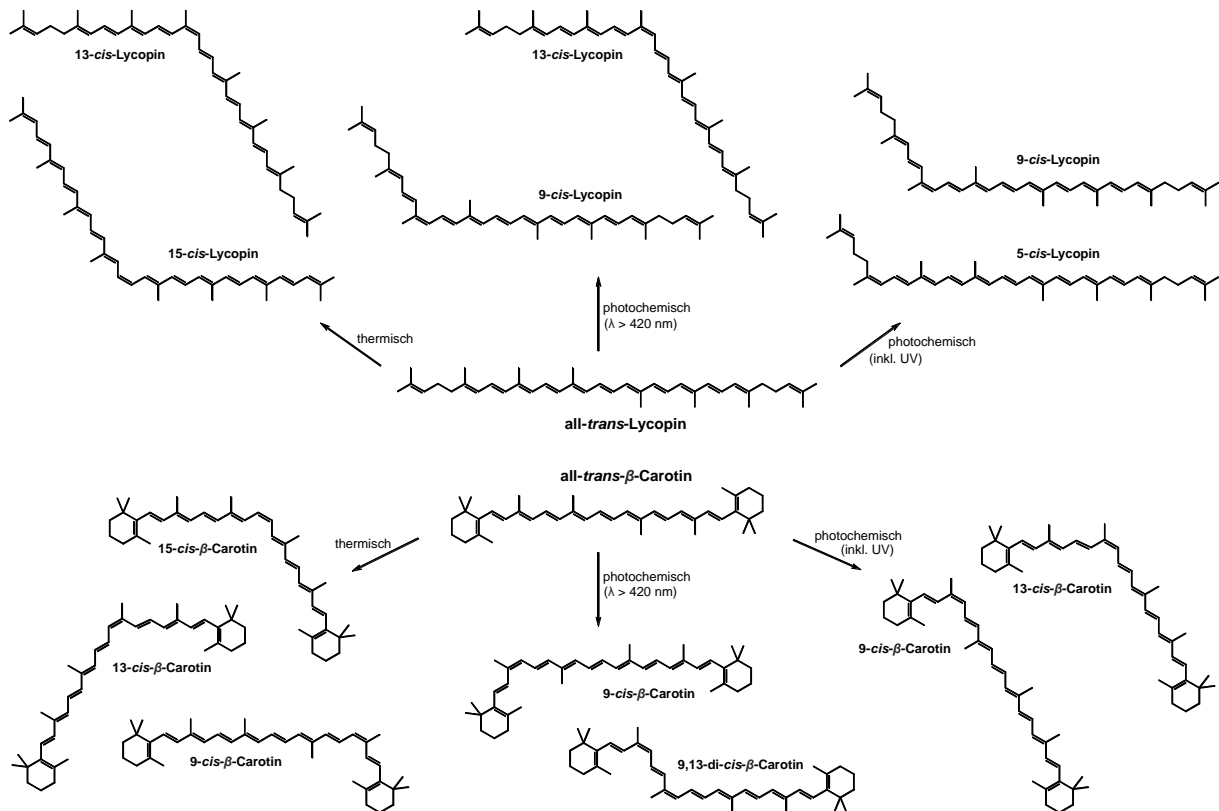
### 3. Diskussion der Ergebnisse

(Auszug aus *Lebensmittelchemie*, 2014, 68, 83 – 87)

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die photochemisch induzierte Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin und Lycopin im Detail, insbesondere den Einfluss unterschiedlicher Lichtregime. Die differenzierte Betrachtung ermöglichte die Unterscheidung verschiedener Anbaubedingungen, da sich das Lichtspektrum im Freilandanbau deutlich vom Gewächshausanbau abgrenzt.<sup>115</sup>

Dazu wurden zunächst all-*trans*-Lycopin und all-*trans*- $\beta$ -Carotin in einfachen Modellsystemen mit einer Halogen-Lampe bestrahlt, deren Wellenlängenspektrum vergleichbar mit dem des Sonnenlichtes war. Um Gewächshausbedingungen nachzustellen, wurde zusätzlich ein optischer Filter zwischen Strahlungsquelle und Carotinoid-Lösung eingesetzt, der undurchlässig für Wellenlängen unterhalb von 420 nm war. Klassische Gewächshausmaterialien wie Glas oder Kunststofffolien weisen ein vergleichbares Absorptionsverhalten auf und schirmen so das Innere vor allem vor UV-Strahlung effektiv ab.<sup>115</sup> Die Simulation von künstlichen Strahlungsquellen konnte durch den Einsatz eines 550 nm Filters erreicht werden, da die üblicherweise eingesetzten Natriumdampflampen ein für die Photosynthese optimiertes Wellenlängenspektrum im Bereich von 500 bis etwa 800 nm besitzen. Um eine klare Abgrenzung zu thermischen Isomerisierungsprozessen zu ermöglichen, wurden beide Carotinoide zusätzlich unter Lichtausschluss bei 65 °C behandelt. In allen Fällen wurde der Isomerisierungsverlauf in Abhängigkeit von der Bestrahlungs- bzw. Behandlungsdauer mit Hilfe einer geeigneten HPLC-UV-Methode verfolgt. Dabei wurden zur Identifizierung der verschiedenen Isomere neben den kommerziell erhältlichen all-*trans*-Carotinoiden vor allem authentisch synthetisierte, isomerenreine *cis*-Lycopin- und - $\beta$ -Carotin-Standards eingesetzt. Die Charakterisierung von weiteren Verbindungen erfolgte mittels LC-MS/MS und HPLC-DAD.

Bei der Auswertung des photochemischen Isomerisierungsprozesses zeigte sich, dass bereits geringe Änderungen im Wellenlängenspektrum der Strahlenquelle einen erheblichen Einfluss auf den Isomerisierungsverlauf ausüben. Die ablaufenden Umwandlungsprozesse sind schematisch in Abb. 12 zusammengefasst, wobei ausschließlich die dominant gebildeten *cis*-Isomere dargestellt wurden. Je nach Art der zugeführten Energiemenge konnten so charakteristische Isomerisierungsverläufe, sowie für bestimmte Bedingungen sogar spezifische Isomere identifiziert werden. Wie anhand der Literatur zu erwarten,<sup>29,31,37,38</sup> stellten die 15-*cis*- und vor allem die 13-*cis*-Isomere mit Konzentration von bis zu 25 % die dominanten *cis*-Verbindungen nach thermischer Behandlung dar. Energetisch gehinderte Verbindungen, wie beispielsweise 5-*cis*- oder 9-*cis*-Lycopin,<sup>24</sup> wurden unter diesen milden Bedingungen in deutlich geringerem Ausmaß gebildet (Isomerenanteile < 4 %).



**Abb. 12: Übersicht zu den dominant gebildeten *cis*-Isomeren während der thermischen und photochemischen Isomerisierung von all-*trans*-Lycopin und all-*trans*-β-Carotin**

Im Gegensatz dazu wurden während der photochemisch induzierten Isomerisierung vor allem die thermodynamisch kontrollierten *cis*-Isomere generiert. So wurde 5-*cis*-Lycopin ausschließlich in Gegenwart des vollen Wellenlängenspektrums gebildet. Allein der Ausschluss der energiereichen UV-Strahlung (420 nm Filter) genügte, um die Reaktion zum 5-*cis*-Isomer signifikant zu unterdrücken (Abb. 13). Basierend auf der größten Aktivierungsenergie unter allen *cis*-Isomeren nimmt dieses Isomer eine Sonderstellung im Isomerisierungsprozess ein. Eine Sonderstellung weist ebenfalls 7-*cis*-Lycopin auf. Dieses Isomer besitzt eine so geringe Stabilität, dass während der Bestrahlung (ohne Filter) ein starker Abbau beobachtet wurde. Sobald optische Filter eingesetzt wurden, konnten keine signifikanten Änderungen mehr nachgewiesen werden. Aufgrund der erhöhten Rotationsbarriere ist ausschließlich UV-Strahlung in der Lage, den Reisomerisierungsprozess zur all-*trans*-Konfiguration auszulösen. Somit konnten anhand der Modellsysteme 5-*cis*- und 7-*cis*-Lycopin als charakteristische Marker für energiereiche photochemische Isomerisierungsprozesse identifiziert werden. Obwohl für 9-*cis*-Lycopin in allen Modellsystemen ein signifikanter Anstieg beobachtet wurde, kann dieses Isomer ebenfalls als Marker für die photochemische Isomerisierung angesehen werden, da in Abwesenheit von UV-Strahlung deutlich geringere Mengen generiert wurden. Wie in Abb. 13 zu sehen, kommt es bei 9-*cis*-Lycopin allerdings zu einer Überschneidung zur thermischen Isomerisierung, wodurch 5-*cis* und 7-*cis* die geeigneteren Parameter für eine Differenzierung der Anbaubedingungen darstellen. Eine dominante Ausbildung von 13-*cis*-Lycopin konnte lediglich zu Beginn der Bestrahlung festgestellt werden, allerdings nur beim Einsatz von optischen Filtern. Unter Einstrahlung des vollständigen Wellenlängenspektrums genügte die Stabilität des 13-*cis*-Isomers nicht aus, um zu einer Anreicherung zu führen. Der Einsatz von optischen Filtern resultierte in einem

verminderten Energieeintrag, wodurch dann eine hinreichende Stabilität des Isomers gewährleistet wurde. Prinzipiell führte der Einsatz von optischen Filtern zur Abschwächung der Isomerisierung sowie zu einer Verschiebung des Isomerisierungscharakters. Während das volle Lichtspektrum zur Ausbildung der thermodynamisch kontrollierten Reaktionsprodukte führte, wurden durch den Einsatz von optischen Filtern eher die kinetisch kontrollierten *cis*-Isomere ausgebildet. Durch das Ausblenden von energiereichen Wellenlängenbereichen näherte sich der photochemisch induzierte Prozess immer mehr dem thermischen Isomerisierungsverlauf.

Die Aktivierungsenergien und Rotationsbarrieren innerhalb der *cis*- $\beta$ -Carotin-Isomere unterscheiden sich im Vergleich zum Lycopin deutlich geringer.<sup>24</sup> Dadurch kommt es vermehrt zu Überschneidungen von thermischen und photochemischen Isomerisierungsprozessen. Beispielsweise wurden in allen Modellsystemen signifikante Anstiege an 9-*cis*- $\beta$ -Carotin beobachtet, wenngleich auch in unterschiedlichem Ausmaß (Abb. 13). Analog zu den Versuchen mit Lycopin führte der Einsatz von optischen Filtern zu einer starken Suppression der Isomerisierung. Es wurden in Abwesenheit der UV-Strahlung deutlich geringere Mengen an *cis*-Isomeren gebildet. Im Falle von 9-*cis*- $\beta$ -Carotin führte dies zu einer 5-fach geringeren Konzentration, wodurch auch hier eine klare Differenzierung der vorherrschenden Lichtregime ermöglicht wird. Zusätzlich konnte 9,13-di-*cis*- $\beta$ -Carotin als charakteristisches Isomer zur Beschreibung von photochemischen Isomerisierungsprozessen identifiziert werden. Hier konnten signifikante Mengen lediglich während der Bestrahlung unter Einsatz optischer Filter festgestellt werden, während das komplette Wellenlängenspektrum keine Änderung induzierte. Vermutlich besitzt dieses Isomer nur eine geringe Stabilität, wodurch in Anwesenheit von energiereicher Strahlung keine Anreicherung innerhalb des Systems erreicht wird. Andererseits reicht der thermische Energieeintrag nicht aus, um die Rotationsbarriere zu überschreiten und den damit verbundenen Reiserisierungsprozess auszulösen. 9,13-di-*cis*- $\beta$ -Carotin ist damit eine extrem potente Struktur zur Unterscheidung verschiedener Lichtregime. Eine abschließende Zusammenfassung der photochemischen und thermischen Isomerisierung ist in Abb. 13 dargestellt, aus der neben den typischen Isomerisierungsmustern vor allem auch das unterschiedliche Ausmaß der Isomerisierung verdeutlicht wird.

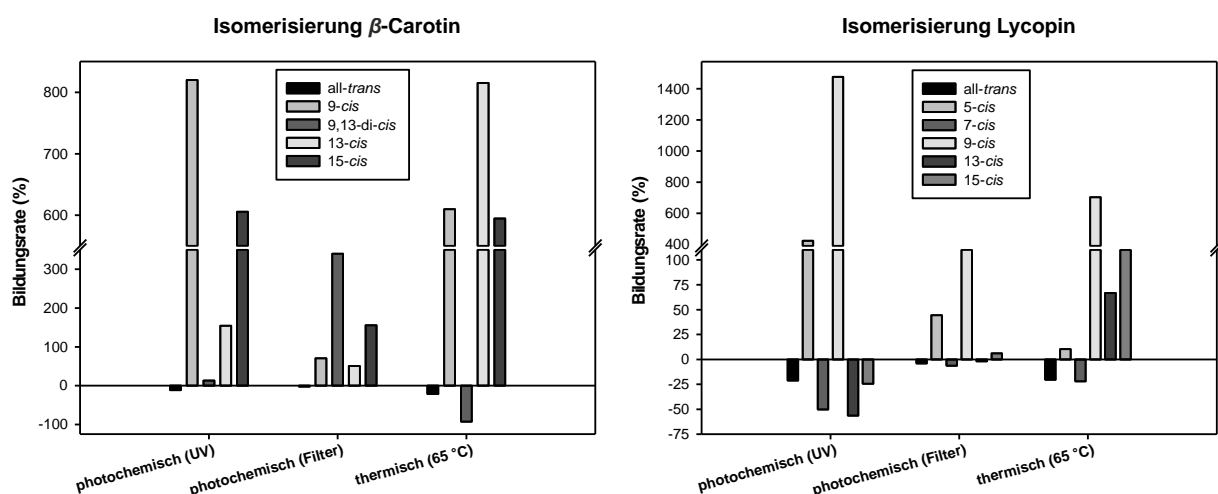


Abb. 13: Bildungsraten von Carotinoid-Isomeren nach 4-stündiger Behandlung

Zusammenfassend wurden aus den Modellexperimenten 5-*cis*-Lycopin, 7-*cis*-Lycopin, 9,13-di-*cis*- $\beta$ -Carotin sowie 9-*cis*- $\beta$ -Carotin als Markerstrukturen für die Anwesenheit von UV-Strahlung identifiziert. Anschließend wurden diese auf authentische Gemüseproben zur Differenzierung zwischen Freiland- und Gewächshausbedingungen übertragen. In Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Halle/Saale) wurden dazu Tomaten (Varietät „Harzfeuer“) sowie Spinat (Varietäten „Matador“ und „Bella“) unter definierten Gewächshausbedingungen kultiviert. Als Lichtquelle dienten während der gesamten Anbauperiode künstliche Strahlungsquellen (Cool Daylight Lampen, Osram, 36W/965), sodass die Pflanzen zu keiner Zeit UV-Strahlung ausgesetzt waren. Der Anbau unter Freilandbedingungen erfolgte parallel dazu im Raum Halle (Saale). Im Fall der Tomaten dienten ausschließlich reife und vollständig rote Früchte als Probenmaterial. Spinatproben wurden ab einer Blattgröße von etwa 40 cm<sup>2</sup> gesammelt. Wurden die Proben nicht direkt im Anschluss zur Ernte aufgearbeitet, erfolgte die Lagerung bei -21 °C um das Isomerenmuster bei Ernte nicht zu beeinflussen. Die Isomerenzusammensetzung wurde nach geeigneter Aufarbeitung mittels HPLC-UV analysiert. Dazu wurde das homogenisierte Probenmaterial zunächst gefriergetrocknet, um eine vollständige Extraktion der Carotinoide mittels Hexan/Ethanol/Aceton (2/1/1) zu erreichen. Die Extrakte wurden dann unter milden Bedingungen verseift, damit störende Komponenten wie Chlorophyll oder Triacylglyceride durch wiederholtes Waschen effektiv abgetrennt werden konnten. Die getrockneten Extrakte wurden definiert verdünnt und der HPLC zugeführt. Die gesamte Aufarbeitung erfolgte unter Lichtausschluss, unter Einsatz von Argon und Temperaturen unterhalb von 25 °C um nachträgliche Isomerisierungsprozesse auszuschließen. Insgesamt wurden 205 Spinatproben (58 Freiland, 67 Gewächshaus, 80 Handel) sowie 197 Tomatenproben (72 Freiland, 51 Gewächshaus, 74 Handel) untersucht. Einige ausgewählte Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefasst.

**Tab. 3: Carotinoid-Isomerenzusammensetzung authentischer Gemüseproben**

Spinat	Anteile an $\beta$ -Carotin in %				
	all- <i>trans</i>	9- <i>cis</i>	9,13-di- <i>cis</i>	13- <i>cis</i>	15- <i>cis</i>
Freiland	86,34 ± 0,21	7,52 ± 0,14	0,25 ± 0,03	4,37 ± 0,11	0,72 ± 0,04
Gewächshaus	87,62 ± 0,17 <sup>a</sup>	6,49 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,81 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,03 <sup>a</sup>
Handel (frisch)	85,24 ± 0,27 <sup>a</sup>	8,61 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,07	4,48 ± 0,12	0,64 ± 0,05
Handel (TK)	85,85 ± 0,26 <sup>a</sup>	7,04 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,04	5,35 ± 0,32 <sup>b</sup>	0,94 ± 0,05 <sup>a</sup>
Tomaten	Anteile an Lycopin in %				
	all- <i>trans</i>	5- <i>cis</i>	7- <i>cis</i>	13- <i>cis</i>	15- <i>cis</i>
Freiland	77,39 ± 0,79	5,78 ± 0,26	1,67 ± 0,11	12,47 ± 0,51	0,69 ± 0,14
Gewächshaus	78,33 ± 0,70	4,14 ± 0,08 <sup>b</sup>	2,65 ± 0,14 <sup>b</sup>	12,41 ± 0,58	0,77 ± 0,11
Handel	79,80 ± 0,94	4,71 ± 0,25	1,60 ± 0,11	11,13 ± 0,61	0,93 ± 0,12

<sup>a</sup> signifikanter Unterschied ( $\alpha = 0,01$ ) im Vergleich zu Freiland, berechnet nach t-Test, <sup>b</sup> signifikanter Unterschied ( $\alpha = 0,01$ ) im Vergleich zu Freiland, berechnet nach WELCH-Test

Tab. 3 beweist die Anwendbarkeit der ausgesuchten photochemischen Marker zur Unterscheidung der Anbaubedingungen. Die Anwesenheit von UV-Strahlung führte beim Freilandanbau von Tomaten zu einem höheren Anteil an 5-*cis*-Lycopin. Mit  $5,78 \pm 0,26$  % unterschied sich der Gehalt signifikant zu den im Gewächshaus kultivierten Tomaten ( $4,14 \pm 0,08$  %). Gleichzeitig lag der Anteil an 7-*cis* mit  $1,67 \pm 0,11$  % signifikant unter dem der Gewächshaus-tomaten ( $2,65 \pm 0,14$  %) und bestätigt damit die unzureichende Stabilität dieses Isomers unter energiereicher Strahlung. Darüber hinaus zeigte der Vergleich der beiden authentischen

Gruppen keine weiteren signifikanten Unterschiede im Lycopin-Isomerenmuster von Tomaten. Tendenziell ist ein höherer Anteil von all-*trans*-Lycopin in Freilandtomaten im Vergleich zu Gewächshausproben erkennbar und bestätigt den geringeren Energieeintrag in Anwesenheit künstlicher Strahlungsquellen.

Die Anbaubedingungen der authentisch angebauten Spinatproben konnten ebenfalls klar voneinander unterschieden werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Tomatenuntersuchungen wurden für nahezu alle Parameter signifikante Unterschiede nachgewiesen. Wie oben beschrieben, unterscheiden sich die Aktivierungsenergien der  $\beta$ -Carotin-Isomere in deutlich geringerem Umfang,<sup>24</sup> wodurch die verschieden induzierten Isomerisierungsprozesse wenig spezifisch ablaufen (siehe Abb. 13). Allerdings wirken sich kleine Änderungen im Wellenlängenspektrum erheblich auf den Isomerisierungsgrad aus. Dementsprechend zeigte unter Freiland kultivierter Spinat einen signifikant niedrigeren Anteil an all-*trans*- $\beta$ -Carotin im Vergleich zu Gewächshausspinat, während signifikant höhere Anteile an 9-*cis*, 13-*cis* sowie 15-*cis* nachgewiesen werden konnten. Wie bereits in den Modellversuchen beobachtet, steigert UV-Strahlung das Ausmaß der Isomerisierung deutlich. Zudem konnte das 9,13-di-*cis*- $\beta$ -Carotin als potenter Marker zur Unterscheidung der Lichtbedingungen auch im biologischen System bestätigt werden. Gewächshausproben zeigten mit einem Anteil von  $0,76 \pm 0,05$  % einen signifikant höherer Anteil im Vergleich zu Freilandproben mit lediglich  $0,25 \pm 0,03$  %. Ähnlich zum 7-*cis*-Lycopin ist die Stabilität dieses Isomers nur unter Gewächshausbedingungen gegeben.

Die praktische Relevanz wurde durch die Ausweitung der Isomerenanalytik auf Handelsproben unterstrichen. Der Großteil der untersuchten Spinatproben (frisch und gefroren) konnte dem Freiland-Anbau zugeordnet werden. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit dem europäischen Markt, auf dem der Anbau in Gewächshäusern nur eine untergeordnete Rolle spielt. Insgesamt 6 der 80 untersuchten Proben fielen durch hohe Anteile an 9,13-di-*cis*- $\beta$ -Carotin auf und wurden dem Gewächshausanbau zugeordnet. Dabei handelte es sich um 3 tiefgekühlte Proben aus der Region Flanders (Belgien), deren Agrarwirtschaft durch intensiven Gewächshausanbau geprägt ist.<sup>116</sup> Bei den verbleibenden Proben handelte es sich um frischen Spinat italienischen Ursprungs mit einem sehr späten Erntezeitpunkt (3. Dezember). Auf Grundlage der Isomerenzusammensetzung und der Herkunft bzw. dem Erntezeitpunkt liegt bei diesen Proben die Vermutung nahe, dass es sich tatsächlich um im Gewächshaus kultivierten Spinat handelt. Dieser Sachverhalt beweist die Anwendbarkeit der etablierten Methode zur Untersuchungen von Realproben. Des Weiteren konnte eine klare Abgrenzung von tiefgekühlten Spinatproben anhand von signifikant höheren Anteilen an 13-*cis*- und 15-*cis*- $\beta$ -Carotin im Vergleich zu allen anderen Gruppen nachgewiesen werden. Dies ist auf das industrielle Blanchieren zurückzuführen, das zur Haltbarmachung der Tiefkühlware dient.<sup>117</sup> Erhöhte Gehalte beider Isomere wurden in thermisch behandelten Lebensmitteln bereits hinreichend nachgewiesen,<sup>41,42,45</sup> die Anwendung und explizite Abgrenzung verbraucherrelevanter Proben ist dagegen neu.

Im Gegensatz zum Spinat konnte eine Unterscheidung der Anbaubedingungen für Tomaten aus dem Handel nicht ohne weiteres vorgenommen werden (siehe Tab. 3). Einerseits deutet der gemittelte Gehalt an 5-*cis*-Lycopin eher auf einen Gewächshausanbau hin, andererseits spricht der Anteil an 7-*cis* für Freiland-Bedingungen. Weiterführende Untersuchungen



konnten belegen, dass der Isomerisierungsgrad stark vom Kaliber der Tomaten abhängt. So stieg der Anteil an 5-*cis*-Lycopin, je kleiner das Kaliber der untersuchten Tomate war. Andererseits konnten in Fleischtomaten deutlich größere Mengen an 7-*cis*-Lycopin nachgewiesen werden. Dies korreliert mit der relativen Penetrationstiefe der UV-Strahlung, da diese bei Sorten mit kleinem Kaliber deutlich größer im Vergleich zu Fleischtomaten ausfällt. Es resultieren eine stärkere Bildung von energetisch gehindertem 5-*cis*- sowie ein Abbau von labilem 7-*cis*-Lycopin. Eine genaue Zuordnung der Handelsproben ist demnach ohne Vergleichsdaten zu verschiedenen Varietäten und Kalibern nicht möglich. Zudem wurden für den Vergleich der eigen angebauten, authentischen Tomaten ausschließlich reife und vollständig rote Früchte untersucht. Der Reifegrad bei der Ernte und die Bedingungen während Transport und Lagerung der Handelsproben können dagegen schwer kontrolliert werden.

Insgesamt konnte am Beispiel von Spinat und Tomaten die Bestimmung der Carotinoid-Isomerenzusammensetzung als eine potente Methode zur Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln etabliert werden. Die vorliegende Arbeit stellt damit die Grundlage zur Untersuchung weiterer Lycopin- und  $\beta$ -Carotin-haltiger Lebensmittel dar.

(Ende Auszug aus *Lebensmittelchemie*, 2014, 68, 83 – 87)

Entgegen den Erwartungen aus den bisherigen Untersuchungen war eine Differenzierung der Anbaubedingungen von Tomaten anhand der  $\beta$ -Carotin-Isomerenzusammensetzung nicht möglich. Im Vergleich zu Gewächstomaten zeigten im Freiland kultivierte Tomaten einen signifikant höheren Gehalt an 9,13-di-*cis*- $\beta$ -Carotin sowie einen signifikant niedrigeren Anteil an 9-*cis*- $\beta$ -Carotin (Tab. 4). Damit wurden für diese photochemischen Marker genau entgegengesetzte Ergebnisse im Vergleich zu authentischen Spinatproben nachgewiesen. Die Untersuchungen weiterer Gemüse- und Obstproben zeigte, dass Lycopin-haltige Lebensmittel generell einen niedrigeren Isomerisierungsgrad an  $\beta$ -Carotin aufweisen. So wurden in Lycopin-freien Gemüsen prinzipiell geringere Anteile an all-*trans*- $\beta$ -Carotin nachgewiesen, wobei 9-*cis*- $\beta$ -Carotin mit Gehalten zwischen 6 und 10 % gleichzeitig als dominantes *cis*-Isomer identifiziert wurde. In Lycopin-reichen Lebensmitteln spielte das 9-*cis*-Isomer mit 0,65 bis 3,83 % nur eine untergeordnete Rolle, sodass 13-*cis*- $\beta$ -Carotin das mengenmäßig bedeutsamste Isomer darstellte. Dementsprechend scheint Lycopin einen entscheidenden Einfluss auf die Isomerisierung (Ausmaß und Muster) von  $\beta$ -Carotin auszuüben.

**Tab. 4:  $\beta$ -Carotin-Isomerenzusammensetzung verschiedener Obst- und Gemüseproben**

Proben	Anteile an $\beta$ -Carotin in %				
	all- <i>trans</i>	9- <i>cis</i>	9,13-di- <i>cis</i>	13- <i>cis</i>	15- <i>cis</i>
Tomate (FL, 55)	85,58 ± 0,85	2,76 ± 0,10	1,81 ± 0,12	4,76 ± 0,48	4,51 ± 0,51
Tomate (GH, 49)	85,68 ± 1,09	3,15 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,38 <sup>b</sup>	3,98 ± 0,43	4,90 ± 0,73
Spinat (210)	86,37 ± 0,19	7,37 ± 0,16	0,42 ± 0,04	4,42 ± 0,11	0,67 ± 0,03
Zucchini (21)	84,01 ± 1,83	8,36 ± 0,56	1,34 ± 0,64	5,01 ± 1,12	0,84 ± 0,13
Aubergine (8)	85,44 ± 1,84	7,67 ± 1,08	0,59 ± 0,10	5,06 ± 0,87	0,79 ± 0,11
Brokkoli (8)	84,13 ± 1,11	9,67 ± 0,76	0,57 ± 0,34	4,79 ± 0,75	0,67 ± 0,03
Wassermelone (8)	91,28 ± 3,88	2,89 ± 0,79	n. b.	5,83 ± 3,59	n. b.
Grapefruit (8)	89,80 ± 1,81	0,65 ± 0,14	2,05 ± 0,63	4,73 ± 0,54	2,77 ± 1,00

<sup>a</sup> signifikanter Unterschied ( $\alpha = 0,01$ ) im Vergleich zu Freiland, berechnet nach t-Test, <sup>b</sup> signifikanter Unterschied ( $\alpha = 0,01$ ) im Vergleich zu Freiland, berechnet nach WELCH-Test, n. b. = nicht bestimmbar

Lycopin besitzt bekanntermaßen die größte antioxidative Kapazität unter allen natürlichen Carotinoiden und ist aufgrund der leichten Oxidierbarkeit in der Lage andere Carotinoide vor freien Radikalen zu schützen.<sup>51,57,118</sup> Diese in der Literatur beschriebene Schutz- bzw. Reparaturfunktion kann als mögliche Ursache für den geringeren  $\beta$ -Carotin-Isomeren-Anteil von Lycopin-haltigen Lebensmitteln angesehen werden. Edge et al. beschrieben einen Elektronen-Transfer von verschiedenen Carotinoid-Radikalkationen auf Lycopin, sodass deren Grundzustände wiederhergestellt werden konnten.<sup>118</sup> Weitere synergistische Effekte wurden bisher lediglich zwischen Carotinoiden und anderen Antioxidantien, wie vor allem  $\alpha$ -Tocopherol und Ascorbinsäure, nachgewiesen.<sup>119–121</sup> Gleichzeitig wurden während dieser Studien keine Isomerisierungsprozesse in Betracht gezogen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin durch die Anwesenheit von Lycopin effektiv reduziert oder sogar vollständig verhindert. Dieser erstmals beschriebene Effekt stellt eine mögliche Erklärung für die typischen Isomerenmuster von  $\beta$ -Carotin und Lycopin in biologischen Proben (Tab. 4) und *in vivo* dar. Gleichzeitig erfolgte eine detaillierte Beschreibung der chemisch induzierten Isomerisierung von Carotinoiden, die in der Literatur bisher nur in sehr geringem Umfang beschrieben wurde.

Der Nachweis dieser synergistischen Effekte zwischen Lycopin und  $\beta$ -Carotin erfolgte über einfache Modellsysteme. Dabei wurde die Isomerisierung von Einzel- und Mischstandards durch Singulett-Sauerstoff oder stabile ABTS-Radikale ausgelöst, wobei der Verlauf mittels HPLC-UV verfolgt wurde. Singulett-Sauerstoff wurde unter milden Reaktionsbedingungen aus dem thermolabilen 1,4-Dimethylnaphthalin-1,4-endoperoxid generiert. Dabei wurde die freigesetzte Menge an molekularem Singulett-Sauerstoff mittels <sup>1</sup>H-NMR quantitativ bestimmt. Zunächst wurde der prinzipielle Isomerisierungsverlauf von  $\beta$ -Carotin und Lycopin in Abhängigkeit von den eingesetzten Mengen an Singulett-Sauerstoff verfolgt, wobei ausschließlich physikalisches Quenching beobachtet wurde. In Übereinstimmung zur Literatur wurde kein chemisches Quenching und ein damit verbundener oxidativer Abbau der Carotinoide nachgewiesen.<sup>3,122</sup>

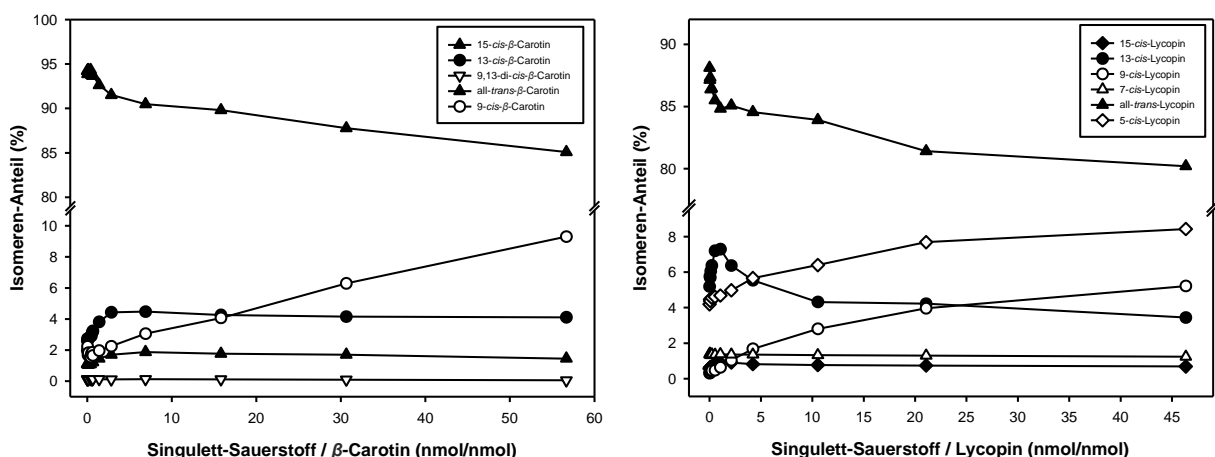
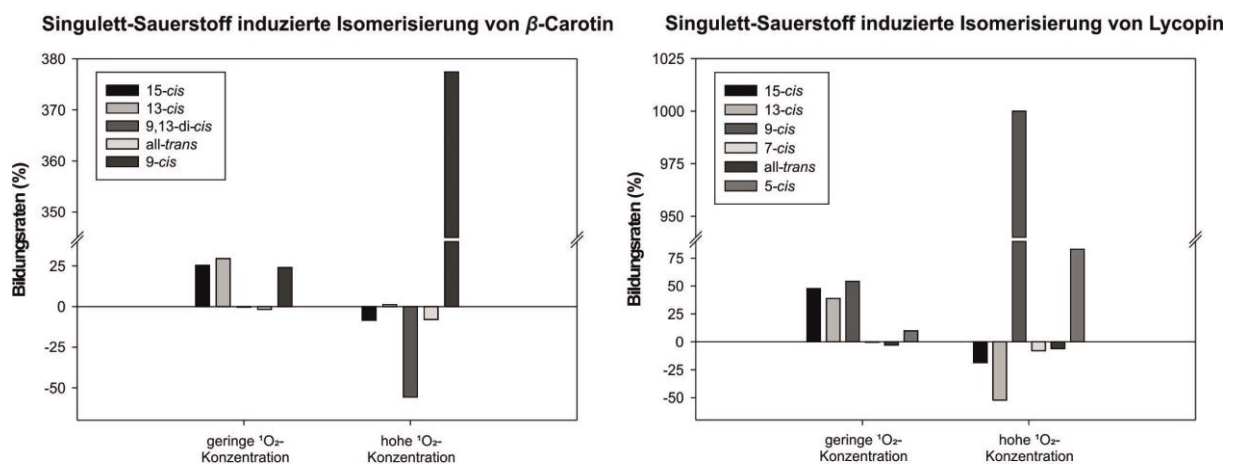


Abb. 14: Singulett-Sauerstoff induzierte Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin und Lycopin

Die Inkubation von Lycopin und Singulett-Sauerstoff resultierte in einer Isomerisierung, die in Abhängigkeit der <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Konzentrationen durch die Ausbildung unterschiedlicher Isomerenprofile charakterisiert wurde (Abb. 14, rechte Darstellung). Bei sehr niedrigen <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-

Konzentrationen, d.h. bei Umsetzungen von bis zu 2 nmol  $^1\text{O}_2$  pro nmol Carotinoid, dominierte die Bildung von 15-*cis*-, 13-*cis*- sowie 9-*cis*-Lycopin. Dabei wurden Bildungsraten zwischen 40 und 55 % nachgewiesen, während alle anderen Isomere nahezu unverändert vorlagen (< 10 %). Mit steigenden Mengen an  $^1\text{O}_2$  wurden die zuvor gebildeten 15-*cis*- und 13-*cis*-Isomere effektiv abgebaut, wohingegen die thermodynamisch kontrollierten Reaktionsprodukte immer mehr an Bedeutung gewannen. Dementsprechend verdoppelte sich der Anteil an 5-*cis*-Lycopin in Gegenwart hoher  $^1\text{O}_2$ -Konzentrationen und stellte unter diesen Bedingungen das mengenmäßig bedeutsamste *cis*-Isomer dar. Insgesamt betrachtet wurde allerdings 9-*cis*-Lycopin als das charakteristischste Isomer für die Singulett-Sauerstoff-induzierte Isomerisierung identifiziert, da hier die mit Abstand stärkste Bildungsrate beobachtet wurde. Nach einem geringen Anstieg während der Umsetzungen mit geringen Mengen an Singulett-Sauerstoff wurde der Anteil des 9-*cis*-Isomers mit steigenden Singulett-Sauerstoff-Konzentrationen verzehnfacht. Ähnliche Bildungsraten wurden bereits unter photochemischen und thermischen Bedingungen beobachtet, sodass 9-*cis*-Lycopin nicht als Markerstruktur für das physikalische Quenching angesehen werden kann. Insgesamt stellt der Isomerisierungsverlauf eine Kombination der bisher beschriebenen Prozesse dar. Der Umsatz von Carotinoiden mit geringen Mengen an  $^1\text{O}_2$  resultierte in ähnlichen Verläufe zur thermischen Isomerisierung. Reaktionen mit einem deutlichen Überschuss an  $^1\text{O}_2$  gegenüber dem vorliegenden Carotinoid wiesen dagegen starke Ähnlichkeiten zur photochemischen Isomerisierung auf.



**Abb. 15: Bildungsraten von Carotinoid-Isomeren während der  $^1\text{O}_2$  induzierten Isomerisierung**

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Umsetzung von  $\beta$ -Carotin mit  $^1\text{O}_2$  festgestellt. Niedrige Konzentrationen an  $^1\text{O}_2$  führten zu einer dominanten Bildung von 13-*cis*-, 15-*cis*- und 9-*cis*- $\beta$ -Carotin, wobei auch hier die Isomerisierung nahezu identisch zum thermisch induzierten Prozess verlief. Größere Mengen an  $^1\text{O}_2$  führten bevorzugt zur Bildung von 9-*cis*- $\beta$ -Carotin, wohingegen sich für die kinetisch kontrollierten Reaktionsprodukte (13-*cis*, 15-*cis*) bereits Gleichgewichtskonzentrationen einstellten. Zwar wurde für das 9,13-di-*cis*-Isomer ein signifikanter Abbau festgestellt, allerdings ist dieser aufgrund der sehr geringen Isomerenanteile (< 0,05 %) kaum relevant. Insgesamt beschränkt sich die Isomerisierung bei hohen  $^1\text{O}_2$ -Konzentrationen auf eine direkte Umwandlung von all-*trans*- zu 9-*cis*- $\beta$ -Carotin, da für alle anderen Isomere keine signifikanten Änderungen während der Umsetzung festgestellt

wurden. Der drastische Unterschied im Isomerenmuster in Abhängigkeit der vorliegenden Konzentration an Singulett-Sauerstoff wird in Abb. 15 noch stärker verdeutlicht.

Im Anschluss daran wurden Mischstandards, d. h. Gemische aus  $\beta$ -Carotin und Lycopin, unter gleichbleibenden Bedingungen inkubiert. Ein Vergleich der Bildungsraten aus Einzel- und Mischinkubationen resultierte in signifikanten Unterschieden, die in Tab. 5 zusammengefasst wurden. Dabei wurden die Bildungsraten anhand der Anstiege im Isomerisierungsverlauf mittels linearer Regression ermittelt. Für die Bestimmung wurden ausschließlich die Bereiche berücksichtigt, in denen auch tatsächlich ein nahezu linearer Umsatz erfolgte. Demnach wurde eine lineare Regression für 13-*cis*- und 15-*cis*- $\beta$ -Carotin lediglich während der Startphase der Reaktion durchgeführt, d.h. in der Regel bis zum Erreichen des maximalen Isomeren-Anteils. Im Fall von 9-*cis*- $\beta$ -Carotin wurde der vollständige Reaktionsverlauf berücksichtigt, da die Bildung in allen Modellsystemen über den gesamten Zeitraum als linear angesehen werden konnte. Gleichmaßen erfolgte die Bestimmung der Abbauraten von all-*trans*- $\beta$ -Carotin. Hier müssen die berechneten Daten als Näherungswerte angesehen werden, da vor allem zu Beginn der Reaktion stärkere Umsatzraten verzeichnet wurden (bedingt durch die Bildung der kinetisch kontrollierten Produkte).

**Tab. 5: Bildungsraten von  $\beta$ -Carotin-Isomeren in Abhängigkeit von verschiedenen Lycopin-Anteilen**

Lycopin-Anteil	Bildungsraten der $\beta$ -Carotin-Isomere (% / nmol $^1\text{O}_2$ pro nmol Carotinoid)			
	all- <i>trans</i>	9- <i>cis</i>	13- <i>cis</i>	15- <i>cis</i>
0,0 %	-0,1589	0,1430	0,6864	0,3263
38,2 %	-0,1417	0,1046	0,7429	0,4774
55,8 %	-0,0942	0,0794	0,7290	0,2338
63,9 %	-0,0903	0,0590	0,6439	0,0826
73,2 %	-0,0757	0,0512	0,3063	0,0542

Die Auswertung der Ergebnisse beweist, dass Lycopin einen entscheidenden Einfluss auf das Isomerenmuster sowie den Isomerisierungsgrad von  $\beta$ -Carotin ausübt. Dabei führten ansteigende Lycopin-Anteile zu einer Reduzierung der Bildungsraten von all-*trans*- und 9-*cis*- $\beta$ -Carotin. So wurden die Bildungsraten in Gegenwart von 38,2 % Lycopin bereits um 11 % für all-*trans* sowie um 27 % für 9-*cis* abgeschwächt. Deutlich größere Lycopin-Anteile von 73,2 % resultierten sogar in einer Abschwächung um 52 % (all-*trans*) und 64 % (9-*cis*). Im Gegensatz dazu wurden für die zentralen *cis*-Isomere bei geringen Anteilen von Lycopin (38,2 %) zunächst ansteigende Bildungsraten beobachtet. Im Fall von 15-*cis*- $\beta$ -Carotin wurde die Bildungsrate um nahezu 50 % gesteigert, während für 13-*cis* lediglich ein Anstieg um 8 % nachgewiesen wurde. Erst in Gegenwart von etwa 60 % Lycopin wurden auch für diese Isomere abgeschwächte Bildungsraten im Vergleich zur Inkubation von reinem  $\beta$ -Carotin festgestellt. Erst ein klarer Überschuss an Lycopin (73,2 % Anteil) resultierte in deutlich reduzierten Bildungsraten, die in diesem Fall durch eine Abschwächung um 55 % (13-*cis*) und 83 % (15-*cis*) charakterisiert wurden. Die beobachteten Effekte können anhand der Eigenschaften des Lycopins als stärkster  $^1\text{O}_2$ -Quencher innerhalb aller natürlichen Carotinoide erklärt werden.<sup>61</sup> Demzufolge führte Lycopin zur Absenkung des Energieeintrags innerhalb des Isomerisierungsprozesses von  $\beta$ -Carotin. Dadurch erfolgte bei geringen Lycopin-Anteilen eine Verschiebung des Isomerisierungsmusters zu den kinetisch kontrollierten Reaktionsprodukten. Während die Bildung des energetisch gehinderten 9-*cis*- $\beta$ -Carotins bereits abgeschwächt wurde, bildeten sich zu größeren Anteilen die durch geringe

Aktivierungsenergien gekennzeichneten 15-*cis*- und 13-*cis*-Isomere. Mit steigenden Lycopin-Anteilen wurde der Energieeintrag soweit abgesenkt, dass die benötigte Aktivierungsenergie für die Bildung der zentralen *cis*-Isomere nur noch in deutlich geringerem Ausmaß aufgebracht werden konnte. Damit stellt Lycopin einen effektiven Schutz vor Singulett-Sauerstoff induzierten Isomerisierungsprozessen anderer Carotinoide dar, wodurch unter anderem die biologisch aktive all-*trans*-Konfiguration des  $\beta$ -Carotins - und somit dessen Pro-Vitamin-A-Aktivität - erhalten bleibt.<sup>123</sup>

Um den beobachteten synergistischen Effekt zwischen Lycopin und  $\beta$ -Carotin zu bestätigen, wurde zusätzlich der durch Radikale induzierte Isomerisierungsprozess detailliert untersucht. In Anlehnung an Özyürek et al. wurden in diesem Modellsystem zunächst definierte Mengen an stabilen Radikalen durch die Inkubation von ABTS, Wasserstoffperoxid und Meerrettich-Peroxidase (HRP) generiert.<sup>124</sup> Im Anschluss wurden die Carotinoid-Standards, als Einzelverbindung oder Kombination, mit der Radikal-Lösung umgesetzt. Nach Extraktion der Carotinoide wurde die Isomerenzusammensetzung in Abhängigkeit zu der eingesetzten Menge an Radikalen mittels HPLC-UV verfolgt. Zusätzlich erfolgte eine quantitative Bestimmung der Carotinoid-Gehalte mittels Photometrie, um die ablaufenden Abbauprozesse zu beschreiben.

Im Gegensatz zur Reaktion mit Singulett-Sauerstoff gestaltet sich die Umsetzung von Carotinoiden mit freien Radikalen als deutlich komplexerer Prozess, der vor allem von den Eigenschaften der radikalischen Strukturen abhängt. Im Allgemeinen werden drei verschiedene Reaktionsmechanismen vorgeschlagen, die zu einer Vielzahl von Folgeprodukten führen.<sup>57</sup> Demnach dominiert im Gegensatz zur Reaktion mit Singulett-Sauerstoff das chemische Quenching, wodurch es zum oxidativen Abbau der Carotinoide kommt.<sup>79,122</sup> Als Folgeprodukte wurden in zahlreichen Studien vor allem Epoxide, Peroxide, Aldehyde und Ketone nachgewiesen.<sup>73,74,125</sup> Da das physikalische Quenching während der Umsetzung von Carotinoiden mit freien Radikalen laut Literatur nur von untergeordneter Bedeutung ist, existieren bisher nur wenige Untersuchungen zum Isomerisierungsprozess, der während dieser Reaktionen auftreten kann.<sup>86,87,89</sup>

Während der Inkubation von  $\beta$ -Carotin und Lycopin mit ABTS-Radikalen wurde ein starker Abbau der Carotinoide beobachtet, sodass die Ergebnisse aus der Literatur bestätigt wurden. Dabei unterlag Lycopin einem stärkeren Abbauprozess im Vergleich zu  $\beta$ -Carotin. Beispielsweise wurden nach der Umsetzung von Lycopin mit 0,9 eq. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABTS lediglich 44 % der Ausgangskonzentration nachgewiesen, während bei ähnlichen Verhältnissen noch 64 % der ursprünglichen Menge an  $\beta$ -Carotin vorhanden waren. Gleichzeitig führten steigende Radikal-Konzentrationen zum vollständigen Abbau von Lycopin, wohingegen  $\beta$ -Carotin auch beim Einsatz von 2,5 eq. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABTS mit etwa 50 % der Ausgangskonzentration nachgewiesen wurde. Da Lycopin die größte antioxidative Kapazität unter allen natürlichen Carotinoiden besitzt,<sup>61</sup> kann diese Verbindung im Vergleich zu anderen leichter oxidiert werden.<sup>118</sup> Somit wird auch der Elektronen-Transfer mit freien Radikalen erleichtert, wodurch ein stärkerer Lycopin-Abbau induziert wird. Diese Beobachtungen werden durch Studien von Mortensen et al. bestätigt. In diesem Fall führte die Umsetzung mit Phenoxyl-Radikalen zu einem Lycopin-Abbau von 38 %, während  $\beta$ -Carotin zu lediglich 10 %

umgesetzt wurde.<sup>126</sup> Die Charakterisierung und Identifizierung von entstehenden Abbauprodukten stand dabei nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit.

In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem das physikalische Quenching während der Reaktion von freien Radikalen mit  $\beta$ -Carotin und Lycopin betrachtet, da dieser Isomerisierungsprozess bisher nicht im Detail beschrieben wurde. Im Gegensatz zur thermischen oder photochemischen Isomerisierung wurden während des physikalischen Quenchings nur wenige mengenmäßig bedeutsame *cis*-Isomere identifiziert. Die Inkubation von *all-trans*- $\beta$ -Carotin mit ABTS-Radikalen führte nach einer kurzen Induktionsphase zu einer dominanten Bildung der 13-*cis*-Konfiguration. Im fortgeschrittenen Reaktionsverlauf strebte dieses Isomer einer Gleichgewichtskonzentration von etwa 23 % entgegen. Ein ähnlicher Bildungsverlauf wurde für 15-*cis*- $\beta$ -Carotin beobachtet, wobei eine deutlich geringe Endkonzentration von etwa 2 % erreicht wurde. Im Gegensatz dazu wurde das 9-*cis*-Isomer über den gesamten Versuchsaufbau linear gebildet und erreichte einen Anteil von 5,1 %. Im Vergleich zum thermischen und photochemischen Prozess wurde ein besonders starker Abbau von *all-trans*- $\beta$ -Carotin (-25,0 % abs.) festgestellt, wobei dieser vor allem in einem Anstieg von 13-*cis* (+19,3 %) resultierte. Mögliche Reaktionsmechanismen zwischen ABTS-Radikalen und  $\beta$ -Carotin wurden in einer schematischen Darstellung unter Abb. 16 zusammengefasst.

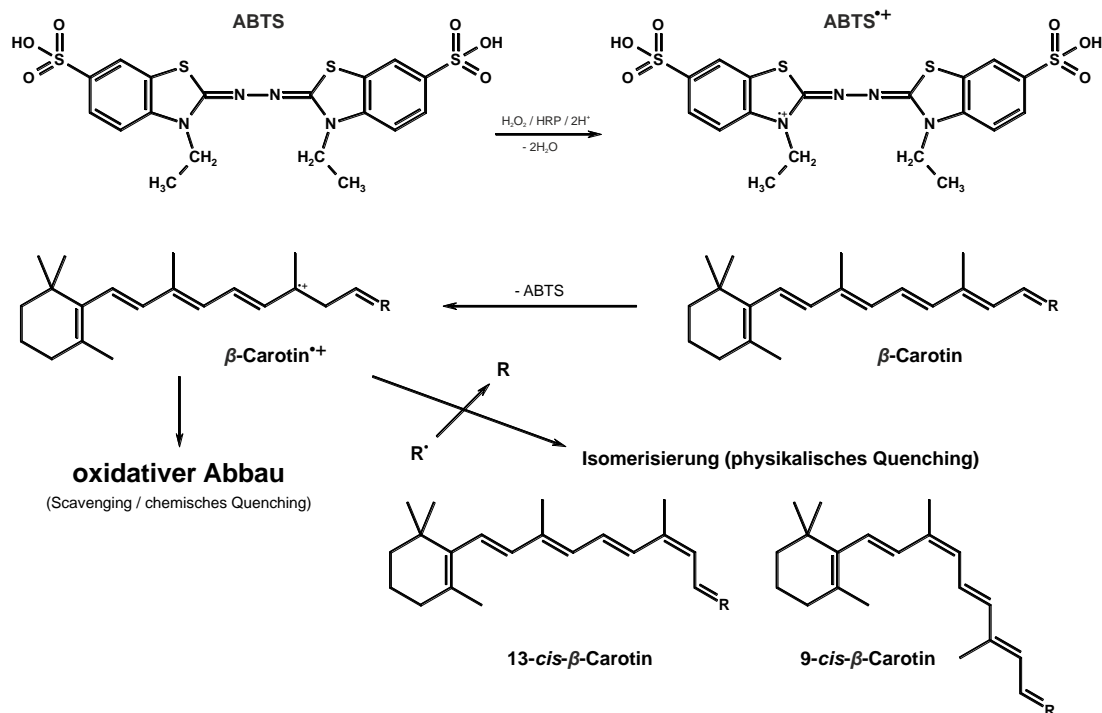


Abb. 16: Schematischer Reaktionsverlauf von  $\beta$ -Carotin mit ABTS-Radikalen

Ein vergleichbarer Verlauf wurde im Isomerenmuster während der radikalischen Reaktion mit Lycopin festgestellt. Auch hier war das physikalische Quenching durch einen besonders starken Abbau der *all-trans*-Konfiguration geprägt, d.h. nach einer kurzen Induktionsphase wurde der Isomeren-Anteil von 94,4 % sehr schnell auf 67,4 % reduziert. Im Gegensatz zum  $\beta$ -Carotin wurde keine Annäherung an eine Gleichgewichtskonzentration beobachtet. Allerdings konnte der Isomerisierungsverlauf durch den vollständigen oxidativen Abbau des

Lycopins nicht über den gesamten Inkubationsbereich verfolgt werden. Ähnlich zu  $\beta$ -Carotin wurden auch hier erhebliche Mengen des 13-*cis*-Isomers gebildet. Bereits in Gegenwart von geringen Radikal-Konzentrationen wurde ein Anteil von 18,1 % erreicht. Auch bei diesem Wert handelt es sich lediglich um den maximalen Anteil der nachgewiesen konnte, obwohl bis zum Erreichen dieser Konzentration noch kein Abflachen der Bildungsrate beobachtet wurde. Neben der dominanten Bildung von 13-*cis*-Lycopin wurden auch signifikante Anstiege der 15-*cis*- und 5-*cis*-Isomere festgestellt. Dabei stieg der Anteil für 15-*cis* von 0,1 auf 4,9 % an, wohingegen der 5-*cis*-Anteil lediglich um 2,6 % anstieg. Alle anderen Isomere zeigten deutlich geringere Änderungen und spielten für die chemische Isomerisierung eine untergeordnete Rolle.

Insgesamt wurden während der chemisch induzierten Isomerisierung von Lycopin und  $\beta$ -Carotin bevorzugt die 13-*cis*-Isomere gebildet (Abb. 17). Derartig hohe Anteile wurden bei anderen Isomerisierungsprozessen nicht erzeugt, sodass hier von einem charakteristischen Bildungsverlauf gesprochen werden kann. Darüber hinaus waren andere *cis*-Isomere von geringerer Bedeutung. Lediglich 9-*cis*- $\beta$ -Carotin sowie 15-*cis*- und 5-*cis*-Lycopin entstanden in nennenswerten Mengen. Damit wurden während der chemischen Isomerisierung nahezu ausschließlich *cis*-Isomere gebildet, die eine Methyl-Substitution an der ausgebildeten *cis*-Doppelbindung aufwiesen. Dies begründet sich durch die höhere Stabilität von tertiären Radikalen im Vergleich zu sekundären oder primären Strukturen. Damit stellen die durch Elektronen-Transfer oder Protonen-Abstraktion entstehenden Carotinoid-Radikale an Position C5, C9 und C13 die stabilsten Intermediate dar. Daraus resultieren während der Radikal-Abbruchreaktion die entsprechenden *cis*-Isomere.

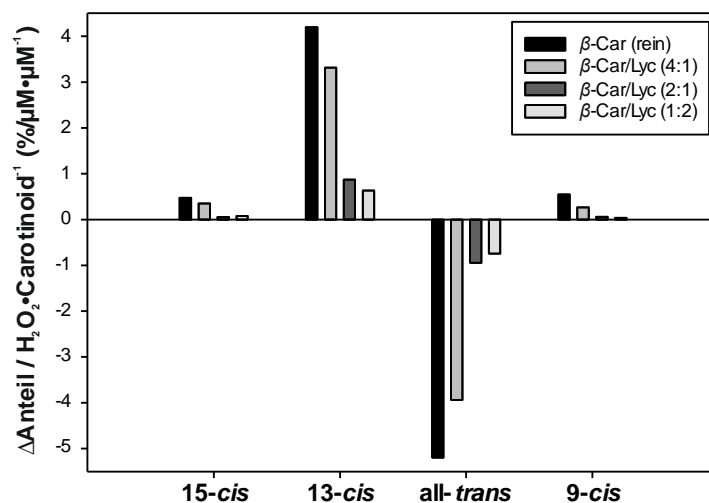


Abb. 17: Änderungen den Bildungsrate von  $\beta$ -Carotin-Isomeren mit steigenden Anteilen an Lycopin

Der Beginn der Isomerisierung (signifikante Änderung der Isomeren-Anteile) erfolgte dabei keinesfalls zufällig, sondern war stark von der verbleibenden Lycopin-Konzentration abhängig. Solange entsprechende Mengen an Lycopin im System vorhanden waren, wurde die Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin effektiv verzögert oder sogar verhindert. Nachdem etwa 60 bis 70 % des ursprünglich eingesetzten Lycopins abgebaut wurde, setzte der zuvor während der Einzelinkubation beobachtete Isomerisierungsverlauf von  $\beta$ -Carotin ein. Demzufolge genügten die verbleibenden Mengen an Lycopin nicht aus, um die steigenden Konzentrationen an freien Radikalen abfangen zu können und so die Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin zu

verhindern. Dennoch stellt Lycopin einen effektiven Schutz vor der chemischen Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin dar, solange es in ausreichenden Mengen im System enthalten ist.

Mit dieser Arbeit wurde Lycopin eine in dieser Form neuartige Schutzfunktion nachgewiesen, indem es die chemische Isomerisierung von all-*trans*- $\beta$ -Carotin stark reduziert (in Gegenwart von Singulett-Sauerstoff) oder sogar verhindert (in Gegenwart freier Radikale). Diese protektive Eigenschaft stellt eine potente Möglichkeit zur Erklärung der unterschiedlichen Isomerenmuster von biologischen Proben sowie *in vivo* dar. Gleichzeitig erklärt dieser Effekt, warum die Anbaubedingungen von Tomaten nicht anhand der  $\beta$ -Carotin-Isomerenverteilung unterschieden werden konnten. Das Lycopin der Tomaten verhinderte eine charakteristische licht-induzierte Isomerisierung des  $\beta$ -Carotins, sodass das Isomerenmuster selbst innerhalb der authentischen Freiland- und Gewächshausproben nicht voneinander zu unterscheiden war. In gleicher Weise begründen sich erhöhte Anteile an *cis*- $\beta$ -Carotin-Isomeren in Lycopin-freiem Obst und Gemüse, da hier die Schutzfunktion im Vergleich zu Lycopin-haltigen Proben nicht gegeben ist.

Ebenso lassen sich die beobachteten Effekte auf humane Plasma-Proben übertragen. Dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Plasma-Proben von 15 gesunden Probanden auf ihre Carotinoid-Konzentration und Isomerenmuster untersucht. Zur Probenaufarbeitung wurde ein Protokoll nach Schierle et al. angewendet und die gewonnenen Carotinoid-Extrakte mit der etablierten HPLC-UV-Analytik vermessen.<sup>44</sup>

**Tab. 6: Carotinoid-Konzentrationen und Isomerenzusammensetzung in humanem Plasma (15 Probanden)**

Analyt	Gehalte / Anteile		Bereich	
	Mittelwert	von	Bis	
$\alpha$ -Carotin	0,42 $\pm$ 0,20 nmol/mL	0,13 nmol/mL	0,87 nmol/mL	
$\beta$ -Carotin	1,05 $\pm$ 0,32 nmol/mL	0,26 nmol/mL	2,50 nmol/mL	
13- <i>cis</i>	8,95 $\pm$ 2,24 %	5,12 %	11,26 %	
all- <i>trans</i>	89,33 $\pm$ 2,23 %	86,07 %	93,71 %	
9- <i>cis</i>	1,72 $\pm$ 0,35 %	0,92 %	2,69 %	
Lycopin	2,84 $\pm$ 0,34 nmol/mL	1,80 nmol/mL	4,30 nmol/mL	
15- <i>cis</i>	1,49 $\pm$ 0,13 %	1,04 %	1,81 %	
13- <i>cis</i>	14,14 $\pm$ 0,89 %	10,33 %	17,10 %	
9- <i>cis</i>	1,47 $\pm$ 0,16 %	1,08 %	2,15 %	
7- <i>cis</i>	7,76 $\pm$ 0,52 %	6,08 %	9,24 %	
all- <i>trans</i>	37,27 $\pm$ 1,93 %	32,70 %	42,62 %	
5- <i>cis</i>	29,77 $\pm$ 1,50 %	25,00 %	33,25 %	

Die Studie zeigte in Übereinstimmung zur aktuellen Literatur, dass 9-*cis*- $\beta$ -Carotin in humanem Plasma nahezu keine Relevanz besitzt, da auch innerhalb dieser Probandengruppe ein maximaler Isomeren-Anteil von lediglich 2,69 % nachgewiesen wurde. 13-*cis*- $\beta$ -Carotin stellte das dominante *cis*-Isomer dar, hier lag der Isomeren-Anteil im Mittel bei 8,95 %. Stahl et al. beobachteten ein ähnliches Isomerenmuster in humanem Plasma, wobei der Anteil an 13-*cis* bei allen Probanden unterhalb von 7 % lag.<sup>93</sup> Dementsprechend dominierte die biologisch aktive *trans*-Konfiguration mit einem Anteil von stets über 86 %. Im Gegensatz dazu wurde all-*trans*-Lycopin mit einem vergleichsweise geringen Anteil von 37,27 % nachgewiesen. Vor allem 13-*cis*- und 5-*cis*-Lycopin stellten mit 14,14 % und 29,77 % die mengenmäßig bedeutsamsten *cis*-Isomere dar. Diese Studie unterstreicht nochmals die



Schutzfunktion des Lycopins, das in Gegenwart von oxidativem Stress isomerisiert und  $\beta$ -Carotin nahezu ausschließlich in der *all-trans*-Form hält. Zudem können Unterschiede in den *cis*-Isomerenmustern in unterschiedlichen menschlichen Geweben anhand der aufgestellten Theorie begründet werden. Im Vergleich zu stoffwechselstarken Organen wie Leber, Niere oder Nebenniere wurde in einer Studie von Stahl et al. ein signifikant höherer Anteil von *all-trans*-Lycopin (etwa 65 %) in Testikeln nachgewiesen.<sup>93</sup> Im Gegensatz dazu wurden in den Lymphen die niedrigsten *all-trans*-Anteile mit lediglich 22,6 % nachgewiesen.<sup>103</sup> Dagegen wurden für *all-trans*- $\beta$ -Carotin in allen untersuchten Geweben nahezu identische Isomeren-Anteile ermittelt.<sup>93</sup> Diese Beobachtungen bestätigen die Schutzfunktion des Lycopins gegenüber reaktiven Spezies, sodass in allen menschlichen Geweben die *all-trans*-Konfiguration des  $\beta$ -Carotins aufrechterhalten wird, solange parallel Lycopin vorhanden ist. Je nach Stoffwechselrate und dem damit verbundenen oxidativen Stress liegt dieses in unterschiedlichem Isomerisierungsgrad vor, wobei stoffwechselarme Gewebe prinzipiell einen höheren Anteil an *all-trans*-Lycopin aufweisen sollten. Andere bestehende Hypothesen, wie eine bessere Bioverfügbarkeit von *cis*-Lycopin-Isomeren oder einem Isomerisierungsprozess im Magen-Darm-Trakt sind dagegen nicht in der Lage die bestehende Diskrepanz der Isomerenmuster von Lycopin und  $\beta$ -Carotin beziehungsweise innerhalb der verschiedenen Gewebe hinreichend zu erklären.<sup>96,97,103</sup>

Insgesamt betrachtet, sollte der neu postulierte Schutzmechanismus in zukünftigen Studien hinsichtlich der Carotinoid-Isomerenmuster in biologischen Systemen und *in vivo* als wichtiger Parameter berücksichtigt werden. Nur unter Einbezug der aufgestellten Hypothese kann eine hinreichende Erklärung der beobachteten Diskrepanzen getroffen werden. Ein direkter Nachweis der synergistischen Effekte zwischen Lycopin und  $\beta$ -Carotin sollte in zukünftigen Studien auf *in vivo* Modelle übertragen werden.

## 4. Publikationen

### 4.1 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61, 11133 – 11139

## Photoinduced Isomerization of Lycopene and Application to Tomato Cultivation

Thomas Heymann, Julia Raeke, and Marcus A. Glomb\*

Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Strasse 2, 06120 Halle/Saale, Germany

Supporting Information

**ABSTRACT:** The present study aimed to investigate if growth conditions have an impact on the isomeric composition of lycopene in tomatoes. First a model system for photoinduced isomerization was established. Tomato extracts were irradiated with a halogen lamp, whose wavelength spectrum is close to the spectrum of daylight and thus mimics field-grown cultivation. Different optical filters were interposed between lamp and samples to simulate greenhouse conditions. 5-*cis*-Lycopene was formed preferentially while the concentration of 7-*cis*-lycopene decreased in field-grown model systems. The change of isomerization in greenhouse model systems led to a significantly different ratio. Consequently 5-*cis*- and 7-*cis*-lycopene were identified as potent markers for the differentiation of various lighting conditions during cultivation. This result was verified in biological samples. Authentic field-grown tomatoes (*var. Lycopersicon esculentum* Mill. *var. commune* L. H. Bailey "Harzfeuer") showed a significantly higher content of 5-*cis*-lycopene  $5.90 \pm 0.45\%$  compared to tomatoes of the same variety grown under electric lighting  $4.11 \pm 0.10\%$ . Additionally, the ratio of 7-*cis*-lycopene was significantly lower under field-grown conditions.

**KEYWORDS:** lycopene, isomerization, lighting, tomato cultivation, field-grown, greenhouse-grown

### INTRODUCTION

Tomatoes are one of the most important vegetables in the human diet. For example in Germany 24.9 kg, including 16.8 kg as processed products, were consumed per head in year 2010/11.<sup>1</sup> Hence tomatoes comprise the main source for lycopene in the human diet.<sup>2</sup> The importance of this carotenoid was shown by numerous investigations concerning its function and role for human health. Several studies reported that lycopene is closely associated with cardiovascular benefits and with prevention of various cancers, most notably prostate cancer.<sup>3,4</sup> These effects are most likely attributed to its structure consisting of 11 conjugated and 2 unconjugated double bonds which form the basis of the high antioxidant capacity and its function as the most effective singlet oxygen quencher of all carotenoids.<sup>5</sup> The *all-trans* configuration dominates in plant sources,<sup>4</sup> but the highly unsaturated system allows isomerization processes, so that a total of 1056 *cis*-isomers can be formed theoretically.<sup>6</sup> Isomerization of carotenoids is induced by thermal energy, light or chemical reactions.<sup>7</sup> The formed *cis*-isomers were characterized in the literature with a higher antioxidant activity and bioavailability that make processed food a better source for carotenoids in nutrition.<sup>8,9</sup> Consequently studies demonstrated an accumulation of *cis*-lycopene isomers in human serum and tissue and thus suggested potentially higher health benefits compared to *all-trans*-lycopene.<sup>8,10</sup> Nevertheless, the specific biological importance of *cis*-isomers has not been clarified so far.<sup>10</sup>

Thermal isomerization of lycopene and other carotenoids such as  $\beta$ -carotene are discussed contradictorily in the literature. Some studies showed no significant change in isomeric composition during heating of lycopene in model systems.<sup>11,12</sup> On the other hand degradation of *all-trans*-lycopene in hexane at room temperature with simultaneous

formation of predominantly 13-*cis*-, 5-*cis*- and 9-*cis*-lycopene was reported by Lambelet et al.<sup>13</sup> Among others, studies of Colle et al. and Zhang et al. confirmed the isomerization process of *all-trans*- to various *cis*-isomers during heating, while no increase of 5-*cis*-lycopene was observed.<sup>6,14</sup> Isomerization of carotenoids is a very complex process and therefore leads to disparate results depending on the reaction conditions, e.g. *all-trans*-lycopene seems to be more stable in vegetable matrix while in model systems the used solvent has an enormous influence on the progress. This makes it difficult to compare various studies.

On the other hand studies of photoinduced isomerization processes are limited and lead to nonuniform results, too. Shi et al. showed that exposure of tomato purée to light caused no change in total and in *all-trans*-lycopene, but observed a loss of *cis*-isomers.<sup>12</sup> In contrast a total loss of 13.1% of *all-trans*-lycopene paralleled by a significant formation of 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- and 15-*cis*-lycopene was illustrated in studies of Lee et al. after 144 h of storage under light.<sup>11</sup> Furthermore the understanding of photoinduced isomerization has no practical relevance so far.

The focus of the present study was to characterize the photoinduced isomerization process of lycopene in model systems in detail. Different sources of light were used, because up to now there are no studies on the influence of the wavelength used in the progress of lighting. Results were then transferred to biological systems including consumer available

Received: August 20, 2013

Revised: October 16, 2013

Accepted: October 19, 2013

Published: November 6, 2013

tomatoes. It was possible to differentiate between authentic greenhouse-grown and field-grown tomatoes.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** The following chemicals of analytical grade were commercially available: hexane, ethanol, acetone (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), potassium hydroxide (Grüssig GmbH, Filsum, Germany), butylated hydroxytoluene (Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), sodium chloride (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany),  $\beta$ -ionone (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), pseudo-ionone (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany), NMR solvents (ARMAR Chemicals, Döttingen, Switzerland). Methanol and methyl *tert*-butyl ether as HPLC solvents were purchased from Sigma-Aldrich (HPLC grade  $\geq 99.8\%$ ).

**Tomato Samples.** In this study three different groups of tomato samples were considered. In cooperation with the Leibniz Institute of Plant Biochemistry (Halle, Germany) a first set was cultivated under greenhouse conditions. Tomato plants of the variety "Harzfeuer" (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. *commune* L. H. Bailey "Harzfeuer") were sown in winter and grown under irradiation by sodium vapor lamps. Only ripe red tomatoes were harvested during the period of March to April. Until analysis whole tomatoes were stored at  $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ . In a second set tomatoes of the same variety were cultivated from April under field-grown conditions at two different locations near Halle, Germany. These tomato plants were exposed to sunlight during the complete period of growing and ripening without use of foils. From July to September only ripe and full red tomatoes were harvested. The third set of tomatoes were samples available from local markets and food stores with different origins and varieties. Altogether 74 samples of six countries (Netherlands, Germany, Spain, Belgium, Italy and Morocco) were collected and stored at  $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$  until processing. Investigations proved stability of isomeric composition during storage of intact tomatoes at  $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$  until preparation for analyses.

**Sample Preparation.** Tomato slices, defrosted or fresh material, were homogenized at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  with a mixer for 30 s under reduced light. Samples of 25 to 30 g of the resulting paste were filled into Falcon tubes and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for at least 3 to 4 days. The frozen samples were lyophilized afterward for 3 days. Extraction of carotenoids was performed according to Sadler et al.<sup>15</sup> 200 mL of hexane/ethanol/acetone (50/25/25) containing 0.01% BHT (butylated hydroxytoluene) was added to every sample. The extraction was performed by shaking the samples on an orbital shaker (170 to 180 rpm) at room temperature and under exclusion of light for 18 h. Afterward solids were separated by a filtration step. An additional saponification step was performed to separate carotenoids from simultaneously extracted fatty compounds like triglycerides. The alkaline hydrolysis also improved separation on the HPLC system. 20 mL of a 10% methanolic potassium hydroxide solution was added to the filtrate, and the mixture was shaken at room temperature for 20 h. To exclude effects induced by oxygen the organic layer was saturated with argon before. Subsequently the alkaline extract was washed 5 times each with 80 mL of a 2% sodium chloride solution to neutralize the organic layer and to remove saponification products from the carotenoid extract. The resulting orange colored organic layer was dried using a rotary evaporator (Laborota 4000, Heidolph) at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Resulting solids were dissolved in 4 mL of methyl *tert*-butyl ether and diluted accordingly 1:10 in mobile phase (methanol/MTBE, 50/40).

To exclude thermal or photoinduced isomerization processes the whole preparation was performed under reduced light using aluminum foil or dark glassware and the temperature never exceeded  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Further investigations confirmed that the native isomeric composition was not influenced during storage and all steps of preparation.

**Analytical HPLC–UV and HPLC–DAD.** A Jasco PU-2089 Plus quaternary gradient unit pump with degasser and a Jasco AS-2055 Plus autosampler (Gross-Umstadt, Germany) were used. Elution of materials was monitored by a Jasco UV-2075 Plus UV detector (Gross-Umstadt, Germany) operating at 450 nm. For DAD analyses a Jasco MD-2015 Plus detector was used. Chromatographic separations were performed on a RP-C30 column ( $5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $250 \times 4.0\text{ mm}$ , YMC

Europe, Dinslaken, Germany) connected to a C30 guard column ( $5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $10 \times 4.0\text{ mm}$ , YMC Europe, Dinslaken, Germany) using a flow rate of  $0.65\text{ mL min}^{-1}$ . The chosen column temperature was  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The mobile phase used consisted of methanol (solvent A) and methyl *tert*-butyl ether (solvent B). Samples were injected at 40% B (held 5 min), and the gradient then changed to 83% B in 50 min. Then the gradient changed to 100% B in 5 min (held 10 min) and to 40% B in 5 min (held 10 min).

**Analytical HPLC–MS<sup>2</sup>.** A Jasco PU-2080 Plus quaternary gradient pump with degasser and a Jasco AS-2057 Plus autosampler (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) were used. PR-C30 column and HPLC gradient program used were the same as for HPLC–UV measurements. Elution of carotenoids was monitored by mass detection. The mass analyses were performed using an Applied Biosystems API 4000 quadrupole instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with an API source using an atmospheric pressure chemical ionization (APCI, negative mode) interface. The LC system was connected directly to the probe of the mass spectrometer. Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas. The optimized parameters for mass spectrometry of lycopene were Q1 536.7 amu, Q3 467.6 amu, DP  $-75\text{ V}$ , CE  $-27\text{ eV}$ , CXP  $-12\text{ V}$ .  $\beta$ -Carotene showed no fragment in Q3 (Q1 536.7 amu, DP  $-60\text{ V}$ ).

**Isolation and Syntheses of Authentic Carotenoid Standards.** *all-trans*-Lycopene was isolated from tomatoes in the above-described extraction method. After extraction the dry residue was taken up in dichloromethane and precipitated with methanol. The formed precipitate was filtered off, washed with methanol and dried under argon stream. The resulting *all-trans*-lycopene standard was verified via 1D- and 2D-NMR spectra with an isomeric purity of 81% detected by HPLC–UV analyses. *5-cis*-Lycopene was synthesized according to Hengartner et al. applying a  $\text{C}_{15}+\text{C}_{10}+\text{C}_{15}$ -Wittig strategy.<sup>16</sup> The central component was provided by synthesis on the basis of Frederico et al. and Ernst et al.<sup>17,18</sup> After the final Wittig condensation 150 mg of *5-cis*-lycopene with 92% isomeric purity was obtained. The structure of the isomer was established by one- and two-dimensional NMR analyses. In contrast to Isler et al. *15-cis*-lycopene and *15-cis*- $\beta$ -carotene were also synthesized via a  $\text{C}_{15}+\text{C}_{10}+\text{C}_{15}$  route instead of the described  $\text{C}_{10}+\text{C}_{20}+\text{C}_{10}$  scheme.<sup>19</sup> The central compound 2,7-dimethylocta-2,6-dien-4-yne-1,8-dial was assembled according to Isler et al.<sup>19</sup> This compound, without the suggested chain elongation to a  $\text{C}_{20}$ -compound, was then directly coupled to the respective  $\text{C}_{15}$ -Wittig salts. To obtain *15-cis*-lycopene the same  $\text{C}_{15}$ -salt as for synthesis of the *5-cis*-isomer was used for condensation. Instead of pseudo-ionone as the starting compound  $\beta$ -ionone was used to generate the corresponding *15-cis*- $\beta$ -carotene. The applied Wittig condensation led to *15,15'*-dehydrolycopene and  $\beta$ -carotene. The final hydrogenation step by Lindlar was performed as described by Isler et al. resulting in *15-cis*-lycopene (60% isomeric purity) and *15-cis*- $\beta$ -carotene (90% isomeric purity).<sup>19</sup> This modified synthesis route allowed for a comparatively rapid generation of standards, because almost the same Wittig compound was used to generate 3 different carotenoid isomers. In contrast to Isler et al., a synthesis of  $\text{C}_{10}$ -Wittig salts was not required.

**Irradiation of Tomato Extracts as Model System.** To simulate different light conditions during the cultivation of tomatoes various model systems were established. Tomato extracts were irradiated with a halogen lamp, to mimic the wavelength spectrum of daylight. Thus, the irradiation with the halogen lamp was used to simulate field-grown conditions. To investigate the cultivation in greenhouses, different optical filters, which are impermeable for wavelengths below a defined value, were interposed between lamp and standard solution. A 550 nm filter was used to simulate lighting with a sodium vapor lamp, which is typical for cultivation of tomatoes in greenhouses in countries such as The Netherlands or Germany, where natural sunlight does not suffice to harvest ripe tomatoes during winter or spring months. The wavelength spectrum of these lamps is optimized for photosynthesis, i.e. they emit almost no light in the range of 250 to 550 nm. Growing tomatoes under greenhouse conditions without the use of additional sources of light was simulated by interposing a 420 nm filter between lamp and sample solution. Typical materials that are used for

cultivation in greenhouses are PE foils, PMMA sheets or glass. These materials cause a light permeability of less than 90%, which in cultivation depends additionally on the level of contamination, roof pitch and deterioration. Light with wavelengths below 400 nm is efficiently blocked by these materials.<sup>20</sup>

Dry tomato extracts were dissolved in hexane to a final lycopene concentration of about 10 to 15  $\mu\text{mol/L}$ . Aliquots of 400  $\mu\text{L}$  were transferred into a silica bulb and filled up to 4 mL using hexane. The resulting solutions were irradiated for defined periods of time (5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, and 240 min) and dried afterward under argon stream. Residues were taken up in 400  $\mu\text{L}$  of mobile phase (methanol/MTBE, 50/50) followed by HPLC–UV analyses. The isomeric composition was determined by integration of all identified lycopene peaks first. Then the areas of the separate peaks were divided by the sum of all lycopene values to express the percentage of the respective lycopene concentration.

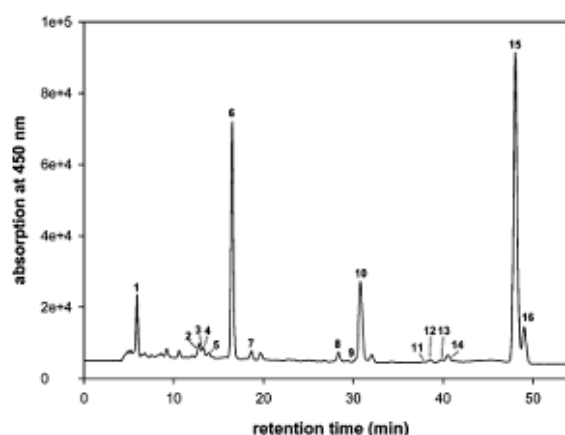
**Thermal Treatment of Tomato Extracts.** Above described aliquots of tomato extract solution were also used for thermal treatment experiments. Tomato extracts in hexane were stirred at 65 °C in dark glass vials for 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, and 240 min, followed by HPLC–UV analyses. These experiments showed the differences between thermal and photoinduced isomerization processes. Moreover this model system was used to exclude artifacts based on thermal isomerization processes during the extraction method.

**Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR).** NMR spectra were recorded on a Varian VXR 400 spectrometer operating at 400 MHz for  $^1\text{H}$  and 100 MHz for  $^{13}\text{C}$  or on a Varian Unity Inova 500 instrument operating at 500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$ , respectively.

**Statistical Analysis.** Analyses of carotenoid concentrations were performed in duplicate for each model system and resulted in coefficients of variation less than 5%. All significance tests were performed by two-sample *t*-test with a probability value of 99%. WELCH test was used alternatively in the case of differing standard deviations. Same probability value was selected. Confidence intervals were calculated with a probability value of 95%.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Identification of Carotenoid Isomers.** Extraction of tomatoes and analyses via HPLC–UV led to the typical chromatogram shown in Figure 1. For initial identification of different carotene isomers LC/APCI-MS was performed. During negative ion APCI a pseudo molecular ion of  $m/z$  536.7 was formed for peaks 2 to 16, to verify these 15 structures as carotenes. A proximate study by MS<sup>2</sup> analyses allowed differentiation between  $\beta$ -carotene and lycopene isomers, because only the molecular ion of lycopene formed the unique fragment of  $m/z$  467.6, caused by elimination of one terminal isoprene group ( $-69.1$ ), which is in line with data from Fang et al. in 2003.<sup>21</sup> In contrast  $\beta$ -carotene showed no fragmentation during negative ion APCI, due to its cyclic ionone end groups. Thus peaks 2 to 7 were identified as  $\beta$ -carotene isomers while signals 8 to 16 were characterized as lycopene isomers. Absolute configuration of the different isomers was verified by various approaches. Comparison of retention times using commercially available references led to the identification of *all-trans*-lutein (1), *all-trans*- $\beta$ -carotene (6) and *all-trans*-lycopene (15). Moreover 15-*cis*- $\beta$ -carotene (2), 15-*cis*-lycopene (8) and 5-*cis*-lycopene (16) were verified unequivocally by independently synthesized authentic reference compounds. The remaining isomers were assigned based on their spectral characteristics by HPLC–DAD analysis. According to the literature the Q-ratio (absorption at the subsidiary “cis-peak” (ca. 360 nm) divided by the absorption at  $\lambda_{\text{max}}$  (ca. 465 nm)) was used to characterize the other peaks. A more

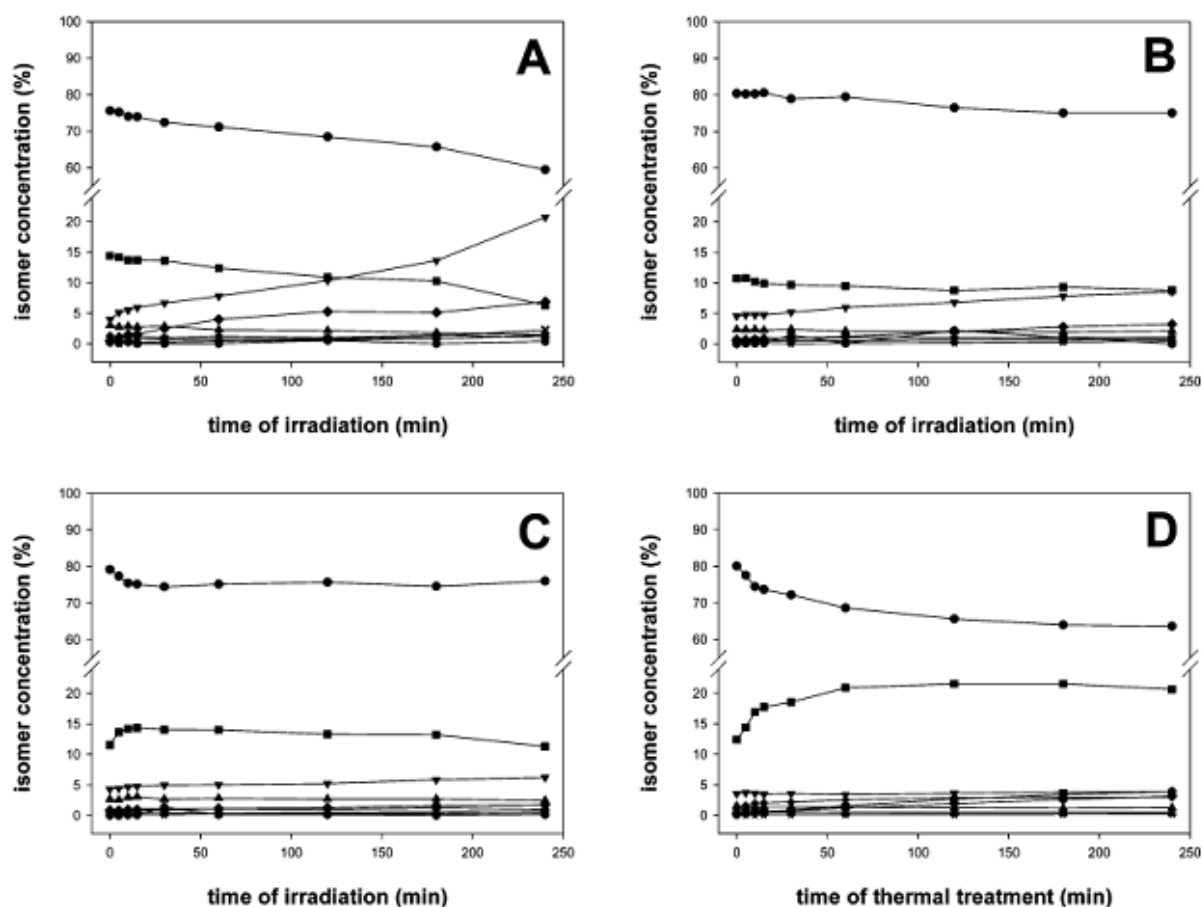


**Figure 1.** HPLC with UV detection at a wavelength of 450 nm showing separation of carotenoid isomers of a tomato extract. Peak identification: (1) lutein, (2) 15-*cis*- $\beta$ -carotene, (3) *cis*- $\beta$ -carotene, (4) 13-*cis*- $\beta$ -carotene, (5) *cis*- $\beta$ -carotene, (6) *all-trans*- $\beta$ -carotene, (7) 9-*cis*- $\beta$ -carotene, (8) 15-*cis*-lycopene, (9) lycopene *cis*-isomer 9, (10) 13-*cis*-lycopene, (11) lycopene *cis*-isomer 11, (12) 9-*cis*-lycopene, (13) lycopene *cis*-isomer 13, (14) 7-*cis*-lycopene, (15) *all-trans*-lycopene, (16) 5-*cis*-lycopene.

central *cis*-bond leads to a higher *cis*-peak to give a higher Q-ratio.<sup>22,23</sup> Consequently in comparison to the literature data 4 more isomers (4, 13-*cis*- $\beta$ -carotene; 7, 9-*cis*- $\beta$ -carotene; 9, 13-*cis*-lycopene; 12, 9-*cis*-lycopene) were identified.<sup>23–26</sup> Our experiments gave the highest Q-ratio for 15-*cis*-lycopene (0.57), followed by 13-*cis* (0.48), 9-*cis* (0.26), 5-*cis* (0.11) and *all-trans* (0.06). This also suggested isomer 14 to be 7-*cis*-lycopene, because just a weak absorption was observed in the range of 360 nm, which points to a more terminal *cis*-bond (Q-ratio 0.19). Beside of its low Q-ratio the HPLC retention pattern was in line with data from the literature. The configuration of isomers 9, 11 and 13 could not be clearly attributed due to the lack of authentic standards, but compared to the literature these signals were suggested to be di- or poly-*cis*-isomers. The presented identification of isomers based on a combination of authentic standards, MS and UV/vis data fully complies with the literature and therefore can be used for the following analyses.<sup>16,26,27</sup> However, it must be mentioned that the authentic synthesized 15-*cis*-lycopene elutes as the first lycopene isomer using a RP-C30 column, which is in contrast to some of the literature.<sup>23,28</sup>

**Photoinduced Isomerization of Tomato Extracts as Model System.** Transformation of *all-trans*-lycopene during irradiation using a halogen lamp was observed over a period of four hours to get a better understanding of photoinduced isomerization processes. Different optical filters were used to trigger differences in isomerization due to irradiation at diverse wavelengths (Figures 2A to 2C).

Model system A (Figure 2A) simulated tomato cultivation under field-grown conditions. The used light source was similar to sunlight, as the applied halogen lamp emitted light of wavelengths between 300 and 850 nm with a wide maximum range from 450 to 700 nm. During irradiation a rapid degradation of *all-trans*-lycopene of initially 75.59% to 59.48% was observed. The loss of *all-trans*-lycopene seemed to be almost linear (degradation rate ca. 4.0%/h) during 4 h of treatment. In parallel various *cis*-isomers were formed, most



**Figure 2.** Concentrations of lycopene isomers during irradiation with a halogen lamp over a period of 4 h using no filter (A), 420 nm filter (B), 550 nm filter (C) and thermal treatment at 65 °C (D), expressed as percentage of total lycopene concentration (%). 15-*cis*-Lycopene (+), lycopene *cis*-isomer 9 (●), 13-*cis*-lycopene (■), lycopene *cis*-isomer 11 (★), 9-*cis*-lycopene (◆), lycopene *cis*-isomer 13 (x), 7-*cis*-lycopene (▲), *all-trans*-lycopene (●), 5-*cis*-lycopene (▼).

dominantly 5-*cis*-lycopene. The starting isomer content of 3.97% rose up to 20.74% in an almost linear fashion, too. The rate of formation (ca. 4.2%/h) was nearly the same as the degradation rate of *all-trans*-lycopene. A considerable change was observed for 9-*cis*-lycopene, too. Its concentration reached 6.88% starting from 0.44%. 13-*cis*- (from 14.42% to 6.30%), 15-*cis*- (from 1.37% to 1.04%) and 7-*cis*-lycopene (from 3.00% to 1.49%) degraded during irradiation. Remaining monitored isomers showed no relevant changes. Our studies demonstrate that the formation of 5-*cis*- and 9-*cis*-lycopene during lighting was preferred, while a simultaneous decrease of *all-trans*-, 15-*cis*-, 13-*cis*- and 7-*cis*-lycopene was observed. A theoretical approach to *cis*–*trans* isomerization published by Guo et al. can explain the present findings.<sup>29</sup> According to their work especially 5-*cis*-lycopene ( $\Delta E_r^\ddagger = 35.2$  kcal/mol) and also 9-*cis*-lycopene ( $\Delta E_r^\ddagger = 23.1$  kcal/mol) have a higher rotational barrier to reisomerize to the *all-trans* configuration than all other isomers ( $\Delta E_r^\ddagger = 16.8$  to 19.9 kcal/mol), which makes these two isomers more stable.<sup>29</sup> The stability of these two isomers is also caused by their much lower relative energy compared to all other isomers.<sup>30</sup> Both effects thus lead to the observed accumulation in contrast to 7-*cis*-lycopene, which has one of the highest potential energies of all mono-*cis*-isomers

combined with a low rotational barrier ( $\Delta E_r^\ddagger = 22.1$  kcal/mol).<sup>29,30</sup> This aspect results in a dominant degradation of this unstable isomer during energy-rich irradiation.

In contrast to the literature the influence of specific light wavelengths on isomerization of lycopene was investigated in detail herein. Figures 2B and 2C illustrate the isomerization process of lycopene using the same halogen lamp with optical filters. Cutoff at 420 nm (Figure 2B) omitted light of smaller wavelengths to interact with tomato extracts. As a result almost no degradation of *all-trans*-lycopene was observed. The initial content of 80.27% just decreased to 75.01% during the whole lighting period, i.e. a total loss of only 5.26% compared to a loss of 16.11% observed in model system A. As expected all other isomers showed smaller changes, too. 5-*cis*-Lycopene presented the highest concentration after irradiation of all *cis*-isomers by increasing from 4.55% to 8.53%. Its formation was much slower but seemed to be linear again. The highest absolute formation was observed for 9-*cis*-lycopene again, which rose from 0.55% to 3.21%. However, this concentration is just a fraction compared to irradiation with the full wavelength spectrum (6.88%). Simultaneously the degradation of 13-*cis* and 7-*cis* was suppressed, too. 13-*cis* decreased from 10.72% to 8.80%, while

7-*cis* stayed almost at the same level starting from 2.38% to 2.10% after irradiation.

When a cutoff filter at 550 nm was used (Figure 2C), changes were even much less pronounced. Small decreases were observed for *all-trans*- (−3.14%) and 7-*cis*-lycopene (−0.16%), while concentrations of 9-*cis*- (+0.96%) and 5-*cis*-lycopene (+1.91%) increased marginally. Interestingly, differences in pattern were observed for 13-*cis*- and 15-*cis*-isomers. Figure 2C shows a slight increase of 13-*cis* (from 11.55% to 14.23%) and 15-*cis* (from 0.96% to 1.12%) after 10 min of irradiation, while in contrast both isomers decreased continuously during irradiation in model systems A and B. Further irradiation led again to degradation of these isomers, but final concentrations just reached starting levels (13-*cis* 11.33%, 15-*cis* 1.02%).

In addition to the photoinduced isomerization, thermal treatment at 65 °C on tomato extracts was performed to identify possible mixed effects (Figure 2D). In contrast to photoinduced isomerization a significant formation of 15-*cis*- and 13-*cis*-lycopene was observed. The concentration of 13-*cis*-lycopene rose from 12.39% to 20.65% (increase of 8.26%), while *all-trans*-lycopene underwent an intense degradation process, illustrated by a total loss of 16.39% (from 80.00% to 63.61%). After 120 min both isomers already reached constant levels and seemed to form an equilibrium. 15-*cis*-Lycopene was constantly formed during heating (from 1.36% to 3.00%). Such a strong formation of 13-*cis*- and 15-*cis*-isomer was unique for the thermal treatment model system. The concentration of 9-*cis*-lycopene also reached a mentionable level of 3.13%, i.e. a total increase of 2.74%. Other isomers showed no significant changes, e.g. 5-*cis*-lycopene rose from 3.49% to 3.85%. In the literature thermal pasteurization (at 60 or 90 °C) or sterilization (at 117 °C) of tomato purée led to similar results.<sup>31</sup> *all-trans*-Lycopene underwent degradation while the concentration of *cis*-isomers, mainly 13-*cis* and 9-*cis*, almost doubled to tripled for the sterilization procedure. Only high pressure sterilization resulted in formation of 5-*cis*-lycopene.<sup>31</sup> In essence, model system D showed that the energy during thermal processing was not sufficient to form energetic hindered isomers like 5-*cis*-lycopene. Predominantly, isomers with lower activation energy levels (13-*cis*, 15-*cis* and 9-*cis*) were formed. The thermal model D therefore also explains the initial increase of the 13-*cis*-lycopene in model C. Obviously irradiation at lower energy led to mixed thermal effects.

A simplified overview on the observed results during isomerization processes of lycopene is given in Figure 3.

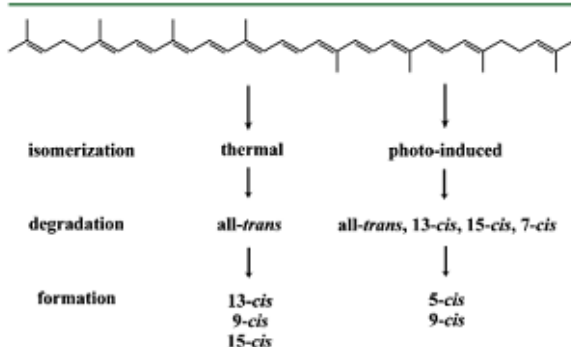


Figure 3. Thermal and photoinduced isomerization leads to degradation and formation of lycopene isomers.

Thermal isomerization is characterized by a strong degradation of *all-trans*-lycopene to form mainly 13-*cis*-, 9-*cis*- and 15-*cis*-isomers. Energy-rich photoinduced degradation is more complex, i.e. a decrease of *all-trans*-, 13-*cis*-, 15-*cis*- and 7-*cis*-lycopene was observed paralleled by formation of 5-*cis* and 9-*cis*. Wavelength cutoff during irradiation causes characteristics of thermal treatment verified by an increase of 13-*cis*- and 15-*cis*-lycopene combined with constant concentrations of 5-*cis* and 7-*cis*. Figure 3 illustrates the exceptional position of the 5-*cis*- and 7-*cis*-isomer during isomerization, because their formation and degradation is just triggered by photoinduced processes. This makes both isomers potent parameters for the differentiation of growing conditions. Thus we chose them for follow-up studies on authentic tomato samples. Concentrations of isomers 13-*cis* and 15-*cis* point to thermal treatments, showing considerable formation only during thermal treatment but decrease during irradiation. 9-*cis*-Lycopene is formed during both processes and, therefore, does not allow for any differentiation.

**Lycopene Composition of Authentic Field- and Greenhouse-Grown Tomatoes.** The results of the model systems were applied to real tomato samples. Altogether 55 samples of authentic field-grown tomatoes (*var.* "Harzfeuer"), exposed to sunlight during cultivation, and 49 samples of authentic greenhouse-grown tomatoes (*var.* "Harzfeuer"), planted under lamps with limited light spectra, were analyzed. Mean concentrations of all eight analyzed lycopene isomers are summarized in Table 1. Indeed significant differences between

Table 1. Mean Concentration ( $\pm$  Confidence Intervals), Expressed as Percentage of Total Lycopene, of All Analyzed Lycopene Isomers Observed in Different Sets of Tomato Samples

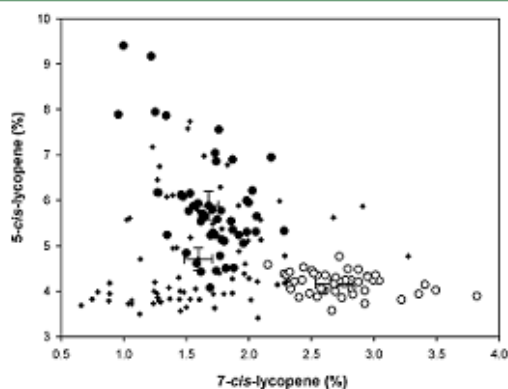
	mean concn ( $\pm$ confidence intervals) (%)		
	authentic field-grown tomatoes	authentic greenhouse-grown tomatoes	customer available tomatoes
15- <i>cis</i>	0.69 $\pm$ 0.14	0.77 $\pm$ 0.11	0.93 $\pm$ 0.12
13- <i>cis</i>	12.47 $\pm$ 0.51	12.41 $\pm$ 0.58	11.13 $\pm$ 0.61
isomer 11	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01
9- <i>cis</i>	0.43 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.07	0.44 $\pm$ 0.05
isomer 13	0.48 $\pm$ 0.05	0.48 $\pm$ 0.07	0.69 $\pm$ 0.06
7- <i>cis</i>	1.67 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	2.65 $\pm$ 0.14	1.60 $\pm$ 0.11
<i>all-trans</i>	77.39 $\pm$ 0.79	78.33 $\pm$ 0.70	79.80 $\pm$ 0.94
5- <i>cis</i>	5.78 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	4.14 $\pm$ 0.08	4.71 $\pm$ 0.25
lycopene content (mg/100 g fresh wt)	2.0–3.9	1.4–2.4	1.8–5.1

<sup>a</sup>Significant difference compared to greenhouse-grown tomatoes calculated by *t* test ( $\alpha = 0.01$ ). <sup>b</sup>Significant difference compared to greenhouse-grown tomatoes calculated by WELCH test ( $\alpha = 0.01$ ).

field-grown and greenhouse-grown tomatoes were detected for three different lycopene isomers, as suggested in the model systems. A mean concentration of 5.78  $\pm$  0.26% was assured for 5-*cis*-lycopene in field-grown tomatoes, which was significantly higher ( $\alpha = 0.01$ ) compared to greenhouse-grown tomatoes with 4.14  $\pm$  0.08%. At the same time a significantly lower concentration of 7-*cis*-lycopene was established in field-grown tomatoes ( $\alpha = 0.01$ ) with 1.67  $\pm$  0.11% compared to 2.65  $\pm$  0.14% in greenhouse-grown tomatoes. The third significant difference was detected for the uncharacterized isomer 11. Its mean concentration in field-grown tomatoes (0.06  $\pm$  0.01%)

was only half as compared to greenhouse-grown tomatoes ( $0.12 \pm 0.03\%$ ). All remaining isomers led to no significant differences ( $\alpha = 0.05$ ) at more or less the same concentration in both groups.

The clear differences for 5-*cis*- and 7-*cis*-lycopene in authentic field- and greenhouse-grown tomatoes correspond to the data from the model systems on irradiation of tomato extracts and are plotted in two dimensions in Figure 4. The energy-rich UV-



**Figure 4.** 5-*cis*- and 7-*cis*-lycopene concentrations of authentic field-grown (●), authentic greenhouse-grown (○) and customer-available tomato samples (+), expressed as percentage of total lycopene concentration (%).

light during sunlight exposure led to formation of the energetic hindered 5-*cis*-isomer while 7-*cis*-lycopene was reduced. These differences were paralleled by a slightly lower concentration of *all-trans*-lycopene in field-grown tomatoes. In round tomato types (e.g., var. "Harzfeuer") Kuti et al. also observed a lower content of *all-trans*-lycopene compared to greenhouse-grown tomatoes, however *cis*-isomers were not analyzed particularly.<sup>32</sup> Interestingly our data provided no difference in 9-*cis*-lycopene concentration. Based on our model systems this parameter is influenced by both light and temperature (Figure 3). Obviously the formation of 9-*cis* was more influenced by thermal effects in this case. Cultivation of tomatoes in greenhouses is coupled to a higher average temperature, which is also caused by a light period of about 16 h.

A total of 74 samples from local markets and food stores were then analyzed to test for the hypothesis that the cultivation can also be differentiated in consumer available vegetables based on the two specific lycopene isomers. The results are summarized in Table 1 and Figure 4. 5-*cis*-Lycopene was analyzed at a mean concentration of  $4.71 \pm 0.25\%$  which lay between the two authentically grown sets with a strong tendency toward authentic greenhouse-grown tomatoes. This notion reflects the higher market share of greenhouse cultivation, typical for the European market. In contrast, the mean concentration of 7-*cis*-lycopene ( $1.60 \pm 0.11\%$ ) corresponds predominantly to the reference group of authentic field-grown tomatoes. Confidence intervals of customer available tomatoes were almost identical to authentically grown sets. In detail Figure 4 shows some crossovers between authentic field-grown tomatoes and commercial samples, while only a few crossovers to authentic greenhouse-grown tomatoes were observed. The major part of the commercial samples lay between the two authentic groups, which makes a clear assignment impossible. On the one hand, studies have shown

that the concentration of *cis*-/*trans*-lycopene also depends on the particular tomato variety.<sup>32</sup> Additional analyses in the present study proved this observation. Nine authentic field-grown cherry tomato samples showed a slightly higher concentration of 5-*cis* ( $6.15 \pm 0.83\%$ ) and a significantly lower level of 7-*cis* ( $0.91 \pm 0.10\%$ ) compared to authentic field-grown tomatoes of the variety "Harzfeuer". Otherwise analyses of 8 authentic field-grown beefsteak tomatoes resulted in a significantly lower concentration of 5-*cis*-isomer ( $4.56 \pm 0.51\%$ ), while 7-*cis*-lycopene showed a significantly higher level ( $2.40 \pm 0.44\%$ ). These results suggest that the caliber of tomatoes has a strong impact on isomerization. The relative depth of penetration by daylight or other sources of light seems to be much deeper in smaller varieties to cause a higher grade of isomerization resulting in formation of 5-*cis*- with a simultaneous degradation of *all-trans*- and 7-*cis*-lycopene. On the other hand authentically grown tomatoes were harvested only at full red ripe state and were frozen immediately after sampling. The isomeric composition of customer available tomatoes could have been influenced by storage conditions and times, e.g. during transportation. Thus, postharvest processing could explain the wide variability between customer available samples, too.

In summary, 5-*cis*- and 7-*cis*-lycopene were identified in different model systems as potent markers for photoinduced isomerization. This resulted in a clear differentiation between authentic field- and greenhouse-grown tomato samples within the same variety "Harzfeuer". In a first attempt classification of customer-available tomatoes was not possible. However, based on the present study, follow-up studies expanding the data on lycopene isomeric composition growing conditions of specific tomato varieties will also allow defined statements.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

NMR data, characteristics of halogen lamp used for irradiation experiments and UV/vis data and spectra. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [marcus.glomb@chemie.uni-halle.de](mailto:marcus.glomb@chemie.uni-halle.de). Fax ++049-345-5527341.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Dr. Wessjohann and the department of Bioorganic Chemistry from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Germany, for cultivation of authentic greenhouse tomatoes.

## ■ REFERENCES

- (1) Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. *Gemüseverbrauch (Marktgemüse) 2010/11 leicht zurückgegangen*; 2011.
- (2) Bohm, F.; Edge, R.; Burke, M.; Truscott, T. G. Dietary uptake of lycopene protects human cells from singlet oxygen and nitrogen dioxide - ROS components from cigarette smoke. *J. Photochem. Photobiol. B*. **2001**, *64*, 176–178.
- (3) Barber, N. J.; Barber, J. Lycopene and prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Dis.* **2002**, *5*, 6–12.

- (4) Singh, P.; Goyal, G. K. Dietary lycopene: its properties and anticarcinogenic effects. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2008**, *7*, 255–270.
- (5) Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene As the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *274*, 532–538.
- (6) Colle, I. J. P.; Lemmens, L.; Tolesa, G. N.; Van Buggenhout, S.; De Vleeschouwer, K.; Van Loey, A. M.; Hendrickx, M. E. Lycopene Degradation and Isomerization Kinetics during Thermal Processing of an Olive Oil/Tomato Emulsion. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12784–12789.
- (7) Clinton, S. K. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 35–51.
- (8) Bohm, V.; Puspitasari-Nienaber, N. L.; Ferruzzi, M. G.; Schwartz, S. J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of alpha-carotene, beta-carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 221–226.
- (9) Shi, J.; Le Maguer, M.; Kakuda, Y.; Liptay, A.; Niekamp, F. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. *Food Res. Int.* **1999**, *32*, 15–21.
- (10) Honest, K. N.; Zhang, H. W.; Zhang, L. F. Lycopene: Isomerization Effects on Bioavailability and Bioactivity Properties. *Food Rev. Int.* **2011**, *27*, 248–258.
- (11) Lee, M. T.; Chen, B. H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chem.* **2002**, *78*, 425–432.
- (12) Shi, J.; Dai, Y.; Kakuda, Y.; Mittal, G.; Xue, S. J. Effect of heating and exposure to light on the stability of lycopene in tomato puree. *Food Control* **2007**, *19*, 514–520.
- (13) Lambelet, P.; Richelle, M.; Bortlik, K.; Franceschi, F.; Giori, A. M. Improving the stability of lycopene Z-isomers in isomerised tomato extracts. *Food Chem.* **2009**, *112*, 156–161.
- (14) Zhang, L. F.; Zhang, H. W.; Ndeurumi, K. H.; Parkin, K. L.; Venuste, M. Thermally-induced geometrical isomerisation of lycopene and its potential influence on functional activity. *Food Chem.* **2012**, *132*, 2112–2117.
- (15) Sadler, G.; Davis, J.; Dezman, D. Rapid Extraction of Lycopene and Beta-Carotene from Reconstituted Tomato Paste and Pink Grapefruit Homogenates. *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 1460–1461.
- (16) Hengartner, U.; Bernhard, K.; Meyer, K.; Englert, G.; Glinz, E. Synthesis, isolation, and NMR-spectroscopic characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene and of some acetylenic dihydro- and tetrahydrolycopenes. *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 1848–1865.
- (17) Ernst, H.; Heinrich, K.; Keller, A. *Method for Producing 2,7-Dimethyl-octa-2,4,6-trienedial*. United States, US 7,339,085 B2, 2008.
- (18) Frederico, D.; Donate, P. M.; Constantino, M. G.; Bronze, E. S.; Sairre, M. L. A Short and Efficient Synthesis of Crocetin-dimethyl ester and Crocetinindial. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9126–9128.
- (19) Isler, O.; Gutmann, H.; Lindlar, H.; Montavon, M.; Rugg, R.; Ryser, G.; Zeller, P. Syntheses in the carotenoid series. VI. Synthesis of crocetin dialdehyde and lycopene. *Helv. Chim. Acta* **1956**, *39*, 463–473.
- (20) Jansen, H.; Bachthaler, E.; Fölster, E.; Scharpf, H.-C. *Gärtnerischer Pflanzenbau*, 3rd ed.; Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart, 1998.
- (21) Fang, L.; Pajkovic, N.; Wang, Y.; Gu, C.; van Breemen, R. B. Quantitative analysis of lycopene isomers in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 812–817.
- (22) Lee, M. T.; Chen, B. H. Separation of lycopene and its cis isomers by liquid chromatography. *Chromatographia* **2001**, *54*, 613–617.
- (23) Schierle, J.; Bretzel, W.; Buhler, I.; Faccin, N.; Hess, D.; Steiner, K.; Schuep, W. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem.* **1997**, *59*, 459–465.
- (24) Vecchi, M.; Englert, G.; Maurer, R.; Meduna, V. Separation and Characterization of the Cis-Isomers of Beta, Beta-Carotene. *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 2746–2758.
- (25) Yeum, K. J.; Booth, S. L.; Sadowski, J. A.; Liu, C.; Tang, G. W.; Krinsky, N. L.; Russell, R. M. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *64*, 594–602.
- (26) Stahl, W.; Schwarz, W.; Sundquist, A. R.; Sies, H. Cis Trans Isomers of Lycopene and Beta-Carotene in Human Serum and Tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *294*, 173–177.
- (27) Breitenbach, J.; Braun, G.; Steiger, S.; Sandmann, G. Chromatographic performance on a C30-bonded stationary phase of monohydroxycarotenoids with variable chain length or degree of desaturation and of lycopene isomers synthesized by various carotene desaturases. *J. Chromatogr., A* **2001**, *936*, 59–69.
- (28) Frohlich, K.; Conrad, J.; Schmid, A.; Breithaupt, D. E.; Bohm, V. Isolation and structural elucidation of different geometrical isomers of lycopene. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2007**, *77*, 369–375.
- (29) Guo, W. H.; Tu, C. Y.; Hu, C. H. Cis-Trans Isomerizations of beta -Carotene and Lycopene: A Theoretical Study. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12158–12167.
- (30) Chasse, G. A.; Mak, M. L.; Deretey, E.; Farkas, I.; Torday, L. L.; Papp, J. G.; Sarma, D. S. R.; Agarwal, A.; Chakravarthi, S.; Agarwal, S.; Rao, A. V. An ab initio computational study on selected lycopene isomers. *J. Mol. Struct.* **2001**, *571*, 27–37.
- (31) Knockaert, G.; Pulissery, S. K.; Colle, I.; Van Buggenhout, S.; Hendrickx, M.; Van Loey, A. Lycopene degradation, isomerization and in vitro bioaccessibility in high pressure homogenized tomato puree containing oil: Effect of additional thermal and high pressure processing. *Food Chem.* **2012**, *135*, 1290–1297.
- (32) Kuti, J. O.; Konuru, H. B. Effects of genotype and cultivation environment on lycopene content in red-ripe tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *85*, 2021–2026.



## 4.2 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62, 4960 – 4967

## Growing and Processing Conditions Lead to Changes in the Carotenoid Profile of Spinach

Thomas Heymann,<sup>†</sup> Lore Westphal,<sup>‡</sup> Ludger Wessjohann,<sup>‡</sup> and Marcus A. Glomb<sup>\*†</sup><sup>†</sup>Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Strasse 2, 06120 Halle/Saale, Germany<sup>‡</sup>Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Bioorganic Chemistry, Weinberg 3, 06120 Halle/Saale, Germany

## Supporting Information

**ABSTRACT:** This study aimed to evaluate the influence of different light regimens during spinach cultivation on the isomeric composition of  $\beta$ -carotene. Irradiation with a halogen lamp, which has a wavelength spectrum close to that of daylight, was used to mimic field-grown conditions. The additional use of optical filters was established as a model system for greenhouse cultivation. Field-grown model systems led to a preferential increase of 9-*cis*- $\beta$ -carotene, whereas 13-*cis*- $\beta$ -carotene was just formed at the beginning of irradiation. Additionally 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene decreased significantly in the presence of energy-rich light. Isomerization of  $\beta$ -carotene was strongly suppressed during irradiation in greenhouse-grown model systems and led to significant differences. These results were verified in biological samples. Authentic field-grown spinach (*Spinacia oleracea* L.) showed among changes of other isomers a significantly higher level of 9-*cis*-isomers ( $7.52 \pm 0.14\%$ ) and a significantly lower level of 9,13-di-*cis*-isomers ( $0.25 \pm 0.03\%$ ) compared to authentic greenhouse-grown spinach ( $6.49 \pm 0.11$  and  $0.76 \pm 0.05\%$ ). Almost all analyzed commercial spinach samples (fresh and frozen) were identified as common field-grown cultivation. Further investigations resulted in a clear differentiation of frozen commercial samples from fresh spinach, caused by significantly higher levels of 13-*cis*- and 15-*cis*- $\beta$ -carotene as a result of industrial blanching processes.

**KEYWORDS:** spinach (*Spinacia oleracea* L.), isomerization,  $\beta$ -carotene, illumination, blanching, field-grown, greenhouse-grown

## INTRODUCTION

Spinach (*Spinacia oleracea* L.), with mean concentrations of about 4.5 mg  $\beta$ -carotene and 6.3 mg lutein per 100 g fresh weight, is one of the main sources for carotenoids in the human diet.<sup>1</sup> For this reason up to 26% of the daily intake of  $\beta$ -carotene is consumed in the form of spinach in some European countries.<sup>2</sup> The daily intake of lutein is covered >30% by consuming spinach in countries such as Spain, The Netherlands, or France.<sup>2</sup> In this context spinach is still the focus of current studies and is often associated with beneficial effects on human health. This impact was mostly assigned to carotenoids with their elongated polyene structure, giving them a high antioxidative potential.<sup>3</sup> Studies showed an increase of  $\beta$ -carotene and lutein serum levels after consumption of a spinach-rich diet. Possible effects linked to age-related macular degeneration (AMD) were discussed.<sup>4</sup> Carotenoids seem to be an appropriate tool to protect cells from oxidative stress and might also prevent different kinds of cancer.<sup>5</sup> On the other hand,  $\beta$ -carotene has provitamin A activity due to its  $\beta$ -ionone end groups.<sup>5</sup>

However, carotenoids are subject to isomerization processes caused by thermal-, photo-, or chemical-induced reactions.<sup>6</sup> In general, all-*trans*- $\beta$ -carotene degrades during food processing, leading to higher concentrations of *cis*-isomers.<sup>7</sup> Cooked spinach showed a much higher level of 9-*cis*- $\beta$ -carotene compared to raw spinach, whereas the concentration of 13-*cis* slightly decreased in a study of Courraud et al.<sup>8</sup> Contrary effects were reported after pasteurization (95 °C) and sterilization (121 °C) in a work by Marx et al. Predominantly 13-*cis*- $\beta$ -carotene was formed during thermal processing,

whereas the 9-*cis*-isomer was generated to a small extent during sterilization conditions.<sup>9</sup> These results were validated by a number of studies.<sup>10–13</sup> In addition, Aman et al. showed only marginal increases of 13-*cis*- and 9-*cis*- $\beta$ -carotene after light exposure of all-*trans*- $\beta$ -carotene standard solutions.<sup>14</sup> Only in the presence of sensitizers such as chlorophyll were significantly increased concentrations of 9-*cis*- $\beta$ -carotene observed.<sup>14</sup>

Some other studies reported that growing conditions induced differences in carotenoid concentrations, too. Lutein and  $\beta$ -carotene concentrations were about 25% higher in summer-grown compared to winter-grown spinach.<sup>15</sup> However, there are no studies investigating the influence of light during cultivation on the isomeric composition of  $\beta$ -carotene in spinach or other green vegetables.

The current study aimed to identify potent markers for light-induced isomerization in model systems. These markers were then used to differentiate the kind of cultivation (greenhouse- or field-grown) and processing (blanching) of commercial spinach.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** The following chemicals of analytical grade were commercially available: hexane, ethanol, acetone (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany); potassium hydroxide (Grüssig GmbH, Filsum, Germany); butylated hydroxytoluene (BHT; Fluka/Sigma-Aldrich,

Received: March 6, 2014

Revised: May 11, 2014

Accepted: May 11, 2014

Published: May 15, 2014

Steinheim, Germany); sodium chloride (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany);  $\beta$ -ionone (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany); and NMR solvents (ARMAR Chemicals, Döttingen, Switzerland). Methanol and methyl *tert*-butyl ether as HPLC solvents were purchased from Sigma-Aldrich (HPLC grade  $\geq 99.8\%$ ). All-*trans*- $\beta$ -carotene (97% isomeric purity) was purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) and all-*trans*-lutein (95% isomeric purity) from Carl Roth GmbH.

**Spinach Samples.** Four different sets of spinach samples were considered during this study. In cooperation with the Leibniz Institute of Plant Biochemistry (Halle, Germany) a first set (varieties 'Bella' and 'Matador') was cultivated under greenhouse conditions from August to November 2012. A light period of 8 h was chosen to simulate short-day conditions. During this period a temperature of 22 °C and a relative humidity of 70% were adjusted. Electric illumination was performed by Cool Daylight lamps (Osram, 36 W/965). Temperature was regulated down to 15 °C during the dark phase (16 h) at the same humidity. Sampling started after 9 weeks (leaf size between 8 × 4 and 12 × 7 cm) and ended after 12 weeks of cultivation. In a second set spinach of both varieties was cultivated under field-grown conditions near Halle (Germany) at the same time. Additionally, spinach of the variety 'Matador' was cultivated during spring (from March to May) and summer (from June to August) in 2012. The other two sets were commercial samples from local markets and food stores. Altogether 37 samples of fresh spinach (origin Italy and Germany) and 43 samples of frozen spinach were collected. All samples were stored at -32 °C until processing.

**Sample Preparation.** Preparation of spinach was performed according to prior studies,<sup>16</sup> where the extraction method was adopted from Sadler et al.<sup>17</sup> Fresh or frozen material was cut into small slices first. Per sample about 15 g of spinach homogenate was filled into Falcon tubes and stored at -21 °C, followed by freeze-drying. Dry plant materials were extracted overnight with 150 mL of hexane/ethanol/acetone (2:1:1, v/v/v) containing 0.01% BHT by shaking with an orbital shaker (ca. 170 rpm) at room temperature under exclusion of light. For saponification of fatty compounds and an effective removal of interfering chlorophylls the organic extracts were treated with 15 mL of 10% methanolic potassium hydroxide solution and were shaken overnight at room temperature after saturation with argon to avoid oxidative degradation of carotenoids.<sup>14,18</sup> The alkaline extracts were washed five times with 60 mL of a 2% sodium chloride solution. Aliquots of the resulting carotenoid extracts (2 mL) were dried under argon and dissolved in 1 mL of mobile phase (methanol/MTBE, 50:50).

Sample preparation was performed under reduced light using amber glassware, and the temperature never exceeded 25 °C to avoid isomerization processes induced by light or temperature.

**Analytical HPLC-UV and HPLC-DAD.** The HPLC method was developed and optimized on the basis of studies of Fang et al.<sup>19</sup> A Jasco PU-2089 Plus quaternary gradient unit pump with a degasser and a Jasco AS-2055 Plus autosampler (Gross-Umstadt, Germany) were used. Elution of materials was monitored by a Jasco UV-2075 Plus UV-detector operating at 450 nm. For DAD analyses a Jasco MD-2015 Plus detector was used. Chromatographic separations were performed on a RP-C30 column (5  $\mu$ m, 250 × 4.0 mm, YMC Europe, Dinslaken, Germany) connected to a C30 guard column (5  $\mu$ m, 10 × 4.0 mm, YMC Europe) using a flow rate of 0.65 mL min<sup>-1</sup>. Chosen column temperature was 20 °C. The mobile phase used consisted of methanol (solvent A) and methyl *tert*-butyl ether (solvent B). Samples were injected at 40% B (held for 5 min) followed by a gradient that changed to 52% B in 15 min. The gradient then changed to 100% B in 5 min (held for 10 min) and to 40% B in 5 min (held for 10 min).

**Analytical HPLC-MS<sup>2</sup>.** A Jasco PU-2080 Plus quaternary gradient pump with degasser and a Jasco AS-2057 Plus autosampler were used. The RP-C30 column and HPLC gradient program used were the same as for HPLC-UV measurements. Elution of carotenoids was monitored by mass detection. The mass analyses were performed using an Applied Biosystems API 4000 quadrupole instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with an API source using an atmospheric pressure chemical ionization (APCI, negative mode) interface. The LC system was connected directly to the probe

of the mass spectrometer. Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas.  $\beta$ -Carotene isomers were detected at 536.7 amu in Q1 (DP -80 V, no fragments in Q3).

**Synthesis of Authentic  $\beta$ -Carotene Standards.** In contrast to the literature 15-*cis*- $\beta$ -carotene was synthesized via a C<sub>15</sub> + C<sub>10</sub> + C<sub>14</sub> route.<sup>20</sup> Thus, C<sub>15</sub>-Wittig salts were generated according to the method of Hengartner et al. using  $\beta$ -ionone as the starting compound instead of pseudoionone.<sup>21</sup> The central compound, 2,7-dimethylocta-2,6-dien-4-yne-1,8-dial, was assembled according to the method of Isler et al. and was directly coupled to the Wittig salts.<sup>20</sup> After Lindlar hydrogenation, the 15,15'-dehydro- $\beta$ -carotene was transferred to 15-*cis*- $\beta$ -carotene (ca. 27 mg) with an isomeric purity of 90% (HPLC-UV). 9-*cis*- $\beta$ -Carotene was generated by coupling 9-*cis*-retinal and all-*trans*-retinyl-Wittig salt. First, the C<sub>20</sub>-Wittig salt was generated according to the method of Britton et al. starting with commercially available all-*trans*-retinal (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany).<sup>22</sup> The second precursor, 9-*cis*-retinal, was obtained after reduction of 9-*cis*-retinyl ethyl ester, which was synthesized according to the literature.<sup>23-26</sup> Conventional Wittig condensation resulted in 20 mg of 9-*cis*- $\beta$ -carotene with an isomeric purity of 71% (HPLC-UV). All structures were established by their NMR data (<sup>1</sup>H; <sup>13</sup>C; H,H-COSY; HSQC; HMBC).

**Irradiation Model Systems.** Various model systems were established to simulate different light conditions during the cultivation of spinach. The influence of daylight on isomerization of carotenoids was simulated by irradiation of all-*trans*- $\beta$ -carotene with a halogen lamp, thus mimicking field-growing conditions. On the other hand, different optical filters, which are impermeable below specific wavelengths, were interposed between standard solution and halogen lamp to imitate light conditions during greenhouse cultivation. A 550 nm filter was used to simulate illumination with a sodium vapor lamp, which is commonly used for cultivation in greenhouses, because natural sunlight does not suffice to harvest spinach during winter months. The wavelength spectrum of these lamps is optimized for photosynthesis; that is, they emit almost no light in the range of 250–550 nm. Growing spinach under greenhouse conditions without the use of additional sources of light was simulated by interposing a 420 nm filter. PE foils, PMMA sheets, or glass are typical materials that are used for cultivation in greenhouses. These materials cause a light permeability of <90%, which in cultivation depends additionally on the level of contamination, roof pitch, and deterioration. Light with wavelengths below 400 nm is efficiently blocked by these materials.<sup>27</sup> All-*trans*- $\beta$ -carotene solutions (21  $\mu$ M in hexane) were irradiated for defined periods of time (5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 180, and 240 min). Aliquots (500  $\mu$ L) were dried afterward under argon stream. Residues were taken up in 400  $\mu$ L of mobile phase (methanol/MTBE, 50:50) to adjust final concentrations to 26  $\mu$ M (according to spinach samples) followed by HPLC-UV analyses. The isomeric composition was determined by integration of all identified  $\beta$ -carotene peaks first. Then the areas of the separate peaks were divided by the sum of all  $\beta$ -carotene values to express the percentage of the respective  $\beta$ -carotene concentration. Contents of  $\beta$ -carotene (including all isomers) were calculated on the basis of the external linear calibration of all-*trans*- $\beta$ -carotene standard at its wavelength maximum of 450 nm.

**Thermal Treatment.** Concentrated all-*trans*- $\beta$ -carotene solutions were stirred at 65 °C in amber glass vials, and aliquots of 500  $\mu$ L were sampled after 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, and 240 min. HPLC-UV analyses were performed after the samples were dried and dissolved in mobile phase (400  $\mu$ L). This experiment showed differences from photoinduced isomerization processes and allowed the exclusion of thermal-induced artifacts during the extraction method.

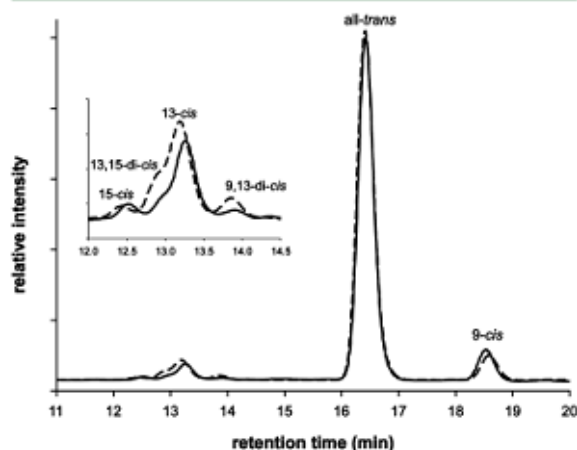
**Blanching of Fresh Spinach.** Fresh spinach leaves (ca. 5 g per sample) were immersed into boiling water for a period of 0.5, 1, 2, 3, 5, or 10 min. Treated samples were immediately quenched on ice water. Sample preparation was as described above.

**Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR).** NMR spectra were recorded on a Varian VXR 400 spectrometer operating at 400 MHz for <sup>1</sup>H and at 100 MHz for <sup>13</sup>C or on a Varian Unity Inova 500 instrument operating at 500 MHz for <sup>1</sup>H and at 125 MHz for <sup>13</sup>C, respectively.

**Statistical Analysis.** Analyses of carotenoid concentrations were performed in duplicate for each model system and resulted in coefficients of variation of <5%. All significance tests were performed by two-sample *t* test with a probability value of 99%. The Welch test was used alternatively in one case of differing standard deviations. The same probability value was selected. Confidence intervals were calculated with a probability value of 95%.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Identification of  $\beta$ -Carotene Isomers.** HPLC-UV analyses of spinach extracts led to the typical chromatograms shown in Figure 1. The identification was performed first by



**Figure 1.** HPLC chromatograms of an authentic field-grown (solid line) and a greenhouse-grown (dashed line) spinach extract. Elution of  $\beta$ -carotene isomers (15-*cis*- $\beta$ -carotene; 13,15-di-*cis*- $\beta$ -carotene; 13-*cis*- $\beta$ -carotene; 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene; all-*trans*- $\beta$ -carotene; 9-*cis*- $\beta$ -carotene) was monitored by UV detection at 450 nm.

LC/APCI-MS analyses. During negative ion APCI six peaks formed a pseudomolecular ion of  $m/z$  536.7, thus verifying them as  $\beta$ -carotene isomers. Absolute configuration was verified by comparison of retention times using authentic references. Besides commercially available all-*trans*- $\beta$ -carotene, independently synthesized 9-*cis*- and 15-*cis*- $\beta$ -carotene were used. The remaining isomers were assigned on the basis of their spectral characteristics determined by HPLC-DAD analyses.  $Q$ -ratios (absorption at the subsidiary "cis-peak" divided by the absorption at  $\lambda_{max}$ )<sup>28,29</sup> were formed and compared to the literature and thus allowed an identification of 13-*cis*- $\beta$ -carotene.<sup>30</sup> As expected, our experiments gave the highest  $Q$ -ratio for 15-*cis*- $\beta$ -carotene (0.61), followed by 13-*cis* (0.46), 9-*cis* (0.09), and all-*trans* (0.06). In addition, the HPLC elution pattern (Figure 1) was completely comparable to data of Strohschein et al., which identified the two remaining isomers as 13,15-di-*cis*- and 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene (exptl  $Q$ -ratio 0.42) using HPLC-NMR analyses.<sup>31</sup> The presented assignment using various approaches for the identification of  $\beta$ -carotene isomers allowed targeted analyses in the following studies.

**Irradiation and Thermal Treatment Model Systems.** Model system A simulated illumination conditions during field-grown cultivation. In this case a halogen lamp with a wavelength spectrum close to that of sunlight was used for irradiation (Figure 2A). All-*trans*- $\beta$ -carotene underwent a strong degradation during the first 30 min of illumination, illustrated by a decrease starting from a concentration of 96.55

to 89.55%. After that, the degradation attenuated and almost reached equilibrium at 85.31%. 13-*cis*- and 15-*cis*- $\beta$ -carotene showed opposite developments. Both isomers were formed in high yields during the first period of irradiation. 13-*cis*- $\beta$ -Carotene rose from 2.39 to 6.96%, whereas 15-*cis* reached a concentration of 1.90% starting from 0.24%. Both isomers approximated equilibrium concentrations, too; however, a decrease was observed after full time of illumination (13-*cis*, 6.09%; and 15-*cis*, 1.66%). In contrast, an almost linear formation during the whole period of treatment was observed for 9-*cis*- $\beta$ -carotene. Its concentration rose from 0.75 to 6.86% (ca. 1.5%/h); thus, 9-*cis* was the predominant *cis*-isomer after photoinduced isomerization. Interestingly, the formation of 9-*cis*- $\beta$ -carotene was closely associated with degradation of 13-*cis*- $\beta$ -carotene in the last period of irradiation, when all other isomers showed no appreciable changes anymore. Almost no change was observed for 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene, the concentration of which stayed unchanged at about 0.10%. Similar light-induced isomerization progress was observed by O'Neil et al. among others; that is, 13-*cis*- and dominantly 9-*cis*- $\beta$ -carotene were formed after exposure to white light (24 h).<sup>32</sup> Further illumination yielded only a small increase of 9-*cis*, whereas 13-*cis* slightly decreased. Thus, the observed equilibrium for the 13-*cis* isomer is confirmed by the literature.<sup>11,32</sup>

In contrast, irradiation with limited-wavelength spectra using cutoff filters led to completely different isomerization progressions (Figure 2B,C). Model system B mimicked typical growing conditions under foils or plastic materials, which are impermeable for light under 400 nm. Thus, a 420 nm optical filter was interposed to simulate greenhouse-grown conditions. In comparison to model system A, the isomerization process was significantly suppressed, illustrated by a reduced decrease of all-*trans*- $\beta$ -carotene to a concentration of just 90.08% (total loss of 6.91%). In the presence of energy-rich light a higher loss of 11.24% was observed before. Formations of 13-*cis*- and 15-*cis*- $\beta$ -carotene were deferred, too. Their maximal concentrations of 6.00% (13-*cis*) and 1.50% (15-*cis*) were reached after 3 h to form equilibria. Slight decreases at the end of irradiation were detected as well. The concentration of 9-*cis*- $\beta$ -carotene rose linearly to 2.47%, compared to 6.86% in model system A. Thus, the formation rate was almost 4 times higher in comparison to only 0.4%/h in model system B. The concentration of 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene showed no significant change during irradiation again. Although the degradation and formation of all isomers were attenuated, the pattern of isomerization was similar to that of model system A.

A 550 nm cutoff filter was used in model system C (Figure 2C) to simulate growing conditions under electric illumination. Commonly used sodium vapor lamps are designed especially for photosynthesis; that is, they emit only a wavelength range between 550 and 750 nm. Figure 2C illustrates that almost no isomerization occurred during this experiment. All-*trans*- $\beta$ -carotene decreased to just 94.16%, that is, a total loss of 2.38% compared to 6.91% in model B or 11.24% in model A. 13-*cis*- and 15-*cis*-isomers were formed in only small amounts. Linear increases from 2.39 to 3.61% (13-*cis*) and from 0.24 to 0.60% (15-*cis*) were observed. Similar results were recorded for 9-*cis*- $\beta$ -carotene, the concentration of which marginally rose to 1.27% starting at 0.75%. In contrast to both other models 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene was formed during this experiment. Here, its concentration increased significantly from 0.08 to 0.35%.

In addition, thermal treatment of  $\beta$ -carotene standard solutions was performed to exclude artifacts during extraction

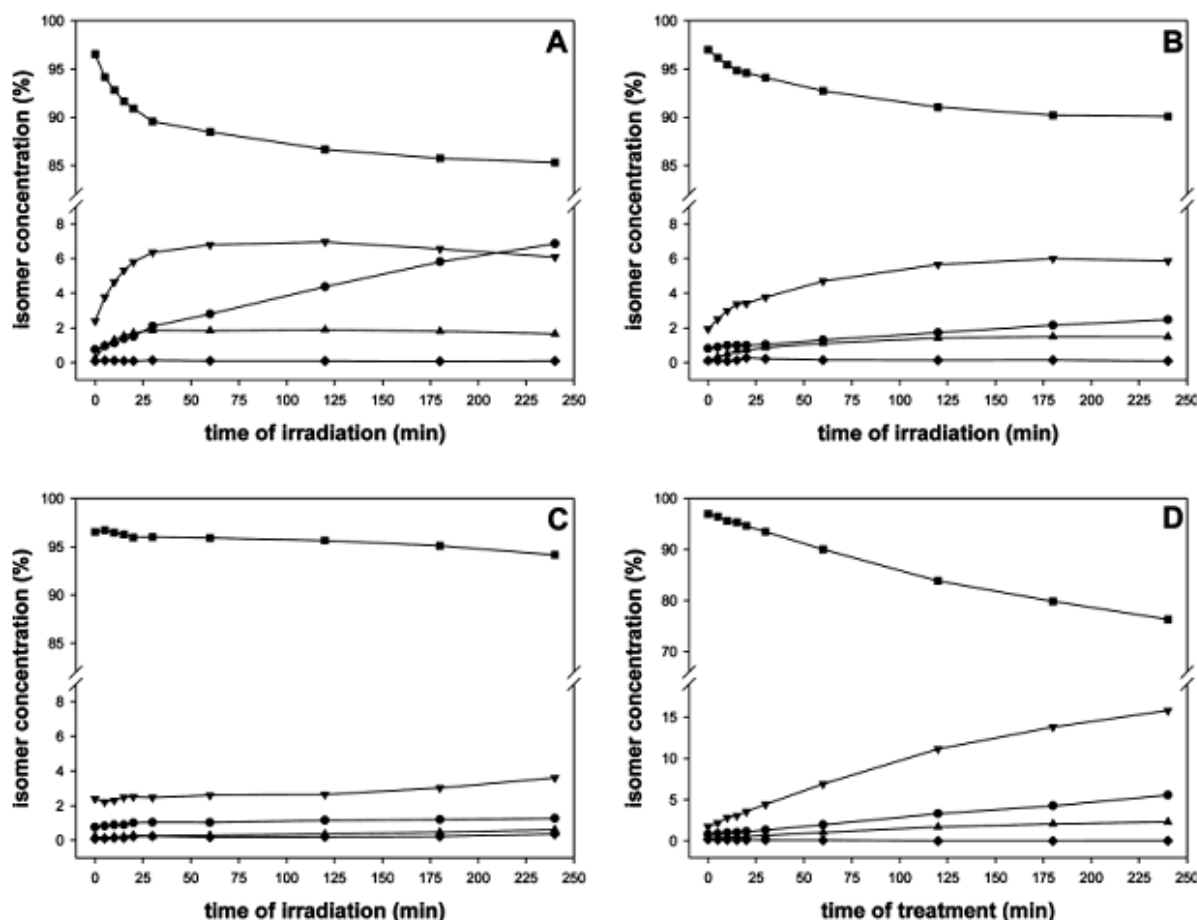


Figure 2. Concentrations of  $\beta$ -carotene isomers during irradiation with a halogen lamp over a period of 4 h using no filter (A), a 420 nm filter (B), a 550 nm filter (C), and thermal treatment at 65 °C (D), expressed as percentage of total  $\beta$ -carotene concentration (%): 15-*cis*- $\beta$ -carotene (▲); 13-*cis*- $\beta$ -carotene (▼); 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene (◆); all-*trans*- $\beta$ -carotene (■); 9-*cis*- $\beta$ -carotene (●).

and preparation for analyses. Simultaneous possible crossovers to photoinduced isomerization were clarified in this experiment. Thermal-triggered isomerization (Figure 2D) showed a similar pattern compared to model system B. All-*trans*- $\beta$ -carotene was degraded from 96.97 to 76.31% and thus resulted in the highest decrease during all model systems (total loss of 20.66%). In parallel, 13-*cis*- $\beta$ -carotene reached a concentration of 15.80% after 4 h of treatment at 65 °C, that is, nearly 3 times higher compared to model system A (6.09%). Furthermore, a linear increase was determined during heating with no equilibrium reached during the given time frame. Formation of 15-*cis*- $\beta$ -carotene resulted in a similar progress. With a concentration of 2.31% the highest level of all systems was generated after thermal processing (compared to 1.66% in model A). 9-*cis*- $\beta$ -Carotene was also formed during heating; however, its concentration rose to just 5.57% compared to 6.86% after irradiation in model system A. Interestingly, 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene was almost completely degraded after thermal treatment, when its concentration decreased to just 0.01%.

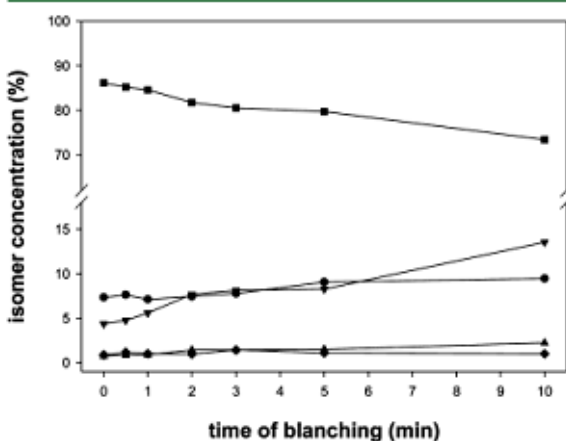
The results of all-*trans*- $\beta$ -carotene model systems (Figure 2) were in line with theoretical studies on isomerization of  $\beta$ -carotene by Guo et al.<sup>33</sup> Compared to 13-*cis*- and 15-*cis*- $\beta$ -carotene ( $\Delta E^\ddagger = 9.1$  and 9.7 kcal/mol ( $T_1$ )) the 9-*cis*-isomer

has the highest barrier of activation energy ( $\Delta E^\ddagger = 13.4$  kcal/mol ( $T_1$ )). This means that its formation is preferred in the presence of energy-rich light.<sup>33</sup> Simultaneously, its high rotational barrier for reverse reaction leads to the highest stability within all *cis*-isomers and explains the linear formation during irradiation, whereas 13-*cis*- $\beta$ -carotene was degraded after reaching a maximum (Figure 2A).<sup>33</sup> During irradiation in model systems B and C energy levels did not suffice to trigger the formation of hindered 9-*cis*- $\beta$ -carotene up to that level. These studies provide an explanation for the curve progressions, too. On the one hand, 13-*cis*- and 15-*cis*- $\beta$ -carotene represent the kinetically controlled products, because they were formed in high yields just at the beginning of irradiation. On the other hand, 9-*cis*- $\beta$ -carotene was formed during the whole period of illumination associated with a decrease of 13-*cis* and 15-*cis* at the end of treatment, identifying 9-*cis*- $\beta$ -carotene as the thermodynamically controlled product. Our experiments showed a formation of 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene during irradiation in model system C, whereas no formation was observed in model systems A and B. Accordingly, the barrier of activation energy has to be low to afford formation with energy-poor light. Otherwise, the isomer is characterized by a low rotational barrier for re-isomerization processes, which

explains constant concentrations during illumination with energy-rich light. During thermal processing the thermodynamic reaction product 9-*cis*- $\beta$ -carotene was generated to a lesser extent compared to the daylight irradiation model, but higher than in model systems B and C. Similar observations were described in the literature; for example, Pott et al. showed increased levels of 9-*cis*- $\beta$ -carotene in solar-dried mangoes, whereas conventionally dried mangoes contained high amounts of 13-*cis*- $\beta$ -carotene.<sup>10</sup>

Thus, 9-*cis*- $\beta$ -carotene and 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene were identified as potent markers for a possible differentiation of illumination conditions during cultivation of vegetables. In addition, 9,13-di-*cis* was not formed during thermal processing, which emphasizes its importance for a possible differentiation to photoinduced processes, whereas high levels of 13-*cis*- and 15-*cis*-isomers are useful parameters for the determination of thermal treatment of foods, as expected from the literature.<sup>9–13</sup> For example, Chandler et al. showed increased levels of 13-*cis*- $\beta$ -carotene in various canned fruits and vegetables compared to fresh samples.<sup>13</sup>

**Blanching of Fresh Spinach.** Fresh spinach leaves were blanched in boiling water for defined periods of time. This experiment assigned the results of the above model systems to a complex matrix and was established to identify possible differences between untreated spinach and frozen commercial spinach, which is commonly blanched to inactivate enzymes and microorganisms.<sup>34</sup> Blanching of spinach resulted in a comparable pattern (Figure 3) to thermal incubation of all-



**Figure 3.** Concentrations of  $\beta$ -carotene isomers during blanching at 100 °C over a period of 10 min: 15-*cis*- $\beta$ -carotene (▲); 13-*cis*- $\beta$ -carotene (▼); 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene (◆); all-*trans*- $\beta$ -carotene (■); 9-*cis*- $\beta$ -carotene (●).

*trans*- $\beta$ -carotene. The native all-*trans*- $\beta$ -carotene concentration of 86.14% decreased to 73.43% during 10 min of blanching, whereas 13-*cis* (from 4.34 to 13.53%) was formed dominantly. A similar increase was found for 15-*cis*- $\beta$ -carotene (from 0.71 to 2.22%) and 9-*cis*- $\beta$ -carotene (from 7.32 to 9.44%), whereas 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene slightly rose from 0.87 to 0.99%. These results comply with observations in the thermal treatment model system and, thus, verify their validity for follow-up studies on authentic spinach samples. Lemmens et al. showed comparable results during the thermal processing of carrot puree, where 13-*cis* was dominantly formed and 9-*cis* resulted in a lower reaction rate constant.<sup>11</sup>

#### Isomeric Composition of Authentic and Commercial Spinach Samples.

On the basis of the various model systems, four sets of spinach samples were analyzed with regard to their isomeric  $\beta$ -carotene pattern to identify possible differences caused by growing and processing conditions. All five  $\beta$ -carotene isomers showed significant differences compared to authentic field-grown and authentic greenhouse-grown spinach as depicted in Table 1 and Figure 4. In general, authentic field-grown spinach showed a higher *cis*-isomer concentration compared to authentic greenhouse-grown spinach, illustrated by a significantly lower concentration of all-*trans*- $\beta$ -carotene (−1.28%). Simultaneously, significantly higher concentrations of 9-*cis*- (+1.03%), 13-*cis*- (+0.56%), and 15-*cis*- $\beta$ -carotene (+0.27%) were determined. In contrast, 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene was the only isomer with a significantly lower concentration in field-grown spinach ( $0.25 \pm 0.03\%$ ) compared to greenhouse-grown samples ( $0.76 \pm 0.05\%$ ). Comparison of authentic field-grown and fresh commercial spinach led to two significant differences. Commercial spinach had a significantly lower concentration of all-*trans*- $\beta$ -carotene (−1.10%) combined with a significantly higher level of 9-*cis*- $\beta$ -carotene (+1.09%). A clear differentiation between authentic field-grown spinach and frozen commercial spinach was also possible; that is, five parameters with significant differences in the isomeric composition were observed. In this case 13-*cis*- and 15-*cis*- $\beta$ -carotene showed significantly higher concentrations (13-*cis*, +0.98%; 15-*cis*, +0.22%), whereas all-*trans* (−0.49%), 9-*cis* (−0.48%), and 13,15-di-*cis* (−0.22%) resulted in significantly lower concentrations.

Table 1 shows that differences in the isomeric profile between authentic field- and greenhouse-grown spinach completely corresponded to model systems, where all relevant isomers (13-*cis*, 15-*cis*, 9-*cis*) reached higher concentrations during energy-rich irradiation. Additionally, 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene had a significantly lower concentration in authentic field-grown spinach ( $0.25 \pm 0.03\%$ ) compared to authentic greenhouse-grown samples ( $0.76 \pm 0.05\%$ ). This significant difference between both authentic groups is based on the limited stability of 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene in the presence of UV light as observed during the above model systems. On the basis of our experiments the most potent markers (9-*cis*- and 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene) were plotted in two dimensions in Figure 4 and led to a clear differentiation of authentic field- and greenhouse-grown spinach samples.

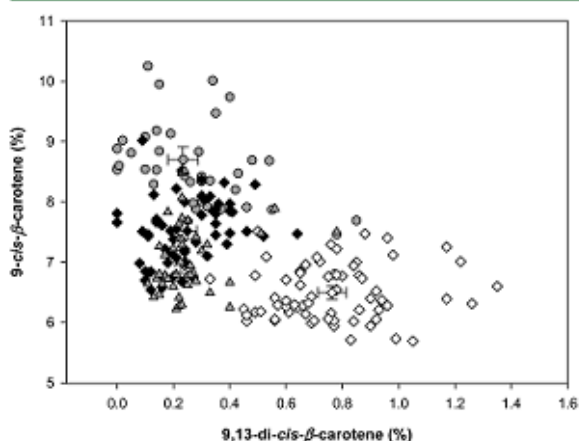
During analyses of both cultivated varieties 'Matador' and 'Bella' no significant differences were observed within the authentic groups; thus, no separation of samples was performed during plotting. Time of cultivation also led to no deviations within the groups.

A total of 37 fresh spinach samples available from local markets and food stores were then analyzed to prove the concept of differentiation of growing conditions for commercial spinach in open fields. Mean concentrations of the four above isomers showed no significant differences compared to authentic field-grown spinach, thus reflecting the typical cultivation of European spinach. In contrast, significant differences in all-*trans*- and 9-*cis*- $\beta$ -carotene were determined compared to field-grown spinach. The mean concentration of all-*trans* was 1.10% lower, whereas 9-*cis* was 1.09% higher concentrated. This led to a separation in two subgroups of fresh spinach. One part indeed correlated to authentic field-grown spinach. The other set lay above the cluster of the authentic field-grown group, characterized by a strong increase in 9-*cis*- $\beta$ -

**Table 1.** Mean Concentration ( $\pm$  Confidence Interval<sup>a</sup>) of All Analyzed  $\beta$ -Carotene Isomers Observed in Different Sets of Spinach Samples, Expressed as Percentage of Total  $\beta$ -Carotene

	authentic field-grown spinach (%) (n = 58)	authentic greenhouse-grown spinach (%) (n = 67)	fresh commercial spinach (%) (n = 37)	frozen commercial spinach (%) (n = 43)
15- <i>cis</i>	0.72 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.03#	0.64 $\pm$ 0.05	0.94 $\pm$ 0.05#
13,15-di- <i>cis</i>	0.80 $\pm$ 0.05	0.87 $\pm$ 0.05	0.75 $\pm$ 0.07	0.58 $\pm$ 0.06#
13- <i>cis</i>	4.37 $\pm$ 0.11	3.81 $\pm$ 0.11#	4.48 $\pm$ 0.12	5.35 $\pm$ 0.32*
9,13-di- <i>cis</i>	0.25 $\pm$ 0.03	0.76 $\pm$ 0.05#	0.28 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.04
all- <i>trans</i>	86.34 $\pm$ 0.21	87.62 $\pm$ 0.17#	85.24 $\pm$ 0.27#	85.85 $\pm$ 0.26#
9- <i>cis</i>	7.52 $\pm$ 0.14	6.49 $\pm$ 0.11#	8.61 $\pm$ 0.22#	7.04 $\pm$ 0.18#
$\mu\text{g/g}$ FW (range)	41.90 (20.35–66.12)	64.55 (41.61–84.22)	44.93 (16.53–66.88)	34.00 (21.33–46.48)

<sup>a</sup>#, significant difference compared to authentic field-grown spinach calculated by *t* test ( $\alpha = 0.01$ ); \*, significant difference compared to authentic field-grown spinach calculated by Welch test ( $\alpha = 0.01$ ).



**Figure 4.** 9-*cis*- versus 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene concentrations of authentic field-grown ( $\blacklozenge$ ), authentic greenhouse-grown ( $\diamond$ ), fresh commercial (gray circles), and frozen commercial (gray triangles) spinach samples, expressed as percentage of total  $\beta$ -carotene concentration (%).

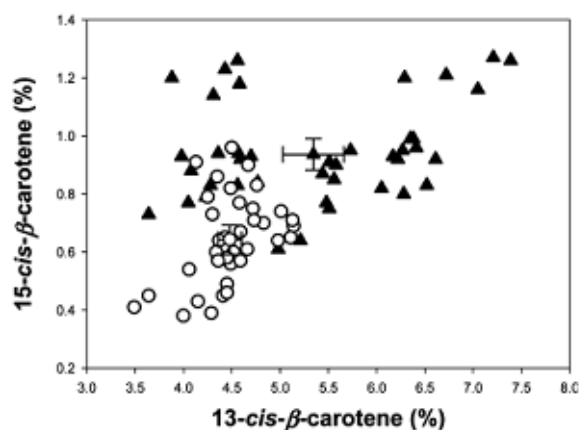
carotene. These fresh spinach samples originated from Italy, where obviously not only higher sunlight intensity but also higher average temperatures lead to an increase of 9-*cis*. Moreover, 9-*cis* is known to be enzymatically formed from all-*trans* during biosynthesis of carlactones and strigolactones triggered by D27 isomerase.<sup>35</sup> This enzymatic activity might also be influenced by light conditions or the variety of spinach. Thus, 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene is clearly the stronger parameter for differentiation of field- and greenhouse-grown spinach as its concentration was just influenced by photoinduced processes, leading to 3 times lower concentrations in the presence of energy-rich UV light. Notably, three samples of fresh commercial spinach showed crossovers to authentic greenhouse-grown spinach caused by conspicuous 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene concentrations between 0.55 and 0.85%. This strongly suggested that these samples were cultivated in greenhouses. The purchase date (December 3, 2012; origin, Italy) further supported this hypothesis, because climatic conditions during November and December do not suffice for effective cultivation of spinach.

Furthermore, a total of 43 frozen spinach samples available from local food stores were analyzed for their isomeric composition. The mean concentration of 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene was in the same range compared to authentic field-grown and fresh commercial spinach. Unexpectedly, the concentration of

9-*cis*- $\beta$ -carotene as a second marker for photoinduced isomerization was significantly lower than for the authentic field-grown set, but higher than for authentic greenhouse-grown samples. Still, two-dimensional plotting of 9-*cis*- and 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene allowed a clear assignment to authentic-field grown spinach, whereas almost no crossovers were observed to greenhouse-grown samples (Figure 4). This confirmed again that 9,13-di-*cis* is the stronger parameter for field-grown conditions and, in a broader sense, that commercial spinach is commonly cultivated under field-grown conditions in most European countries. Interestingly, three samples with unusually high concentrations of 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene (0.51–0.78%) compared to all other frozen samples overlapped to the greenhouse-grown set. According to the declaration, all three samples were produced in November 2012 with origin in Flanders, Belgium. In agreement with the literature, greenhouse cultivation is an intensive part of horticulture in the region of Flanders,<sup>36</sup> which for the present three samples was further supported by the date of production.

In addition, significantly higher concentrations of the identified thermal markers 13-*cis*- and 15-*cis*- $\beta$ -carotene in parallel to a significantly lower concentration of all-*trans* were determined in frozen commercial spinach samples compared to both authentic-grown sets (Table 1). According to the above blanching model experiments and data from the literature, the increased concentrations must be attributed to thermal processing.<sup>9,37</sup> In general, frozen commercial spinach is blanched directly after harvest to inactivate enzymes and microorganisms that could influence quality or storage stability.<sup>34</sup> Obviously, the resulting isomeric composition allowed for a differentiation between frozen spinach and untreated fresh spinach samples based on two-dimensional plotting of 15-*cis*- and 13-*cis*- $\beta$ -carotene concentrations (Figure 5). Although the mean concentration clearly differed from that of untreated fresh spinach samples, several crossovers were observed. This must be explained by considerable variations in temperature and duration of the industrial blanching processes. Nevertheless, this method seems to be applicable for a differentiation between blanched and untreated spinach. Comparable results were illustrated in the literature for blanched fruits and vegetables; for example, a 13-*cis*- $\beta$ -carotene concentration of 15.3% was determined in canned spinach compared to just 8.8% in fresh samples by Chandler et al.<sup>9,13</sup>

In summary, on the basis of various model systems, 9-*cis*- and especially 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene were identified as potent markers for a differentiation of illumination conditions during cultivation, whereas 15-*cis*- and 13-*cis*-isomers were most characteristic for thermal processing as expected from the



**Figure 5.** 15-*cis*- versus 13-*cis*- $\beta$ -carotene concentrations of fresh (○) and frozen commercial (▲) spinach samples, expressed as percentage of total  $\beta$ -carotene concentration.

literature.<sup>9–13</sup> Results were successfully transferred to complex matrices and allowed a clear differentiation between authentic field- and greenhouse-grown spinach and additionally between blanched (frozen) and fresh spinach samples. The applicability to commercial spinach was proven and led to the putative identification of 6 greenhouse-grown samples of a total of 80 commercial samples. Further studies will show if the results on carotenoid isomerization can be transferred to other vegetables for authentication of growing and processing conditions.

#### ■ ASSOCIATED CONTENT

##### Supporting Information

Additional experimental details. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

#### ■ AUTHOR INFORMATION

##### Corresponding Author

\* (M.A.G.) E-mail: [marcus.glomb@chemie.uni-halle.de](mailto:marcus.glomb@chemie.uni-halle.de). Fax: +49-345-5527341.

##### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### ■ REFERENCES

- O'Neill, M. E.; Carroll, Y.; Corridan, B.; Olmedilla, B.; Granado, F.; Blanco, I.; van den Berg, H.; Hininger, I.; Rousell, A. M.; Chopra, M.; Southon, S.; Thurnham, D. I. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Br. J. Nutr.* **2001**, *85*, 499–507.
- Maiani, G.; Periago Caston, M. J.; Catasta, G.; Toti, E.; Goni Cambronon, I.; Bysted, A.; Granado-Lorencio, F.; Olmedilla-Alonso, B.; Knuthsen, P.; Valoti, M.; Boehm, V.; Mayer-Miebach, E.; Behnslian, D.; Schlemmer, U. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 194–218.
- Krinsky, N. I. *The Antioxidant and Biological Properties of the Carotenoids*; New York Academy of Sciences: New York, 1998.
- Ma, L.; Dou, H. L.; Huang, Y. M.; Lu, X. R.; Xu, X. R.; Qian, F.; Zou, Z. Y.; Pang, H. L.; Dong, P. C.; Xiao, X.; Wang, X.; Sun, T. T.; Lin, X. M. Improvement of retinal function in early age-related macular degeneration after lutein and zeaxanthin supplementation: a randomized, double-masked, placebo-controlled trial. *Am. J. Ophthalmol.* **2012**, *154*, 625–634.

(5) Namitha, K. K.; Negi, P. S. Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 728–760.

(6) Singh, P.; Goyal, G. K. Dietary lycopene: its properties and anticarcinogenic effects. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2008**, *7*, 255–270.

(7) Schieber, A.; Carle, R. Occurrence of carotenoid *cis*-isomers in food: technological, analytical, and nutritional implications. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16*, 416–422.

(8) Courraud, J.; Berger, J.; Cristo, J. P.; Avallone, S. Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during *in vitro* digestion. *Food Chem.* **2013**, *136*, 871–877.

(9) Marx, M.; Stuparic, M.; Schieber, A.; Carle, R. Effects of thermal processing on *trans*-*cis*-isomerization of  $\beta$ -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations. *Food Chem.* **2003**, *83*, 609–617.

(10) Pott, I.; Marx, M.; Neidhart, S.; Mühlbauer, W.; Carle, R. Quantitative determination of  $\beta$ -carotene stereoisomers in fresh, dried, and solar-dried mangoes (*Mangifera indica* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4527–4531.

(11) Lemmens, L.; De, V. K.; Moelants Katlijn, R. N.; Colle Ines, J. P.; van Loey, A. M.; Hendrickx, M. E.  $\beta$ -Carotene isomerization kinetics during thermal treatments of carrot puree. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6816–6824.

(12) Bengtsson, A.; Brackmann, C.; Enejder, A.; Alminger, M. L.; Svanberg, U. Effects of thermal processing on the *in vitro* bioaccessibility and microstructure of  $\beta$ -carotene in orange-fleshed sweet potato. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 11090–11096.

(13) Chandler, L. A.; Schwartz, S. J. HPLC separation of *cis*-*trans* carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 669–672.

(14) Aman, R.; Schieber, A.; Carle, R. Effects of heating and illumination on *trans*-*cis* isomerization and degradation of  $\beta$ -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9512–9518.

(15) Reif, C.; Arrigoni, E.; Neuweiler, R.; Baumgartner, D.; Nystroem, L.; Hurrell, R. F. Effect of sulfur and nitrogen fertilization on the content of nutritionally relevant carotenoids in spinach (*Spinacia oleracea*). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5819–5824.

(16) Heymann, T.; Raeke, J.; Glomb, M. A. Photoinduced isomerization of lycopene and application to tomato cultivation. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11133–11139.

(17) Sadler, G.; Davis, J.; Dezman, D. Rapid extraction of lycopene and  $\beta$ -carotene from reconstituted tomato paste and pink grapefruit homogenates. *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 1460–1461.

(18) Kimura, M.; Rodriguezamaya, D. B.; Godoy, H. T. Assessment of the saponification step in the quantitative-determination of carotenoids and provitamins-A. *Food Chem.* **1990**, *35*, 187–195.

(19) Fang, L.; Pajkovic, N.; Wang, Y.; Gu, C.; van Breemen, R. B. Quantitative analysis of lycopene isomers in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 812–817.

(20) Isler, O.; Gutmann, H.; Lindlar, H.; Montavon, M.; Ruegg, R.; Rysler, G.; Zeller, P. Syntheses in the carotenoid series. VI. Synthesis of crocetin dialdehyde and lycopene. *Helv. Chim. Acta* **1956**, *39*, 463–473.

(21) Hengartner, U.; Bernhard, K.; Meyer, K.; Englert, G.; Glinz, E. Synthesis, isolation, and NMR-spectroscopic characterization of fourteen (*Z*)-isomers of lycopene and of some acetylenic didehydro- and tetrahydrolycopenes. *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 1848–1865.

(22) Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Eds. *Carotenoids Vol. 2: Synthesis*; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, 1996.

(23) Bannani, Y. L. An efficient and stereoselective synthesis of 9-*cis*-retinoic acid. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3542–3544.

(24) Negishi, E. I.; King, A. O.; Klima, W. L.; Patterson, W.; Silveira, A. Conversion of methyl ketones into terminal acetylenes and (*E*)-trisubstituted olefins of terpenoid origin. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2526–2528.

(25) Mata, E. G.; Thomas, E. J. Development of a synthesis of lankacidins – an investigation into 17-membered ring formation. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 785–799.

- (26) Murray, R. E.; Zweifel, G. Preparation of phenyl cyanate and its utilization for the synthesis of  $\alpha,\beta$ -unsaturated nitriles. *Synthesis-Stuttgart* **1980**, 150–151.
- (27) Jansen, H.; Bachthaler, E.; Förster, E.; Scharpf, C. *Gärtnerischer Pflanzenbau*, 3rd ed.; Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart, Germany, 1998.
- (28) Lee, M. T.; Chen, B. H. Separation of lycopene and its cis isomers by liquid chromatography. *Chromatographia* **2001**, *54*, 613–617.
- (29) Schierle, J.; Bretzel, W.; Buhler, I.; Faccin, N.; Hess, D.; Steiner, K.; Schuep, W. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem.* **1997**, *59*, 459–465.
- (30) Vecchi, M.; Englert, G.; Maurer, R.; Meduna, V. Separation and characterization of the cis-isomers of  $\beta,\beta$ -carotene. *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 2746–2758.
- (31) Strohschein, S.; Pursch, M.; Handel, H.; Albert, K. Structure elucidation of  $\beta$ -carotene isomers by HPLC-NMR coupling using a C-30 bonded phase. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1997**, *357*, 498–502.
- (32) O'Neil, C. A.; Schwartz, S. J. Photoisomerization of  $\beta$ -carotene by photosensitization with chlorophyll derivatives as sensitizers. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 631–635.
- (33) Guo, W. H.; Tu, C. Y.; Hu, C. H. Cis-trans isomerizations of  $\beta$ -carotene and lycopene: a theoretical study. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12158–12167.
- (34) Bahceci, K. S.; Serpen, A.; Gokmen, V.; Acar, J. Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *J. Food Eng.* **2005**, *66*, 187–192.
- (35) Alder, A.; Jamil, M.; Marzorati, M.; Bruno, M.; Vermathen, M.; Bigler, P.; Ghisla, S.; Bouwmeester, H.; Beyer, P.; Al-Babili, S. The path from  $\beta$ -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* **2012**, *335*, 1348–1351.
- (36) van den Bulck, N.; Coomans, M.; Wittemans, L.; Hanssens, J.; Steppe, K. Monitoring and energetic performance analysis of an innovative ventilation concept in a Belgian greenhouse. *Energy Buildings* **2013**, *57*, 51–57.
- (37) Kuki, M.; Koyama, Y.; Nagae, H. Triplet-sensitized and thermal isomerization of all-trans, 7-cis, 9-cis, 13-cis and 15-cis isomers of  $\beta$ -carotene: configurational dependence of the quantum yield of isomerization via the T1 state. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 7171–7180.



**4.3 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, XX, XXXXX – XXXXX**

Page 1 of 32

Journal of Agricultural and Food Chemistry

Lycopene Inhibits The Isomerization Of  $\beta$ -Carotene During Quenching Of Singlet Oxygen  
And Free Radicals

Thomas Heymann, Philipp Heinz and Marcus A. Glomb\*

Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-  
Mothes-Str. 2, 06120 Halle/Saale, Germany

\* To whom correspondence should be addressed (e-mail [marcus.glomb@chemie.uni-halle.de](mailto:marcus.glomb@chemie.uni-halle.de),  
Fax ++049-345-5527341)

1 **Abstract.** The present study aimed to investigate the influence of singlet oxygen and radical  
2 species on the isomerization of carotenoids. On the one hand, lycopene and  $\beta$ -carotene  
3 standards were incubated with 1,4-dimethylnaphthalene-1,4-endoperoxide that produced  
4 singlet oxygen *in situ*. (13Z)- and (15Z)- $\beta$ -carotene were preferentially generated at low  
5 concentrations of singlet oxygen, while high concentrations resulted in formation of (9Z)-  
6  $\beta$ -carotene. The addition of different concentrations of lycopene led to the same isomerization  
7 progress of  $\beta$ -carotene, but resulted in a decreased formation of (9Z)- $\beta$ -carotene and retarded  
8 degradation of (all-E)- $\beta$ -carotene. On the other hand, isomerization of  $\beta$ -carotene and  
9 lycopene was induced by ABTS-radicals, too. As expected from literature, chemical  
10 quenching was observed especially for lycopene, while physical quenching was preferred for  
11  $\beta$ -carotene. Mixtures of  $\beta$ -carotene and lycopene resulted in a different isomerization progress  
12 compared to the separate  $\beta$ -carotene model. As long as lycopene was present almost no  
13 isomerization of  $\beta$ -carotene was triggered, after that, strong formation of (13Z)-, (9Z)-, and  
14 (15Z)- $\beta$ -carotene was initiated. In summary, lycopene protected  $\beta$ -carotene against  
15 isomerization during reactions with singlet oxygen and radicals. These findings can explain  
16 the pattern of carotenoid isomers analyzed in fruits and vegetables, where lycopene containing  
17 samples showed higher (all-E)/(9Z)- $\beta$ -carotene ratios, and also in *in vivo* samples such as  
18 human blood plasma.

19

20 **Keywords:** lycopene,  $\beta$ -carotene, singlet oxygen, radicals, isomerization, quenching

21 **INTRODUCTION**

22 Carotenoids are well-known as potent antioxidants against reactive species, such as free  
23 radicals or singlet oxygen.<sup>1,2</sup> The high antioxidative capacity is closely associated to the  
24 elongated double bond backbone of these colored structures. Conn et al. postulated that the  
25 ability to quench <sup>1</sup>O<sub>2</sub> depends on the number of double bonds, which makes lycopene to the  
26 best singlet oxygen quencher of all natural carotenoids reported at this time.<sup>3</sup> However, the  
27 antioxidative capacity has not been determined for all known carotenoids, thus there might be  
28 even more powerful structures compared to lycopene. In this context, carotenoids were linked  
29 to numerous beneficial effects on human health by minimizing oxidative damage, and thus  
30 were suggested as a prevention against prostate cancer or cardiovascular diseases.<sup>4</sup> Moreover,  
31 some carotenoids, such as β-carotene, additionally have provitamin A activities that reflects  
32 another important aspect to human health, too.<sup>5</sup>

33 In principle, carotenoids can inactivate singlet oxygen or other reactive species through  
34 physical or chemical quenching (scavenging). Physical quenching is related to energy transfer  
35 reactions, where energy-rich species transfer their energy to the carotenoid molecule to reach  
36 an excited state. Subsequently, the carotenoid returns to its ground state by emitting thermal  
37 energy or by isomerization processes.<sup>6</sup> Chemical quenching or scavenging always includes  
38 chemical reactions between carotenoid and oxidative species and results in formation of  
39 cleavage products, such as apo-carotenals or carotenoid-endoperoxides. According to  
40 literature, interactions between carotenoids and singlet oxygen are dominantly quenched  
41 physically, while chemical quenching seems to be just a minor side reaction.<sup>1,7</sup> Surprisingly,  
42 there are almost no studies on isomerization processes triggered by singlet oxygen whereas a  
43 multitude of studies investigated the formation of oxidative metabolites. Foote et al. already  
44 showed in 1970 that (15Z)-β-carotene was transferred to (all-E)- during incubation with  
45 singlet oxygen.<sup>8</sup> On the one hand, *in vitro* experiments using carotenoid solutions led to a  
46 variety of aldehydes and ketones during treatment with singlet oxygen.<sup>6</sup> On the other hand,

47 endoperoxides, epoxides and lactones were also determined as carotenoid oxidation products.<sup>9</sup>  
48 Reactions with radicals were reported to lead to a much higher degradation of carotenoids  
49 compared to physical quenching mechanisms.<sup>1</sup>  
50 Only few studies illustrated possible synergistic effects between different antioxidants during  
51 quenching reactions; e.g. combinations of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene resulted in a  
52 significant stronger inhibition of lipid peroxidation than expected from individual  
53 inhibitions.<sup>10</sup>  
54 Up to now, there is a lack of knowledge concerning the isomerization process of carotenoids  
55 *in vivo* that could be induced by oxidative stress. Interestingly about 60% of total plasma  
56 lycopene were determined as (*Z*)-isomers (28% (5*Z*), 12% (13*Z*)/(15*Z*), 16% not specified-  
57 *Z*)<sup>11</sup>, while (9*Z*)- $\beta$ -carotene just occurred in trace amounts and (13*Z*) never exceeded 7% of  
58 total  $\beta$ -carotene.<sup>7</sup> On the one hand, an increased bioavailability of (*Z*)-lycopenes caused by a  
59 better solubility in chylomicrons is often proposed to be the reason for this observation.<sup>12</sup> On  
60 the other hand, various processes during digestion are hypothesized to trigger the  
61 isomerization of lycopene and  $\beta$ -carotene.<sup>13</sup> Especially the gastric milieu is considered to be  
62 the main reason for the isomerization of carotenoids,<sup>14</sup> because a strong formation of (*Z*-  
63 isomers at gastric pH as well as at elevated physiological temperatures was observed in  
64 several studies.<sup>13,14</sup> However, this cannot explain the dominant role of (all-*E*)- $\beta$ -carotene in  
65 human plasma in presence of only trace amounts of  $\beta$ -carotene isomers. Instead, enzymatic  
66 systems that could remove (*Z*)-isomers were discussed in literature to form products such as  
67 (9*Z*)-retinoic acid.<sup>7</sup> Furthermore, the difference in the distribution of (*Z*)-lycopenes  
68 determined in various human tissues cannot be clarified by these hypotheses at all.<sup>14</sup>  
69 Therefore, the physical and chemical quenching of carotenoids was investigated in detail, to  
70 identify possible mechanisms for the contradict ratios of carotenoid-(*Z*)-isomers in human  
71 plasma and tissues. The present work focussed on the underlying isomerization processes and  
72 allowed insights to additional synergistic effects between lycopene and  $\beta$ -carotene.

## 73 MATERIALS AND METHODS

74 **Chemicals.** Chemicals with highest purities were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen,  
75 Germany) and Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany) unless otherwise indicated. (15Z)-  
76  $\beta$ -carotene, (9Z)- $\beta$ -carotene, (15Z)-lycopene and (5Z)-lycopene were synthesized according to  
77 the literature.<sup>15</sup> Performed modifications were described in previous works.<sup>16,17</sup> (7Z,9Z)-  
78 lycopene and (7Z)-lycopene were synthesized as well using the same Wittig-strategy. In  
79 contrast to literature, geraniol served as the educt for both these isomers.<sup>15</sup> Pure (*E*)-citral was  
80 generated after oxidation by activated manganese dioxide.<sup>18</sup> The following steps were more or  
81 less identical to literature, with exception of the final *Lindlar*-hydrogenation, where a ratio of  
82 *Lindlar*-catalyst to *Lindlar*-poison of 1:23.000 (w:w) was used to accomplish an almost  
83 complete reaction. 11.0 mg of 7-*cis*-lycopene and 18.4 mg of (7Z,9Z)-lycopene were obtained  
84 with isomeric purities of 91% (7Z) and 83% (7Z,9Z). Standards were verified by 1D-, 2D-  
85 NMR spectra and HPLC–UV analyses. (All-*E*)-lycopene was isolated from tomato paste  
86 according to the below described extraction method, followed by precipitation with methanol.  
87 Analytical parameters for identification and characterization as well as NMR-data are  
88 summarized in Table S1. 1,4-Dimethylnaphthalene-1,4-endoperoxide was synthesized  
89 according to Wasserman et al.<sup>19</sup> Peroxidase from horseradish (HRP) with an activity of about  
90 150 U/mg was purchased as a lyophilized beige powder from Sigma-Aldrich (Taufkirchen,  
91 Germany). NMR solvents were purchased from ARMAR Chemicals (Döttingen, Switzerland)  
92 with a purity of 99.8 atom%D. Methanol and methyl *tert*-butyl ether as HPLC solvents were  
93 purchased from Sigma-Aldrich (HPLC grade  $\geq$  99.8%).  
94 **Fruit and Vegetable Samples.** In this study, different fruits and vegetables were  
95 characterized for their content and isomeric composition of carotenoids. Samples of  
96 watermelon, papaya, persimmon, broccoli, eggplant, grapefruit, tomato, spinach, zucchini and  
97 red pepper were purchased from local markets and food stores with different origins.

98 **Preparation of Fruits and Vegetables.** Fresh fruit and vegetable materials were  
99 homogenized at 0 °C with a mixer for 1 min under reduced light, if necessary with addition of  
100 water. Per sample between 15 to 30 g of the homogenate were frozen at -21 °C followed by  
101 lyophilisation for 3 to 4 days. Dry plant materials were extracted overnight by addition of *n*-  
102 hexane/acetone/ethanol (50/25/25) containing 0.01% butylated hydroxytoluene performed on  
103 an orbital shaker (170 U/min). Saponification was performed for about 20 h at room  
104 temperature by addition of a methanolic potassium hydroxide solution (10%) to the filtrated  
105 extracts, thus allowing an effective separation of fatty compounds and chlorophylls. Alkaline  
106 extracts were washed 5 times with a 2% sodium chloride solution and were dried under an  
107 argon stream. Obtained precipitates were dissolved and diluted in mobile phase  
108 (methanol/methy *tert*-butyl ether, 50/50) followed by HPLC–UV analyses. This method was  
109 fully adopted from prior works.<sup>16,17</sup> Thermal- or photo-induced isomerization processes were  
110 excluded during the whole preparation by working under reduced light and using aluminum  
111 foil or dark glassware. Temperature never exceeded 25 °C. Detailed investigations confirmed  
112 that the native isomeric composition was not influenced during storage and all steps of  
113 preparation.

114 **Preparation of Human Plasma.** A total of 15 human plasma samples of healthy donors  
115 between 22 and 35 years were obtained in cooperation with the university medical center  
116 Halle/Kröllwitz (Halle/Saale, Germany). All participants signed a written informed consent.  
117 Sample preparation was performed in compliance with literature.<sup>11</sup> Plasma was obtained after  
118 centrifugation of blood samples for 10 min at 4 °C (2375 rpm, 454 xg). Separated plasma was  
119 stored on ice until preparation. 1 mL plasma was diluted with 1 mL of double distilled water.  
120 Protein precipitation was performed by intensive shaking after addition of 2 mL ethanol.  
121 Plasma carotenoids were extracted with 4 mL of *n*-hexane on a shaking device (Vortex) for  
122 20 min. After centrifugation (15 min, 4500 rpm, 3400 xg) 3.8 mL of the organic layer were  
123 transferred to amber glassware vials and dried under argon stream. For HPLC–UV analyses,

124 the residues were dissolved in 200  $\mu\text{L}$  mobile phase (methanol/methyl *tert*-butyl ether, 50/50).

125 All samples were prepared in duplicate.

126 **Singlet Oxygen Assay.** Transformation of (all-*E*)-lycopene and (all-*E*)- $\beta$ -carotene was  
127 observed after treatment with various amounts of singlet oxygen, generated *in situ*, to gain a  
128 better understanding of chemical and physical isomerization processes. Concentration of  
129 singlet oxygen was referred to absolute amounts of carotenoids after incubation. First,  
130 separate incubations were performed with either lycopene or  $\beta$ -carotene as pure substances to  
131 investigate their individual isomerization process. Then mixed incubations were used to  
132 determine possible synergistic effects between lycopene and  $\beta$ -carotene.

133 Singlet oxygen was generated *in situ* by thermal degradation of 1,4-dimethylnaphthalene-1,4-  
134 endoperoxide (DMNEP). This compound was synthesized according to Wasserman et al.,<sup>19</sup>  
135 followed by flash chromatography (silica gel 60; *n*-hexane/EtOAc, 7:3) to yield a mixture of  
136 educt and DMNEP (1:1). NMR experiments confirmed reproducible release ratios of  
137 molecular singlet oxygen during treatment at 40°C for 20 min (about 37.7% of total applied  
138 amounts). For follow-up studies about 25 mg of DMNEP were diluted in 50 mL *n*-hexane to  
139 yield an absolute concentration of 0.59 nmol/ $\mu\text{L}$  singlet oxygen or 0.059 nmol/ $\mu\text{L}$  for diluted  
140 solutions (1:10), respectively.

141 2.5 mg of lycopene and  $\beta$ -carotene were dissolved in 50 mL hexane to final concentrations of  
142 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Aliquots (300  $\mu\text{L}$ ) were transferred to dark glass vials and various volumes of  
143 DMNEP (0.059 nmol/mL: 0, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250  $\mu\text{L}$ ; 0.59 nmol/mL: 50, 100, 200,  
144 500, 1000, 2200  $\mu\text{L}$ ) were added. For standardization, vials were filled up in each case to  
145 2.5 mL with *n*-hexane. The resulting solutions were stirred for 20 min at 40 °C and were  
146 directly quenched on ice after treatment. After drying under argon stream, residues were taken  
147 up in 400  $\mu\text{L}$  of mobile phase (methanol/MTBE, 50/50) followed by HPLC–UV analyses.

148 **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP and ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP Assay.** Carotenoids were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  
149 horseradish peroxidase in model systems to simulate oxidative effects *in vivo*. Kinetics were

150 analyzed by HPLC–UV and photometric measurements. Here, a protocol based on works of  
151 Özyürek et al. with some modifications was established.<sup>20</sup> First, 2.2 mg of carotenoid  
152 standards were dissolved in 4 mL acetone to final concentrations of 0.55 mg/mL of lycopene  
153 and  $\beta$ -carotene, respectively. Five mg horseradish peroxidase (HRP, Sigma Aldrich,  
154 ~150 U/mg) was dissolved in 5 mL of H<sub>2</sub>O/EtOH (1:1) resulting in HRP solution with  
155 150 U/mL. 0.32 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution was prepared from a 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution (Sigma Aldrich)  
156 by dilution in EtOH. Incubation solutions consisted of water (0.5 mL), ethanol (0.5, 0.4, 0.3,  
157 0.2, 0.1 and 0 mL) and 0.1 mL of carotenoid solution. Various amounts of 0.32 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
158 solution (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mL) and constant levels of HRP solution (0.05 mL) in  
159 ethanol (150 U/mL) were also added to dark glass vials. The resulting solutions (final volume  
160 of always 1.15 mL) were shaken at room temperature for 30 min followed by photometric  
161 analyses with a Jasco UV/VIS spectrophotometer V-530. Carotenoid concentrations were  
162 determined at 470 nm for lycopene and 450 nm for  $\beta$ -carotene. To analyze the isomeric  
163 composition the incubation solutions were extracted with dichloromethane (500  $\mu$ L for two  
164 times) and dried under argon stream. Residues were taken up in 400  $\mu$ L of mobile phase  
165 (methanol/MTBE, 50/50) followed by HPLC–UV analyses.

166 A similar model system was established to investigate quenching of radical species by  
167 carotenoids. 46.6 mg of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) was  
168 dissolved in 20 mL H<sub>2</sub>O to a final concentration of 2.33 mg/mL (4.25 mM). First, 0.1 mL of  
169 ABTS solution was incubated with HRP (0.05 mL) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (volumes as described before)  
170 after addition of H<sub>2</sub>O (0.4 mL) and EtOH (volumes as described before) with a total volume  
171 of 1.05 mL for 30 min at room temperature. After formation of the green to blue colored  
172 radical (ABTS<sup>•+</sup>), 0.1 mL of carotenoid solution was added and shaken for additional 10 min.  
173 Isomeric composition and degradation rates were analyzed after extraction and preparation as  
174 described above.



175 All described experiments were performed with pure lycopene and  $\beta$ -carotene standard  
176 solutions first. Subsequently, mixtures of both carotenoids were incubated in the model  
177 systems to determinate possible synergistic effects, maintaining the same concentration of  
178 total carotenoids to give comparable results to the single carotenoid incubation.

179 **Analytical HPLC–UV and HPLC–DAD.** Carotenoid profiles were determined for all  
180 samples by the following HPLC system. The HPLC apparatus (Jasco, Groß-Umstadt,  
181 Germany) consisted of a quaternary gradient pump (PU-2089 Plus) with degasser, a column  
182 oven (Jetstream Plus), an autosampler (AS-2055 Plus) and an UV-detector (UV-2075 Plus)  
183 operating at a wavelength of 450 nm. For DAD-analyses, a Jasco MD-2015 Plus detector was  
184 used. Chromatographic separations were performed on a stainless steel column packed with  
185 RP-C30 material (YMC Carotenoid, 5  $\mu$ m, 250  $\times$  4.6 mm, YMC Europe, Dinslaken,  
186 Germany) connected to a C30 guard column (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4.0 mm, YMC Europe, Dinslaken,  
187 Germany) using a flow rate of 0.65 mL min<sup>-1</sup>. Chosen column temperature was 20 °C. The  
188 mobile phase used was methanol (solvent A) and methyl *tert*-butyl ether (solvent B). Samples  
189 were injected at 40% B (held for 5 min), gradient then changed to 83% B in 50 min.  
190 Afterwards gradient changed to 100% B in 5 min (held for 10 min) and to 40% B in 5 min  
191 (held for 10 min). Retention time of the carotenoid isomers was checked with the authentic  
192 references where possible. Further identification and characterization was performed by  
193 HPLC–DAD and HPLC–MS/MS analyses, as described in previous works.<sup>16,17</sup> In particular,  
194 the Q-ratios were calculated by division of the absorption at the subsidiary “(Z)-peak” by the  
195 absorption at the absorption maxima. Based on these spectral characteristics, further isomers  
196 were assigned according to data from literature.<sup>11,15,21,22</sup> A representative chromatogram is  
197 given in Figure S1 to verify the applicability of the established method. Additionally, all data  
198 required for the identification or characterization of altogether 16 carotenoid isomers are  
199 summarized in Table S1.

200 For all samples (model incubations and biological samples), the isomeric composition was  
201 calculated by integration of all identified lycopene and  $\beta$ -carotene peaks first. Then, the areas  
202 of the separate peaks were divided by the sum of all lycopene and  $\beta$ -carotene values to  
203 express them as the percentage of total lycopene and  $\beta$ -carotene concentrations. Absolute  
204 concentrations and ratios of  $\beta$ -carotene and lycopene were determined by external calibration  
205 using (all-*E*) standard compounds analyzed at 450 nm.

206 **High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS).** The  
207 HPLC apparatus (Jasco, Groß-Umstadt, Germany) consisted of a pump (PU-2080 Plus) with  
208 degasser and quaternary gradient mixer, a column oven (Jasco Jetstream II) and an  
209 autosampler (AS-2057 Plus). Mass spectrometric detection was conducted on a API 4000  
210 QTrap LC-MS/MS system (Applied Biosystems/ MDS Sciex, Concord, ON, Canada)  
211 equipped with an API source using an atmospheric pressure chemical ionization (APCI)  
212 interface in negative mode. Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas. The optimized  
213 parameters for mass spectrometry of lycopene were Q1 536.7 amu, Q3 467.6 amu, DP -75 V,  
214 CE -27 eV, CXP -12 V.  $\beta$ -Carotene showed no fragmentation in Q3 (Q1 536.7 amu, DP -60  
215 V). The analytical parameters with respect to the used column and temperature were as  
216 described above for the analytical HPLC-UV and HPLC-DAD.

217 **Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR).**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were  
218 recorded on a Varian Unity Inova 500 instrument operating at 500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz  
219 for  $^{13}\text{C}$  and on a Varian VXR 400 spectrometer at 400 MHz for  $^1\text{H}$  and 100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ,  
220 respectively.  $\text{SiMe}_4$  was used as a reference for calibrating the chemical shift.

221 **Statistical Analysis.** Analyses of carotenoid concentrations and isomeric composition were  
222 performed in duplicate for each sample and resulted in coefficients of variation less than 5%  
223 in fruits and vegetables. Mean variation coefficients for carotenoid concentrations in human  
224 plasma samples were below 10% (maximal coefficients of variation < 20%). Determination of  
225 the isomeric composition in human plasma resulted in coefficients of variation less than 10%

226 for all measured isomers with concentrations of more than 1.5%. Confidence intervals were  
227 calculated with a probability value of 95%.

## 228 RESULTS AND DISCUSSION

229 **Identification of Carotenoid Isomers.** Identification of various lycopene and  $\beta$ -carotene  
230 isomers was performed according to Heymann et al. by comparison of retention times on  
231 HPLC–UV using commercially available and independently synthesized references.<sup>16,17</sup>  
232 Additional LC/APCI-MS analyses and HPLC–DAD with Q-ratio characterization was also  
233 used. The present synthesized (7Z)- and (7Z,9Z)-lycopene were added to the established  
234 analytical method. All representative data are summarized in Table S2 and Table S3. A total  
235 of 8 authentic reference standards verified the established analytical method as a powerful  
236 instrument for the determination of the carotenoid profile in model solutions and in biological  
237 samples, thus allowing a detailed description of isomerization processes in further  
238 experiments.

239 **Carotenoid Profile of Various Fruits and Vegetables.** First, various fruits and vegetables  
240 were analyzed for their carotenoid content as well as their isomeric lycopene and  $\beta$ -carotene  
241 composition. The results are summarized in Table 1. Tomatoes contained with about 68  $\mu\text{g/g}$   
242 fresh weight the highest lycopene concentration compared to the other analyzed food samples.  
243 This level was slightly higher than expected from literature, where usually concentrations  
244 between 20 and 50  $\mu\text{g/g}$  were reported.<sup>4</sup> In the present study, an almost complete array of  
245 lycopene isomers was determined in comparison to other works that might explain the  
246 increased total concentration with respect to literature. Moreover, the natural deviation  
247 between different tomato varieties has an impact on carotenoid biosynthesis, too.<sup>23</sup>  
248 Furthermore, about the half of all analyzed tomatoes were cultivated under field-grown  
249 conditions, which also has a great impact on the rate of lycopene biosynthesis.<sup>16</sup> All other  
250 results, e.g. determined in watermelons or pink grapefruits, complied with published data very  
251 well.<sup>4,24</sup> Contents of  $\beta$ -carotene showed no significant differences to data from comparable

252 studies, e.g. analyses of spinach, zucchini and eggplant resulted in concentrations of  
253 49.55  $\mu\text{g/g}$ , 1.60  $\mu\text{g/g}$  and 0.41  $\mu\text{g/g}$  fresh weight, while O'Neill et al. determined 44.89  $\mu\text{g/g}$ ,  
254 1.80  $\mu\text{g/g}$  and 0.50  $\mu\text{g/g}$  fresh weight,<sup>24</sup> respectively. In contrast to literature, the analysis of  
255 pepper led to considerable higher amounts of  $\beta$ -carotene (15.76  $\mu\text{g/g}$  vs. 4.8  $\mu\text{g/g}$ ).<sup>24</sup> Here, the  
256 high levels of  $\beta$ -carotene in pepper fruits might result naturally from the specific cultivation  
257 variety, but can be influenced also by many other factors, e.g. light, temperature or humidity.  
258 The determination of the isomeric pattern of unprocessed food samples resulted in ratios  
259 between 70 and 91% of the (all-*E*)-isomers, as apparent from Table 1. This reflects their  
260 predominant occurrence in nature, and has been reported in literature before.<sup>13,25</sup> Mean  
261 concentrations of (all-*E*)- $\beta$ -carotene and of (all-*E*)-lycopene of all analyzed food samples  
262 deviated only in a small range, e.g. for (all-*E*)- $\beta$ -carotene between 84.0 to 91.3%. Only in  
263 persimmons lower levels of about 76% were observed. Additionally, (all-*E*)-lycopene was  
264 determined with concentrations from 78.7 to 80.4%. On the other hand, (*Z*)-isomers of  
265  $\beta$ -carotene and lycopene accounted only for about 15% and 20%, respectively, as has been  
266 described in literature before.<sup>26,27</sup> However, the present detailed studies on carotenoid isomers  
267 projected a significant difference in the observed (*9Z*)- $\beta$ -carotene concentration between  
268 lycopene free and lycopene containing fruits and vegetables. While mean levels between 6.0  
269 to 9.7% were determined in samples such as broccoli (9.7%), spinach (7.4%) or red pepper  
270 (6.0%), the (*9Z*)- $\beta$ -carotene concentration never exceeded 4.0% in lycopene rich samples like  
271 tomato (2.6%), grapefruit (0.7%) or watermelon (2.9%). Thus, the (*9Z*)- $\beta$ -carotene  
272 concentration allowed for a clear differentiation between lycopene free and lycopene  
273 containing samples, as shown in Figure 1.  
274 Especially leafy green vegetables were reported for raised (*Z*)-isomer concentrations  
275 compared to others,<sup>28</sup> resulting in decreased (all-*E*)/(*9Z*) ratios (8.8 to 14.7, Table 1). Here,  
276 especially chlorophyll was proposed to act as a sensitizer that triggers the isomerization  
277 during photosynthesis.<sup>29</sup> Nevertheless, the isomerization process of  $\beta$ -carotene seems to be

278 suppressed in the presence of lycopene. Our recent studies on the photo-induced  
279 isomerization process of carotenoids confirmed this observation. While energy-rich  
280 illumination resulted in significant higher levels of (9Z)- $\beta$ -carotene in field-grown spinach,<sup>17</sup>  
281 no difference in the isomeric  $\beta$ -carotene composition was observed between field- and  
282 greenhouse-grown tomato samples. As a consequence for the later, only the increased  
283 concentrations of (Z)-lycopenes led to a differentiation of light regimens during growing.<sup>3,16</sup>  
284 This means, that most likely lycopene was able to minimize (i.e. quench) the photo-induced  
285 isomerization of (all-E)- $\beta$ -carotene and thereby preserves its biological function as a vitamin-  
286 A-precursor.<sup>4</sup>

287 **Carotenoid Profile of Human Blood Plasma.** The results of the analyses of plasma samples  
288 from 15 healthy subjects (age from 22 to 39) are also summarized in Table 1. Comparable to  
289 analyzed food samples, (all-E)- $\beta$ -carotene dominated with a mean concentration of 89.3%,  
290 while (9Z)- $\beta$ -carotene was determined at only 1.7%. (13Z)- $\beta$ -carotene represented the  
291 predominant (Z)-isomer with concentrations between 5.1 and 11.3%. These results completely  
292 complied with observations from literature.<sup>30,31</sup> Contrary, (all-E)-lycopene just occurred with  
293 a concentration of 37.3%, while (5Z)-lycopene was the dominant (Z)-isomer (29.8%)  
294 followed by (13Z) (14.1%), which was inline with literature, too.<sup>11,14,31</sup>

295 Interestingly, the ratio of (all-E)- to (9Z)- $\beta$ -carotene in human plasma was in the same range  
296 as for lycopene containing fruits (Figure 1). The chromatographic pattern of  $\beta$ -carotene was  
297 quiet similar to lycopene containing fruits such as tomatoes or watermelon, characterized by  
298 very low levels of the (9Z)-isomer. This indicated that the suggested protective effect of  
299 lycopene on other carotenoids might be applicable for human plasma samples, too. Different  
300 to fruits, there were significant higher amounts of (5Z)-lycopene found *in vivo*.

301 **Incubation of lycopene and  $\beta$ -carotene with singlet oxygen as model system.** The  
302 isomerization process during individual incubations of (all-E)- $\beta$ -carotene (A) and (all-E)-  
303 lycopene (B) with singlet oxygen is illustrated in Figure 2. As expected from literature, only

304 physical quenching but no chemical quenching was observed during the reaction with singlet  
305 oxygen.<sup>32</sup>

306 The concentration of (all-*E*)-lycopene was degraded from initially 88.1% to 80.2%, while  
307 especially (9*Z*)-lycopene (from 0.3% to 5.2%) and (5*Z*)-lycopene (from 4.2% to 8.4%) were  
308 generated in high amounts. Contrary, (7*Z*)- (1.4% to 1.2%) and (15*Z*)-lycopene (0.6% to  
309 0.7%) just slightly changed at constant low levels during incubation. The isomerization  
310 process of (13*Z*)-lycopene was characterized by a strong increase (maximum of 7.3%) at  
311 singlet oxygen concentrations up to 1.05 nmol per nmol lycopene, while it was degraded at  
312 higher singlet oxygen amounts to reach an equilibrium concentration of about 3.4%. In  
313 contrast, the formation of (5*Z*)- and (9*Z*)-lycopene showed almost linear increases with rising  
314 singlet oxygen concentrations. The remaining isomers showed no significant changes.

315 Comparable to lycopene the concentration of (all-*E*)- $\beta$ -carotene was reduced from 94.2% to  
316 85.1%. Only (9*Z*)- $\beta$ -carotene (from 2.0% to 9.3%) significantly increased with an almost  
317 linear fashion. (13*Z*)- $\beta$ -Carotene and (15*Z*)- $\beta$ -carotene were formed only at low  
318 concentrations up to 2.8 nmol singlet oxygen per nmol  $\beta$ -carotene and reached subsequently  
319 equilibrium states at about 4.5% (13*Z*) and 1.9% (15*Z*). All other  $\beta$ -carotene isomers showed  
320 no significant changes.

321 These model systems illustrated defined processes during incubation of carotenoids with  
322 singlet oxygen. Obviously, the isomerization proceeded in two stages. In the first stage at low  
323 singlet oxygen concentrations, the isomerization progress was similar to thermal induced  
324 processes as described by Kuki et al., where mainly the kinetically controlled products such as  
325 (15*Z*)- and (13*Z*)- $\beta$ -carotene as well as (15*Z*)- and (13*Z*)-lycopene were formed  
326 preferentially.<sup>26,33</sup> The second part of the reaction at high amounts of singlet oxygen (>10.5  
327 nmol/nmol  $\beta$ -carotene, >4.2 nmol/nmol lycopene) was characterized by a dominant increase  
328 of the thermodynamic products like (9*Z*)- $\beta$ -carotene and (5*Z*)-lycopene. These isomers are  
329 normally observed during high energy processing of foods, e.g. during high pressure

330 sterilization or irradiation with UV-light.<sup>16,27,36</sup> The results were inline to theoretical studies  
331 on the enthalpies of carotenoid isomers.<sup>34,35</sup> Accordingly, (9Z)- $\beta$ -carotene has the highest  
332 rotational barrier to reisomerize to the (all-E) configuration compared to all other isomers  
333 ( $\Delta E_r^\ddagger = 26.0$  kcal/mol).<sup>35</sup> Thus, (9Z)- $\beta$ -carotene is the most stable isomer that is only formed  
334 during high energetic stimulation. Rotational barriers for reisomerization of (13Z)- $\beta$ -carotene  
335 ( $\Delta E_r^\ddagger = 21.5$  kcal/mol) and (15Z)- $\beta$ -carotene ( $\Delta E_r^\ddagger = 20.6$  kcal/mol) are significant lower,  
336 which explains equilibrium at high singlet oxygen concentrations, associated to their lower  
337 stabilities.<sup>35</sup> The same accounts for lycopene, where (13Z)- and (15Z)-lycopene were  
338 calculated to be the kinetic controlled products, whereas (9Z)- and especially (5Z)-lycopene  
339 represent the thermodynamic controlled products. Taken together, the present results illustrate  
340 that the energy input by singlet oxygen is located somewhere between thermal and  
341 photochemical excitation. Furthermore, the singlet-oxygen induced isomerization of  
342 carotenoids is far more complex than illustrated in literature so far, where only the complete  
343 transformation of (15Z)- and (13Z)-isomers to the (all-E)-configuration was reported for the  
344 interaction with singlet oxygen.<sup>8,37</sup>

345 The similar isomeric pattern in the single incubations changed abruptly in mixed  
346  $\beta$ -carotene/lycopene reactions, where only lycopene displayed almost the same isomerization  
347 progress as shown before. Various ratios were chosen (38%, 56%, 64% and 73% lycopene)  
348 with the total carotenoid concentration maintained at the same level as used in the single  
349 carotenoid incubation. Specific formation rates of the 4  $\beta$ -carotene-isomers were calculated by  
350 linear fitting. In case of (13Z) and (15Z) only the linear ranges at the start of the incubations  
351 were used for calculation to allow comparability. As depicted in Figure 3, the rates for (9Z)  
352 decreased with increasing lycopene concentrations from 0.143%/nmol singlet oxygen per  
353 nmol carotenoid (0% lycopene) to just 0.051%/nmol singlet oxygen per nmol carotenoid  
354 (73% lycopene), thus suppressing the formation to about one third. The opposite effect was  
355 observed for the isomerization of (all-E)- $\beta$ -carotene, where rates decreased from -0.1589 to

356 -0.0757%/nmol singlet oxygen per nmol carotenoid. At lycopene contents of more than 50%  
357 the formation of (15Z)- and (13Z)-isomers was effectively suppressed, while smaller amounts  
358 of lycopene clearly led to increased formation compared to lycopene free systems. Inline with  
359 the theoretical studies by Guo et al.,<sup>35</sup> lycopene reduces the potential energy levels during the  
360 physical quenching of singlet oxygen. Low-energy processes rather result in the formation of  
361 kinetically controlled products, i.e. (13Z) and (15Z)- $\beta$ -carotene. Only very high amounts of  
362 lycopene significantly minimized the energy levels, leading to reduced formation of both  
363 isomers. In contrast, even small amounts of lycopene were able to suppress the formation of  
364 (9Z)- $\beta$ -carotene with the highest activation energy within all mono-(Z)-isomers,<sup>35</sup> thus  
365 preventing the generation of this thermodynamic product at low-energy levels.

366 These findings proved, that lycopene was able to suppress the singlet oxygen induced  
367 isomerization of (all-E)- $\beta$ -carotene probably as a result of its higher quenching activity.<sup>2</sup>  
368 Consequently,  $\beta$ -carotene is preserved in its (all-E) configuration and maintains its potential  
369 as a vitamin-A-precursor *in vivo*. Singlet oxygen naturally occurs in air, where it is generated  
370 during various reactions especially with oxygen and UV-light.<sup>38</sup> The presence of sensitizers,  
371 such as chlorophyll during photosynthesis, or oxidation stress could also lead to singlet  
372 oxygen *in vivo*.<sup>6</sup> Unfortunately the determination of singlet oxygen concentrations is a  
373 technically challenging problem as reported by Kanofsky. Consequently, only quantum yields  
374 and lifetime experiments were described in literature.<sup>39</sup> Thus, it is hard to assess if the used  
375 concentrations of singlet oxygen in our model systems might be applicable for biological  
376 systems.

377 **Incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Horseradish Peroxidase (HRP).** For simulation of reactions  
378 between carotenoids and reactive radical oxygen species first a model system of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  
379 horseradish peroxidase (HRP) was used. In theory, carotenoid peroxides are formed from  
380 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that is enzymatically catalyzed by HRP. This reaction should result in a loss of total  
381 carotenoids as a measure for chemical quenching and decomposition. However, no relevant



382 changes in extinction were found (data not shown). Amounts of carotenoids stayed at a  
383 constant level with the pattern of isomers nearly unchanged. Consequently neither chemical  
384 nor physical quenching was detected. It can only be speculated that the missing specificity of  
385 HRP to carotenoids was the reason for the lack in reactivity.

386 **Incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Horseradish Peroxidase (HRP) and ABTS.** Alternatively, the  
387 protective effect of lycopene on radical induced  $\beta$ -carotene isomerization was confirmed by  
388 experiments with ABTS-radicals in presence of hydrogen peroxide. In contrast to the reaction  
389 of carotenoids with singlet oxygen, the interaction with free radicals led to strong chemical  
390 quenching as reported in literature.<sup>40</sup> This was evidenced by a strong degradation of both  
391 carotenoids. However, at high concentrations, lycopene was degraded completely, whereas  
392 loss of  $\beta$ -carotene was only partially. Figure 4 shows, that in  $\beta$ -carotene/lycopene mixed  
393 incubations (initial lycopene content 20%, see Figure 4 (○)) degradation of 54% of lycopene  
394 was already reached at 1.4 eq. of radical concentration, while at 2.8 eq. lycopene was almost  
395 completely degraded. Parallel to degradation, lycopene showed also strong isomerization  
396 indicating physical quenching processes (data not shown). Higher lycopene proportions  
397 (initial lycopene content 67%, see Figure 4 (●)) shifted the degradation to higher radical  
398 concentrations. In contrast, even at 7.5 eq.  $\beta$ -carotene degradation reached only 50%. This  
399 enabled us to study the effect of radicals on the physical quenching of lycopene in detail. The  
400 absolute degradation rates were calculated by comparison of the measured concentrations to  
401 the initial starting carotenoid concentration during this study.

402 Figure 5A shows for single  $\beta$ -carotene reaction mixtures that increasing concentrations of  
403 ABTS radicals and hydrogen peroxide led to a strong degradation of (all-*E*)- $\beta$ -carotene (from  
404 95.4% to 70.8%) paralleled by considerable increases of (9*Z*)- (from 0.6% to 5.1%) and  
405 (13*Z*)- $\beta$ -carotene (from 3.0% to 22.3%) by a factor of almost 10. (15*Z*)- $\beta$ -Carotene  
406 concentration raised from 0.4% to 1.6%. The isomerization progress was immediately  
407 induced at low radical concentrations (★ at about 0.5 nmol hydrogen peroxide per nmol

408 carotenoid). At high concentrations at about 6.0 nmol hydrogen peroxide per nmol carotenoid  
409 almost equilibrium states were reached for (all-*E*), (13*Z*) and (15*Z*), while (9*Z*) still increased  
410 in a linear fashion. A similar formation progress was described by Jeevarajan et al. and Gao et  
411 al., who both identified carotenoid radical kations and dikationes as precursors for the  
412 isomerization during radical quenching reactions.<sup>41,42</sup> In mixed lycopene/ $\beta$ -carotene  
413 incubations, the isomerization pattern of  $\beta$ -carotene changed significantly. Almost no  
414 degradation of (all-*E*)- $\beta$ -carotene was observed as long as lycopene was still present at  
415 adequate concentrations, suppressing the isomerization of  $\beta$ -carotene at low hydrogen  
416 peroxide concentrations. Specifically, a mixed carotenoid solution with an initial lycopene  
417 content of 20% showed constant (all-*E*) levels up to concentrations of 1.7 nmol hydrogen  
418 peroxide per nmol carotenoid (Figure 5B). After that point (★) the strong isomerization  
419 coincided with the complete consumption of lycopene (see Figure 4 (○)), i.e. 79% of total  
420 lycopene were consumed at 2.5 nmol hydrogen peroxide per nmol carotenoid. From this point  
421  $\beta$ -carotene (*Z*)-isomers quickly increased comparable to the single incubations. A higher  
422 percentage of lycopene (67%, Figure 5C) moved the point of induction to even higher  
423 concentrations of hydrogen peroxide per carotenoid. In this system, 87% lycopene were  
424 degraded at concentrations of 5.8 nmol hydrogen peroxide per nmol carotenoid (Figure 4 (●)).  
425 This means that only after complete oxidative breakdown of lycopene and thereby the loss of  
426 its high antioxidative quenching capacity,  $\beta$ -carotene (*Z*)-isomers are formed in significant  
427 amounts.

428 The isomeric composition of  $\beta$ -carotene and lycopene *in vivo* is extensively discussed in  
429 literature, because of the strong discrepancy in the (*Z*)-isomer concentrations. For a long time,  
430 the high content of (*Z*)-lycopene was related to a supposedly increased solubility and thus  
431 bioavailability of these compounds.<sup>30,43</sup> However, later studies disproved these results,<sup>44,45</sup> and  
432 proposed isomerization processes during digestion to be the most plausible explanation for the  
433 differences in the isomeric pattern *in vivo*.<sup>14</sup> Indeed, under gastric pH the isomerization of

434 lycopene was triggered to a much higher extend compared to the relatively stable  $\beta$ -  
435 carotene.<sup>13</sup> Furthermore, the supplementation of almost exclusively (all-*E*)-lycopene resulted  
436 in a strong increase of the (9*Z*)-lycopene plasma levels, which substantiated *in vivo*  
437 isomerization processes.<sup>46</sup> Moreover, thermal effects during digestion are suggested to explain  
438 the determined isomeric composition *in vivo*, too.<sup>47</sup> Various model systems showed that  
439 lycopene is more susceptible to thermal energy than  $\beta$ -carotene.<sup>47</sup> Additionally, the crystalline  
440 structure of the carotenoids in the food matrices was reported to have an enormous impact on  
441 the bioavailability and therefore on the isomerization in the gastric milieu, too. For example,  
442 lycopene is embedded in crystalline form in the chromoplasts of tomatoes that effectively  
443 protects the configuration from external influences such as acids or thermal energy.<sup>47,48</sup>  
444 Contrary, the liquid crystals in mango or papaya were shown to be transferred into the gastric  
445 micelles much more easier thus allowing an accelerated isomerization with respect to their  
446 thermodynamic characteristics.<sup>34,49,50</sup> On the other hand, (all-*E*)-lycopene was suggested to  
447 aggregate in the intestine to form crystals. This notion would lead to a reduced bioavailability  
448 and consequently to an accumulation of (*Z*)-isomers (with an assumed better solubility) in the  
449 human blood.<sup>51</sup>

450 Nevertheless, all known hypotheses are not able to explain the variable ratio of (*Z*)-lycopenes  
451 in various human organs and tissues, e.g. while about 80% of total lycopene was determined  
452 as (*Z*)-isomers in tissues of the lymph or prostata, only between 30 and 50% was isomerized  
453 in samples from the lung or serum.<sup>31,43,52</sup>

454 The present results strongly underpin the excellent quenching abilities of lycopene to explain  
455 these observations. All experiments clearly demonstrated that lycopene was able to reduce  
456 (singlet oxygen) or even to inhibit (radicals) the formation of (*Z*)- $\beta$ -carotene isomers. It must  
457 be concluded that these findings are also true for *in vivo* systems. Here, oxidative stress in  
458 form of singlet oxygen and radicals triggers the isomerization of carotenoids, as proposed  
459 earlier in literature.<sup>31,52</sup> Lycopene acts as the effective quenching shield to protect other

460 carotenoids against oxidative stress, i.e.  $\beta$ -carotene is preserved in its biological active (all-*E*)-  
461 configuration, as illustrated in Figure 6.<sup>4</sup> During this process, lycopene gets highly isomerized  
462 and degraded. This rationale is also confirmed by studies of Stahl et al., who determined  
463 increased (9*Z*)-lycopene serum levels after consumption of processed tomato juice that only  
464 contained traces of this isomer.<sup>31</sup> Thus, the bioavailability theory to explain the different  
465 isomerization extend of specific carotenoids might be of minor, if not of no relevance to *in*  
466 *vivo* systems. In contrast, our lycopene protective theory is also capable to understand the  
467 deviating (*Z*)-lycopene isomer concentrations found in specific human tissues, as different  
468 metabolic activities also entail different levels of oxidative stress.

469 In summary, our studies confirmed the outstanding quenching capabilities of lycopene in the  
470 reaction with radicals and activated oxygen species. This characteristic protects other  
471 carotenoids as  $\beta$ -carotene from degradation and isomerization, and explains the isomeric  
472 carotenoid patterns found in foods, but also *in vivo*.

473

474 SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE:

475 Analytical and spectroscopic data of carotenoid isomer references.

476

477 ACKNOWLEDGMENTS

478 We thank the team of Prof. Dr. M. Girndt from the department of internal medicine II,  
479 Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Germany, for obtaining the human plasma  
480 samples.

481

## 482 REFERENCES

- 483 (1) Edge, R.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G. The carotenoids as anti-oxidants — a review,  
484 *J. Photochem. Photobiol., B*. **1997**, *41*, 189–200.
- 485 (2) Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid  
486 singlet oxygen quencher, *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *274*, 532–538.
- 487 (3) Conn, P. F.; Schalch, W.; Truscott, T. The singlet oxygen and carotenoid interaction, *J.*  
488 *Photochem. Photobiol., B*. **1991**, *11*, 41–47.
- 489 (4) Namitha, K. K.; Negi, P. S. Chemistry and Biotechnology of Carotenoids, *Crit. Rev. Food*  
490 *Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 728–760.
- 491 (5) Voutilainen, S.; Nurmi, T.; Mursu, J.; Rissanen, T. H. Carotenoids and cardiovascular  
492 health, *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83*, 1265–1271.
- 493 (6) Ramel, F.; Birtic, S.; Cuine, S.; Triantaphylides, C.; Ravanat, J.-L.; Havaux, M. Chemical  
494 Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants, *Plant Physiol.* **2012**, *158*, 1267–1278.
- 495 (7) Stahl, W.; Sies, H. Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of  
496 carotenoids, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *691*, 10–19.
- 497 (8) Foote, C. S.; Chang, Y. C.; Denny, R. W. Chemistry of singlet oxygen. XI. Cis-trans  
498 isomerization of carotenoids by single oxygen and a probable quenching mechanism, *J. Am.*  
499 *Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5218–5219.
- 500 (9) Fiedor, J.; Fiedor, L.; Haeßner, R.; Scheer, H. Cyclic endoperoxides of  $\beta$ -carotene,  
501 potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen, *Biochim.*  
502 *Biophys. Acta, Bioenerg.* **2005**, *1709*, 1–4.
- 503 (10) Palozza, P.; Krinsky, N. I.  $\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -tocopherol are synergistic antioxidants,  
504 *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *297*, 184–187.
- 505 (11) Schierle, J.; Bretzel, W.; Buhler, I.; Faccin, N.; Hess, D.; Steiner, K.; Schuep, W.  
506 Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma, *Food Chem.* **1997**,  
507 *59*, 459–465.
- 508 (12) Honest, K. N.; Zhang, H. W.; Zhang, L. F. Lycopene: Isomerization Effects on  
509 Bioavailability and Bioactivity Properties, *Food Rev. Int.* **2011**, *27*, 248–258.
- 510 (13) Re, R.; Fraser, P. D.; Long, M.; Bramley, P. M.; Rice-Evans, C. Isomerization of  
511 Lycopene in the Gastric Milieu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281*, 576–581.
- 512 (14) Holloway, D. E.; Yang, M.; Paganga, G.; Rice-Evans, C. A.; Bramley, P. M.  
513 Isomerization of dietary lycopene during assimilation and transport in plasma, *Free Radical*  
514 *Res.* **2000**, *32*, 93–102.
- 515 (15) Hengartner, U.; Bernhard, K.; Meyer, K.; Englert, G.; Glinz, E. Synthesis, isolation, and  
516 NMR-spectroscopic characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene and of some  
517 acetylenic didehydro- and tetrahydrolycopenes, *Helv. Chim. Acta.* **1992**, *75*, 1848–1865.
- 518 (16) Heymann, T.; Raeke, J.; Glomb, M. A. Photoinduced isomerization of lycopene and  
519 application to tomato cultivation, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11133–11139.
- 520 (17) Heymann, T.; Westphal, L.; Wessjohann, L.; Glomb, M. A. Growing and Processing  
521 Conditions Lead to Changes in the Carotenoid Profile of Spinach, *J. Agric. Food Chem.* **2014**,  
522 *62*, 4960–4967.
- 523 (18) Frederico, D.; Donate, P. M.; Constantino, M. G.; Bronze, E. S.; Sairre, M. I. A Short  
524 and Efficient Synthesis of Crocetin-dimethyl ester and Crocetinial, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*,  
525 9126–9128.

- 526 (19) Wasserman, H. H.; Larsen, D. L. Formation of 1,4-Endoperoxides from Dye-Sensitized  
527 Photooxygenation of Alkyl-Naphthalenes, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 253–254.
- 528 (20) Ozyürek, M.; Bektaşoğlu, B.; Güçlü, K.; Güngör, N.; Apak, R. Simultaneous total  
529 antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone-  
530 water solution containing 2% methyl-beta-cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant  
531 capacity (CUPRAC) method, *Anal. Chim. Acta.* **2008**, *630*, 28–39.
- 532 (21) Lee, M. T.; Chen, B. H. Separation of lycopene and its cis isomers by liquid  
533 chromatography, *Chromatographia.* **2001**, *54*, 613–617.
- 534 (22) Vecchi, M.; Englert, G.; Maurer, R.; Meduna, V. Separation and Characterization of the  
535 Cis-Isomers of Beta, Beta-Carotene, *Helv. Chim. Acta.* **1981**, *64*, 2746–2758.
- 536 (23) Kuti, J. O.; Konuru, H. B. Effects of genotype and cultivation environment on lycopene  
537 content in red-ripe tomatoes, *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 2021–2026.
- 538 (24) O'Neill, M. E.; Carroll, Y.; Corridan, B.; Olmedilla, B.; Granada, F.; Blanco, I.; van den  
539 Berg, H.; Hininger, I.; Rousell, A. M.; Chopra, M.; Southon, S.; Thurnham, D. I. A European  
540 carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative  
541 study, *Brit. J. Nutr.* **2001**, *85*, 499–507.
- 542 (25) Singh, P.; Goyal, G. K. Dietary lycopene: its properties and anticarcinogenic effects,  
543 *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2008**, *7*, 255–270.
- 544 (26) Colle, I.; Lemmens, L.; van Buggenhout, S.; van Loey, A.; Hendrickx, M. Effect of  
545 Thermal Processing on the Degradation, Isomerization, and Bioaccessibility of Lycopene in  
546 Tomato Pulp, *J. Food Sci.* **2010**, *75*, 753–759.
- 547 (27) Knockaert, G.; Pulissery, S. K.; Colle, I.; van Buggenhout, S.; Hendrickx, M.; van Loey,  
548 A. Lycopene degradation, isomerization and in vitro bioaccessibility in high pressure  
549 homogenized tomato puree containing oil: Effect of additional thermal and high pressure  
550 processing, *Food Chem.* **2012**, *135*, 1290–1297.
- 551 (28) Watanabe, K.; Kon, M.; Takahashi, B.; Hirota, S. Cis-trans isomers of  $\beta$ -carotene in fresh  
552 vegetables and fruits, *Food Sci. Technol. Res.* **1999**, *5*, 308–310.
- 553 (29) O'Neil, C. A.; Schwartz, S. J. Photoisomerization of  $\beta$ -Carotene by  
554 Photosensitization with Chlorophyll Derivatives as Sensitizers, *J. Agric. Food Chem.* **1995**,  
555 *43*, 631–635.
- 556 (30) Boileau, T. W.; Boileau, A. C.; Erdman, J. W. Bioavailability of all-trans and cis-isomers  
557 of lycopene, *Exp. Biol. Med.* **2002**, *227*, 914–919.
- 558 (31) Stahl, W.; Schwarz, W.; Sundquist, A. R.; Sies, H. Cis Trans Isomers of Lycopene and  
559 Beta-Carotene in Human Serum and Tissues, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *294*, 173–177.
- 560 (32) Sies, H.; Stahl, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as  
561 antioxidants, *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1315–1321.
- 562 (33) Kuki, M.; Koyama, Y.; Nagae, H. Triplet-sensitized and thermal isomerization of all-  
563 trans, 7-cis, 9-cis, 13-cis and 15-cis isomers of beta -carotene: configurational dependence of  
564 the quantum yield of isomerization via the T1 state, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 7171–7180.
- 565 (34) Chasse, G. A.; Mak, M. L.; Deretey, E.; Farkas, I.; Torday, L. L.; Papp, J. G.; Sarma, D.  
566 S. R.; Agarwal, A.; Chakravarthi, S.; Agarwal, S.; Rao, A. V. An ab initio computational  
567 study on selected lycopene isomers, *J. Mol. Struct., Theochem.* **2001**, *571*, 27–37.
- 568 (35) Guo, W. H.; Tu, C. Y.; Hu, C. H. Cis-Trans Isomerizations of beta -Carotene and  
569 Lycopene: A Theoretical Study, *J. Phys. Chem. B.* **2008**, *112*, 12158–12167.
- 570 (36) Knockaert, G.; Pulissery, S. K.; Lemmens, L.; van Buggenhout, S.; Hendrickx, M.; van  
571 Loey, A. Carrot  $\beta$ -Carotene Degradation and Isomerization Kinetics during Thermal  
572 Processing in the Presence of Oil, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10312–10319.

- 573 (37) Manitto, P.; Speranza, G.; Monti, D.; Gramatica, P. Singlet oxygen reactions in aqueous  
574 solution. Physical and chemical quenching rate constants of crocin and related carotenoids,  
575 *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4221–4224.
- 576 (38) Schmidt, R. Photosensitized Generation of Singlet Oxygen, *Photochem. Photobiol.* **2006**,  
577 *82*, 1161.
- 578 (39) Kanofsky, J. R. Measurement of Singlet-Oxygen In Vivo: Progress and Pitfalls,  
579 *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87*, 14–17.
- 580 (40) Böhm, F.; Edge, R.; Truscott, G. Interactions of dietary carotenoids with activated  
581 (singlet) oxygen and free radicals: potential effects for human health, *Mol. Nutr. Food Res.*  
582 **2012**, *56*, 205–216.
- 583 (41) Gao, G.; Wei, C. C.; Jeevarajan, A. S.; Kispert, L. D. Geometrical Isomerization of  
584 Carotenoids Mediated by Cation Radical/Dication Formation, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*,  
585 5362–5366.
- 586 (42) Jeevarajan, A. S.; Wei, C.-C.; Kispert, L. D. Geometrical isomerization of carotenoids in  
587 dichloromethane, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **1994**, 861–869.
- 588 (43) Boileau, A. C.; Merchen, N. R.; Wasson, K.; Atkinson, C. A.; Erdman, John W. , Jr. cis-  
589 Lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated  
590 ferrets, *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1176–1181.
- 591 (44) Sicilia, T.; Bub, A.; Rechkemmer, G.; Kraemer, K.; Hoppe, P. P.; Kulling, S. E. Novel  
592 lycopene metabolites are detectable in Plasma of preruminant calves after lycopene  
593 supplementation, *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2616–2621.
- 594 (45) Unlu, N. Z.; Bohn, T.; Francis, D. M.; Nagaraja, H. N.; Clinton, S. K.; Schwartz, S. J.  
595 Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-  
596 trans-rich tomato sauce in human subjects, *Br. J. Nutr.* **2007**, *98*, 140–146.
- 597 (46) Stahl, W.; Sies, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-  
598 processed than from unprocessed tomato juice in humans, *J. Nutr.* **1992**, *122*, 2161–2166.
- 599 (47) Zechmeister, L. Cis-trans Isomerization and Stereochemistry of Carotenoids and  
600 Diphenyl-polyenes, *Chem. Rev.* **1944**, *34*, 267–344.
- 601 (48) Harris, W. M.; Spurr, A. R. Chromoplasts of Tomato Fruits. I. Ultrastructure of Low-  
602 Pigment and High- Beta Mutants, *Am. J. Botany*, **1969**, *56*, 369.
- 603 (49) Schweiggert, R. M.; Mezger, D.; Schimpf, F.; Steingass, C. B.; Carle, R. Influence of  
604 chromoplast morphology on carotenoid bioaccessibility of carrot, mango, papaya, and tomato,  
605 *Food Chem.*, **2012**, *135*, 2736–2742.
- 606 (50) Takehara, M.; Nishimura, M.; Kuwa, T.; Inoue, Y.; Kitamura, C.; Kumagai, T.; Honda,  
607 M. Characterization and Thermal Isomerization of (all-E)-Lycopene, *J. Agric. Food Chem.*,  
608 **2014**, *62*, 264–269.
- 609 (51) Britton, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function, *FASEB J.*,  
610 **1995**, *9*, 1551–1558.
- 611 (52) Clinton, S. K.; Emenhiser, C.; Schwartz, S. J.; Bostwick, D. G.; Williams, A. W.; Moore,  
612 B. J.; Erdman, John W. , Jr. cis-trans Lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human  
613 prostate, *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* **1996**, *5*, 823–833.

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** (9Z)- $\beta$ -Carotene concentrations (expressed as percentage of total  $\beta$ -carotene) in lycopene free (light gray bars) and lycopene containing (dark gray bars) fruits and vegetables, and in human plasma samples.

**Figure 2.** Concentrations of  $\beta$ -carotene (A) and lycopene (B) isomers during treatment with singlet oxygen of various concentrations, expressed as percentage of total  $\beta$ -carotene and lycopene (%). Kinetic products were formed especially at low levels, while thermodynamically controlled products dominated at high levels. A: (15Z)- $\beta$ -carotene ( $\blacklozenge$ ), (13Z)- $\beta$ -carotene ( $\blacktriangledown$ ), (9Z,13Z)- $\beta$ -carotene ( $\diamond$ ), (all-E)- $\beta$ -carotene ( $\Delta$ ), (9Z)- $\beta$ -carotene ( $\circ$ ); B: (15Z)-lycopene ( $\blacklozenge$ ), (13Z)-lycopene ( $\bullet$ ), (9Z)-lycopene ( $\circ$ ), (7Z)-lycopene ( $\Delta$ ), (all-E)-lycopene ( $\blacktriangle$ ), (5Z)-lycopene ( $\diamond$ ).

**Figure 3.** Formation rates of (all-E)- ( $\Delta$ ), (9Z)- ( $\circ$ ), (13Z)- ( $\blacktriangledown$ ) and (15Z)- $\beta$ -carotene ( $\blacklozenge$ ) in  $\beta$ -carotene/lycopene reaction mixtures during quenching of singlet oxygen dependent on the lycopene content. Rates were calculated by linear regression during the linear formation progress of all isomers.

**Figure 4.** Degradation of lycopene in  $\beta$ -carotene/lycopene reaction mixtures during incubation with ATBS-radicals and hydrogen peroxide. Values are expressed as remaining concentration of lycopene (%) compared to the initial concentration ( $\beta$ -carotene/lycopene ratio 4/1 ( $\circ$ ) and 1/2 ( $\bullet$ )).

**Figure 5.** Isomerization progress during incubation of pure  $\beta$ -carotene (A) and in presence of lycopene (B: 20%, C: 67%) with ATBS-radicals and hydrogen peroxide. Gray stars indicate first observed significant changes in the isomeric pattern. (15Z)- $\beta$ -Carotene ( $\blacklozenge$ ), (13Z)- $\beta$ -carotene ( $\blacktriangledown$ ), (all-E)- $\beta$ -carotene ( $\Delta$ ), (9Z)- $\beta$ -carotene ( $\circ$ ).

**Figure 6.** Lycopene effectively reduces or even inhibits the singlet oxygen or free radical induced isomerization of  $\beta$ -carotene.



## TABLES

**Table 1.** Contents of  $\beta$ -Carotene and Lycopene and Their Isomeric Composition in Various Fruits, Vegetables and in Human Plasma, Expressed as Percentage of Total  $\beta$ -Carotene or Lycopene.

Sample	content $\mu\text{g/g FW}$	$\beta$ -carotene			lycopene	
		(all- <i>E</i> ) %	(9 <i>Z</i> ) %	ratio (all- <i>E</i> )/(9 <i>Z</i> )	content $\mu\text{g/g FW}$	(all- <i>E</i> ) %
Broccoli	4.8	84.1	9.7	8.8	n.d.	-
Eggplant	0.4	85.4	7.7	11.5	n.d.	-
Spinach	49.6	86.4	7.4	11.7	n.d.	-
Zucchini	1.6	84.0	8.4	10.1	n.d.	-
Pepper (red)	15.8	88.6	6.0	14.7	n.d.	-
Tomato	4.7	85.9	2.6	33.1	67.9	78.7
Grapefruit (pink)	3.4	89.8	0.7	137.1	26.2	78.7
Papaya	0.7	86.8	3.6	24.0	29.1	80.4
Persimmon	0.2	76.0	3.8	20.0	3.2	79.9
Watermelon	0.3	91.3	2.9	31.6	59.3	78.9
Human Plasma (n = 15)	1.0 nmol/mL	89.3	1.7	59.0	2.8 nmol/mL	37.3

## FIGURES

Figure 1.

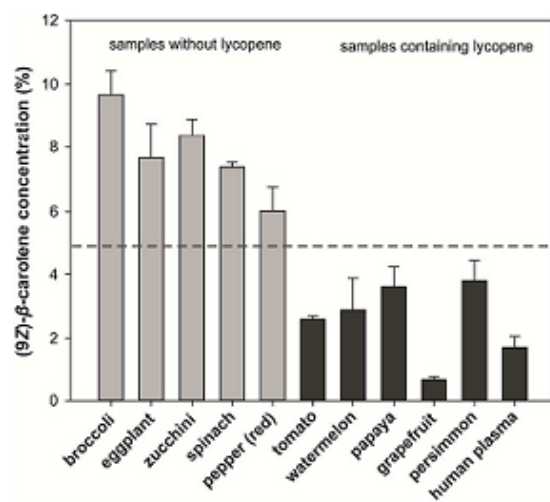


Figure 2.

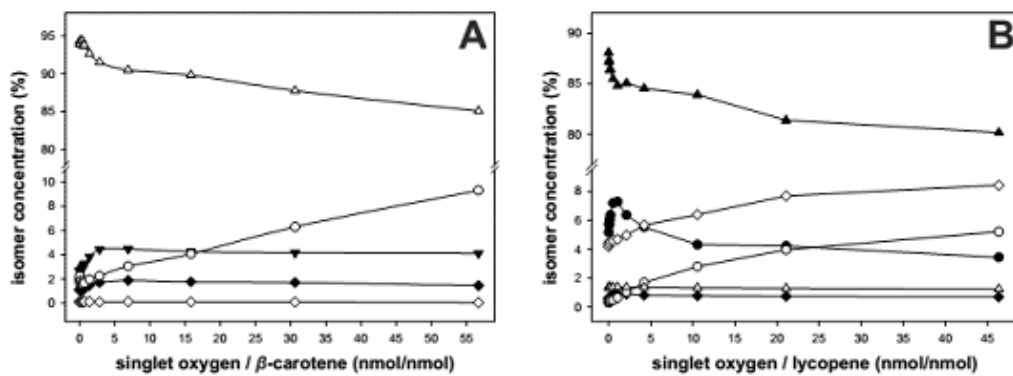


Figure 3.

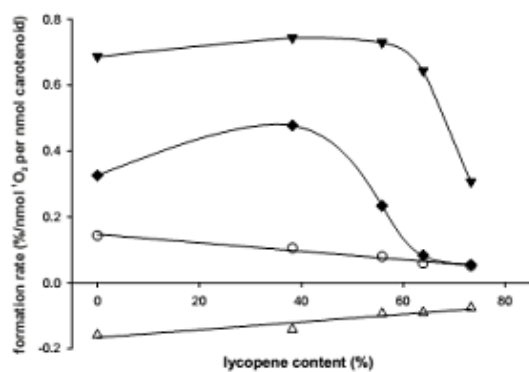


Figure 4.

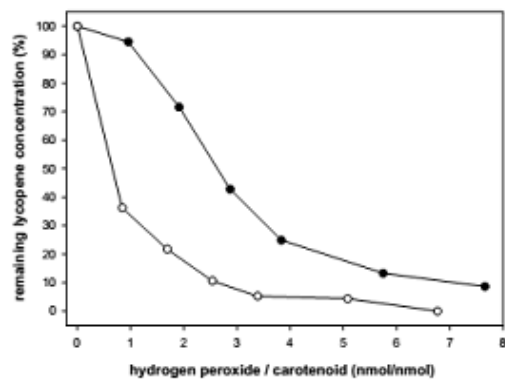


Figure 5.

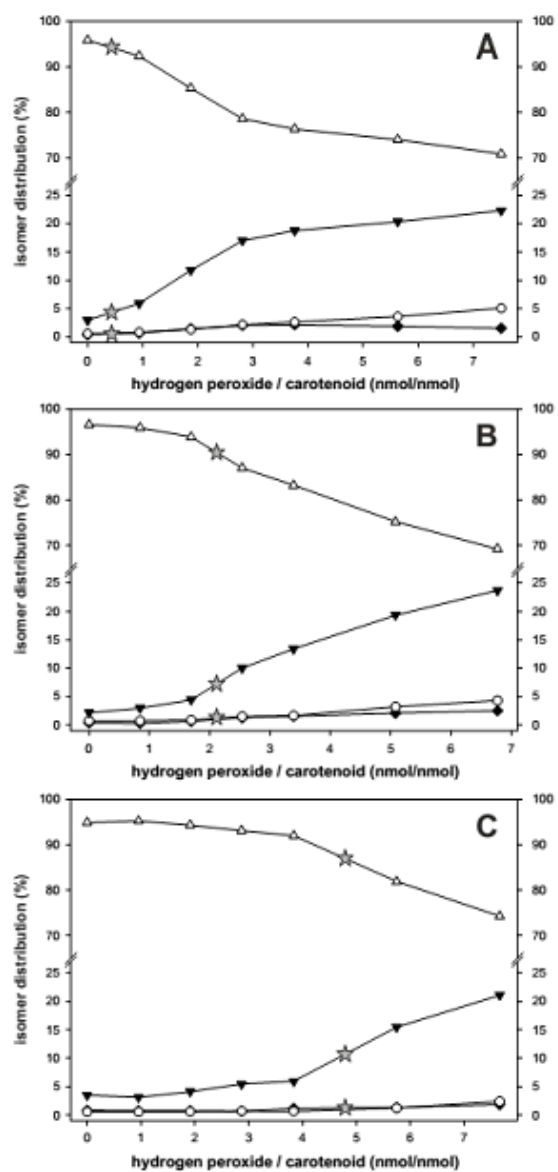
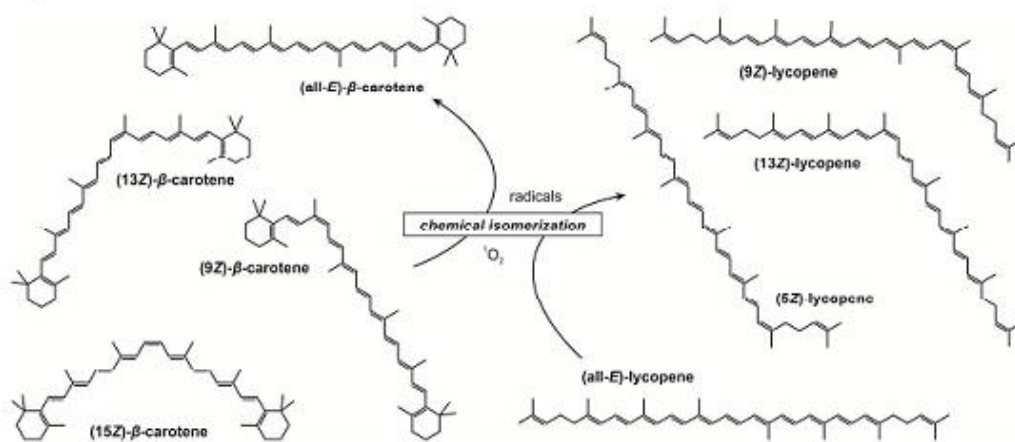
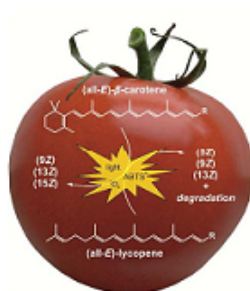


Figure 6.



## TOC GRAPHIC.





## 5. Zusammenfassung der Dissertation

Carotinoide gehören zur Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe und sind für die charakteristische Färbung vieler Lebensmittel verantwortlich.<sup>127</sup> Aufgrund ihres ausgedehnten Doppelbindungssystems neigen Carotinoide zur Isomerisierung, die durch thermische, photochemische oder chemische Prozesse induziert werden kann.<sup>128</sup> Neben den in der Natur dominierenden all-*trans*-Isomeren werden vor allem in prozessierten Lebensmitteln erhöhte Anteile an *cis*-Isomeren nachgewiesen.<sup>42,43,91</sup> Demzufolge können auch unterschiedliche Lichtregime während des Anbaus die Isomerenzusammensetzung verändern.<sup>29</sup>

Im Ergebnis konnte eine HPLC-UV-Analytik entwickelt werden, die anhand der Bestimmung des Lycopinisomerenmusters in Tomaten bzw. des  $\beta$ -Carotin-Isomerenmusters in Spinat eine sichere Differenzierung zwischen Freiland- und Gewächshausanbau ermöglicht. In verschiedenen Modellsystemen wurden dafür zunächst all-*trans*- $\beta$ -Carotin- und all-*trans*-Lycopin-Standards mit einer Halogenlampe bestrahlt, deren Wellenlängenspektrum vergleichbar mit dem des Sonnenlichtes war. Um die Lichtbedingungen während des Anbaus in Gewächshäusern nachzustellen, wurden optische Filter, die undurchlässig für Wellenlängen unterhalb von 420 nm bzw. 550 nm waren, zwischen Strahlungsquelle und Extrakt geschaltet. So konnte der Anbau unter Folien bzw. Glas oder unter Einsatz typischer Gewächshauslampen simuliert werden und führte zu signifikanten Unterschieden im Isomerisierungsmuster. Das volle Lichtspektrum induzierte die dominante Bildung von 5-*cis*-Lycopin bzw. 9-*cis*- $\beta$ -Carotin bei gleichzeitiger Abnahme von 7-*cis*-Lycopin bzw. 9,13-di-*cis*- $\beta$ -Carotin, während der Einsatz von Filtern keine derartigen Änderungen der Isomerenzusammensetzung erbrachte.

Die Ergebnisse wurden im Anschluss auf authentische Proben übertragen. Freilandtomaten zeigten mit  $5,90 \pm 0,45$  % einen signifikant höheren Anteil an 5-*cis*-Lycopin im Vergleich zu Gewächshaustomaten der gleichen Varietät mit  $4,11 \pm 0,10$  %. Gleichzeitig lag der Anteil an 7-*cis* mit  $1,67 \pm 0,11$  % signifikant unter dem bestimmten Gehalt in Gewächshaustomaten mit  $2,65 \pm 0,14$  %. Mit einem signifikant höherem Anteil an 9-*cis*- $\beta$ -Carotin von  $7,52 \pm 0,14$  % und einem gleichzeitig signifikant niedrigerem Gehalt an 9,13-di-*cis*- $\beta$ -Carotin von  $0,25 \pm 0,03$  % im Vergleich zu  $6,49 \pm 0,11$  % und  $0,76 \pm 0,05$  % in Gewächshauspinat können auch diese authentischen Proben sicher voneinander unterschieden werden.

Die Bestimmung der Carotinoid-Isomerenzusammensetzung kann somit als potenter Parameter zur Authentizitätsbestimmung im Anbau von verschiedenen Gemüsen angesehen werden.

Neben Obst und Gemüse wurden auch *in vivo* diverse *cis*-Isomere nachgewiesen. So lag der *cis*-Lycopin-Anteil in Plasma bei etwa 60 %, während *cis*-Isomere des  $\beta$ -Carotins nur in Spuren beobachtet wurden. Aktuelle Studien sind nicht in der Lage, diese Unterschiede in der Isomerenzusammensetzung zu erklären.

Deshalb wurde in weiteren Modellversuchen die chemisch induzierte Isomerisierung von Carotinoiden detailliert untersucht. Dazu wurden  $\beta$ -Carotin und Lycopin zunächst in Modellsystemen mit reaktiven Spezies, wie Singulett-Sauerstoff und freien Radikalen,

umgesetzt und das physikalische Quenching mittels HPLC-UV verfolgt. Auch hier wurden charakteristische Isomerisierungsverläufe beobachtet, z.B. wurde während der Umsetzung von  $\beta$ -Carotin mit freien Radikalen (ABTS) dominant das 13-*cis*-Isomer gebildet. Die Inkubation von Carotinoid-Gemischen resultierte in der Beschreibung einer neuartigen Schutzfunktion des Lycopins gegenüber der Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin. Die Versuche zeigten, dass die Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin in Gegenwart von Lycopin effektiv reduziert (Singulett-Sauerstoff) oder sogar vollständig verhindert (ABTS-Radikale) wurde. Dieser synergistische Effekt wurde in der aktuellen Literatur bisher nicht beschrieben und erlaubt eine Erklärung der Diskrepanz der Isomerenmuster von  $\beta$ -Carotin und Lycopin in den verschiedenen Obst- und Gemüsearten sowie *in vivo*.

Zusammenfassend gelang in der vorliegenden Arbeit eine ausführliche Beschreibung der photo-chemischen und chemischen Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin und Lycopin. Die Ergebnisse dienen als Grundlage für eine klare Unterscheidung der Anbaubedingungen verschiedener Gemüse und spiegeln so die praktische Anwendbarkeit zur Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln wider. Darüber hinaus wurde Lycopin als effektiver Schutzschild gegenüber oxidativem Stress identifiziert, wodurch die Isomerisierung von  $\beta$ -Carotin verhindert und damit die biologisch aktive Konfiguration als Provitamin A erhalten wurde. Diese neue Theorie ist in der Lage, die in biologischen Systemen und *in vivo* nachgewiesenen Unterschiede im Isomerenmuster von  $\beta$ -Carotin und Lycopin plausibel und hinreichend zu erklären.

## 6. Abstract

Carotenoids are widely distributed in nature and are known for various functions in biological systems, such as antenna pigments in higher plants or as effective antioxidants.<sup>127,129</sup> These functions are mostly associated to their elongated double-bond backbone, which makes them susceptible to isomerization reactions.<sup>128</sup> While almost solely the all-*trans*-configuration occurs in nature, elevated *cis*-isomer concentrations were especially observed in processed food.<sup>42,43,91</sup> In general, the isomerization of carotenoids is triggered by heat, light or chemical reactions.<sup>128</sup> While the thermal induced process is described extensively, only very few studies focused on the influence of light or chemicals on the isomerization of carotenoids.

The present work was able to differentiate the growing conditions of tomatoes and spinach based on an analyses of the isomeric profile of carotenoids. First, simple model systems were established to identify potential markers for photo-induced isomerization. Therefore, various compositions of light were used to determine differences in the isomeric pattern. A halogen lamp with a wavelength spectrum close to sunlight was used to simulate field-grown conditions. Optical filters, which were impermeable for defined wavelengths, were interposed between the source of light and the carotenoid standard solution and were able to mimic light conditions as cultivated under plastic or glass. These model systems illustrated strong differences in the isomeric composition if energy-rich light was present or not. UV-light triggered the formation of thermodynamically controlled products like 5-*cis*-lycopene and 9-*cis*-lycopene, while labile structures such as 7-*cis*-lycopene and 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene were degraded during irradiation. A strongly suppressed isomerization was observed in greenhouse model systems, where mainly the kinetic products (13-*cis*, 15-*cis*) were formed in smaller amounts. These results were successfully transferred to authentic grown tomatoes and spinach afterwards. Field-grown tomatoes showed increased 5-*cis*-lycopene levels ( $5.90 \pm 0.45$  %) compared to greenhouse-grown tomatoes ( $4.11 \pm 0.10$  %) of the same variety. Otherwise, 7-*cis* resulted in a significant lower level ( $1.67 \pm 0.11$  %) in comparison to the greenhouse grown set ( $2.65 \pm 0.14$  %). Comparable results were observed during analyses of spinach. 9-*cis*- $\beta$ -carotene was increased ( $7.52 \pm 0.14$  %) while 9,13-di-*cis*- $\beta$ -carotene was decreased ( $0.25 \pm 0.03$  %) compared to the authentic greenhouse-grown samples ( $6.49 \pm 0.11$  % for 9-*cis* and  $0.76 \pm 0.05$  % for 9,13-di-*cis*). Additionally, a differentiation of customer available samples was possible, too.

In summary, a potent method for the differentiation of cultivation conditions regarding the isomeric composition of vegetables and fruits was established. This applicability to biological samples underlines the practical relevance for food authenticity for the first time.

Moreover, human plasma samples were analyzed, too. The isomeric pattern was comparable to literature, with *cis*-lycopene dominating with about 60 % while almost no *cis*-isomers of  $\beta$ -carotene were observed (ca. 7 %). Up to now, there is a lack of knowledge concerning this discrepancy between these both carotenoids. Interestingly, lycopene containing fruits and vegetables showed comparable results. Almost no 9-*cis*- $\beta$ -carotene was determined in tomatoes or watermelons, while at least 6 % were observed in lycopene free samples such as broccoli, spinach or eggplant.

Two additional model systems proved that lycopene is able to inhibit the isomerization of  $\beta$ -carotene caused by free radicals (ABTS) and singlet oxygen. Singlet oxygen mainly triggered the formation of 9-*cis*- $\beta$ -carotene. In presence of lycopene the isomeric composition changed significantly. Low concentrations led to the formation of kinetically controlled products (13-*cis* and 15-*cis*) while higher concentrations inhibited the progress almost completely.

In contrast, the reaction of free radicals and  $\beta$ -carotene dominantly led to the 13-*cis*-isomer. After addition of lycopene almost no isomerization was observed. Only after complete oxidative degradation of lycopene the isomerization of  $\beta$ -carotene started as described before. The higher the lycopene content in the model system, the later a strong formation of 13-*cis*- $\beta$ -carotene was induced.

This led to a new protective role of lycopene to be considered in further studies regarding the isomeric composition in biological systems and *in vivo*. The potential shield against oxidative stress of other carotenoids is able to explain the observed discrepancy as described *in vivo* as well as in lycopene containing and free fruits and vegetables. This novel hypothesis has to be considered for future research to explain carotenoid biochemistry *in vivo*.

## 7. Literaturverzeichnis

- (1) Britton, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function, *FASEB JOURNAL*. **1995**, *9*, pp. 1551–1558.
- (2) Horton, P.; Ruban, A. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection, *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, pp. 365–373.
- (3) Edge, R.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G. The carotenoids as anti-oxidants — a review, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **1997**, *41*, pp. 189–200.
- (4) Ramel, F.; Mialoundama, A. S.; Havaux, M. Nonenzymic Carotenoid Oxidation and Photooxidative Stress Signalling in Plants, *Journal of Experimental Botany*. **2013**, *64*, pp. 799–805.
- (5) Clinton, S. K. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease, *Nutrition Reviews*. **1998**, *56*, pp. 35–51.
- (6) Fiedor, J.; Burda, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease, *Nutrients*. **2014**, *6*, pp. 466–488.
- (7) Rao, L. G.; Guns, E.; Rao, A. V. Lycopene: Its role in human health and disease, *Agro Food Industry Hi-Tech*. **2003**, *14*, pp. 25–30.
- (8) Barber, N. J.; Barber, J. Lycopene and prostate cancer, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. **2002**, *5*, pp. 6–12.
- (9) Zhang, L.-X.; Cooney, R. V.; Bertram, J. S. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action, *Carcinogenesis*. **1991**, *12*, pp. 2109–2114.
- (10) Zhang, L. X.; Cooney, R. V.; Bertram, J. S. Carotenoids up-regulate connexin43 gene-expression independent of their provitamin-A or antioxidant properties, *CANCER RESEARCH*. **1992**, *52*, pp. 5707–5712.
- (11) Bauernfeind, J. C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds, *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, pp. 456–473.
- (12) Isler, O. Vitamin A and carotenoids, *Angew.Chem.* **1956**, *68*, pp. 547–553.
- (13) Ma, L.; Dou, H. L.; Huang, Y. M.; Lu, X. R.; Xu, X. R.; Qian, F.; Zou, Z. Y.; Pang, H. L.; Dong, P. C.; Xiao, X.; Wang, X.; Sun, T. T.; Lin, X. M. Improvement of Retinal Function in Early Age-Related Macular Degeneration After Lutein and Zeaxanthin Supplementation: A Randomized, Double-Masked, Placebo-Controlled Trial, *American Journal of Ophthalmology*. **2012**, *154*, pp. 625–634.
- (14) Mein, J. R.; Lian, F.; Wang, X. D. Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention, *Nutrition Reviews*. **2008**, *66*, pp. 667–683.
- (15) Lindshield, B. L.; Canene-Adams, K.; Erdman, J. W. Lycopene metabolites: Are lycopene metabolites bioactive?, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2007**, *458*, pp. 136–140.
- (16) Reynaud, E.; Aydemir, G.; Ruhl, R.; Dangles, O.; Caris-Veyrat, C. Organic Synthesis of New Putative Lycopene Metabolites and Preliminary Investigation of Their Cell-Signaling Effects, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, *59*, pp. 1457–1463.

- (17) Namitha, K. K.; Negi, P. S. Chemistry and Biotechnology of Carotenoids, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2010**, *50*, pp. 728–760.
- (18) Shi, J.; Le Maguer, M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2000**, *20*, pp. 293–334.
- (19) Khachik, F.; Spangler, C. J.; Smith, J. Cecil, Jr.; Canfield, L. M. Identification, Quantification, and Relative Concentrations of Carotenoids and Their Metabolites in Human Milk and Serum, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, pp. 1873–1881.
- (20) Maiani, G.; Periago Caston, M. J.; Catasta, G.; Toti, E.; Goni Cambrodon, I.; Bysted, A.; Granado-Lorencio, F.; Olmedilla-Alonso, B.; Knuthsen, P.; Valoti, M.; Boehm, V.; Mayer-Miebach, E.; Behnlian, D.; Schlemmer, U. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans, *Molecular Nutrition & Food Research*. **2009**, *53*, pp. S194.
- (21) O'Neill, M. E.; Carroll, Y.; Corridan, B.; Olmedilla, B.; Granado, F.; Blanco, I.; van den Berg, H.; Hininger, I.; Rousell, A. M.; Chopra, M.; Southon, S.; Thurnham, D. I. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study, *British Journal of Nutrition*. **2001**, *85*, pp. 499–507.
- (22) Becker, H. G. O. *Einführung in die Photochemie*, 3rd ed.; Deutscher Verlag der Wissenschaften: Berlin, 1991.
- (23) Chasse, G. A.; Mak, M. L.; Deretey, E.; Farkas, I.; Torday, L. L.; Papp, J. G.; Sarma, D. S. R.; Agarwal, A.; Chakravarthi, S.; Agarwal, S.; Rao, A. V. An ab initio computational study on selected lycopene isomers, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*. **2001**, *571*, pp. 27–37.
- (24) Guo, W. H.; Tu, C. Y.; Hu, C. H. Cis-Trans Isomerizations of beta -Carotene and Lycopene: A Theoretical Study, *J. Phys. Chem. B*. **2008**, *112*, pp. 12158–12167.
- (25) Sweeney, J. P.; Marsh, A. C. Liver storage of vitamin A in rats fed carotene stereoisomers, *J. Nutr.* **1973**, *103*, pp. 20–5.
- (26) TSUKIDA, K.; SAIKI, K.; SUGIURA, M. Structural elucidation of the main cis-.BETA.-carotenes, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology, J Nutr Sci Vitaminol*. **1981**, *27*, pp. 551–561.
- (27) Lunde, K.; Zechmeister, L. Infrared Spectra and cis-trans Configurations of Some Carotenoid Pigments, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, pp. 1647–1653.
- (28) Zechmeister, L. Cis-trans Isomerization and Stereochemistry of Carotenoids and Diphenyl-polyenes, *Chem. Rev.* **1944**, *34*, pp. 267–344.
- (29) Kuki, M.; Koyama, Y.; Nagae, H. Triplet-sensitized and thermal isomerization of all-trans, 7-cis, 9-cis, 13-cis and 15-cis isomers of beta -carotene: configurational dependence of the quantum yield of isomerization via the T1 state, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, pp. 7171–7180.
- (30) Pesek, C. A.; Warthesen, J. J. Kinetic model for photoisomerization and concomitant photodegradation of .beta.-carotenes, *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, pp. 1313–1315.
- (31) Watanabe, K.; Kon, M.; Takahashi, B.; Hirota, S. Cis-trans isomers of  $\beta$ -carotene in fresh vegetables and fruits, *Food Sci. Technol. Res.* **1999**, *5*, pp. 308–310.
- (32) Doering, W. von; Sotiriou-Leventis, C.; Roth, W. R. Thermal interconversions among 15-cis-, 13-cis-, and all-trans-.beta.-carotene: kinetics, Arrhenius parameters,

thermochemistry, and potential relevance to anticarcinogenicity of all-trans- $\beta$ -carotene, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, pp. 2747–2757.

(33) Aman, R.; Schieber, A.; Carle, R. Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of  $\beta$ -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*, pp. 9512–9518.

(34) Zeb, A. Oxidation and formation of oxidation products of  $\beta$ -carotene at boiling temperature, *Chem. Phys. Lipids*. **2012**, *165*, pp. 277–281.

(35) Lee, M. T.; Chen, B. H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system, *Food Chem.* **2002**, *78*, pp. 425–432.

(36) Shi, J.; Dai, Y.; Kakuda, Y.; Mittal, G.; Xue, S. J. Effect of heating and exposure to light on the stability of lycopene in tomato puree, *Food Control*. **2007**, *19*, pp. 514–520.

(37) Lambelet, P.; Richelle, M.; Bortlik, K.; Franceschi, F.; Giori, A. M. Improving the stability of lycopene Z-isomers in isomerised tomato extracts, *Food Chemistry*. **2009**, *112*, pp. 156–161.

(38) Colle, I.; Lemmens, L.; van Buggenhout, S.; van Loey, A.; Hendrickx, M. Effect of Thermal Processing on the Degradation, Isomerization, and Bioaccessibility of Lycopene in Tomato Pulp, *Journal of Food Science*. **2010**, *75*, pp. C753.

(39) Takehara, M.; Nishimura, M.; Kuwa, T.; Inoue, Y.; Kitamura, C.; Kumagai, T.; Honda, M. Characterization and Thermal Isomerization of (all-E)-Lycopene, *J. Agric. Food Chem.* **2013**.

(40) Lessin, W. J.; Schwartz, S. J. Quantification of cis-trans Isomers of Provitamin A Carotenoids in Fresh and Processed Fruits and Vegetables, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, pp. 3728–3732.

(41) Chandler, L. A.; Schwartz, S. J. HPLC Separation of Cis-Trans Carotene Isomers in Fresh and Processed Fruits and Vegetables, *J. Food Science*. **1987**, *52*, pp. 669–672.

(42) Marx, M.; Stuparic, M.; Schieber, A.; Carle, R. Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of  $\beta$ -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations, *Food Chemistry*. **2003**, *83*, pp. 609–617.

(43) Knockaert, G.; Pulissery, S. K.; Colle, I.; van Buggenhout, S.; Hendrickx, M.; van Loey, A. Lycopene degradation, isomerization and in vitro bioaccessibility in high pressure homogenized tomato puree containing oil: Effect of additional thermal and high pressure processing, *Food Chemistry*. **2012**, *135*, pp. 1290–1297.

(44) Schierle, J.; Bretzel, W.; Buhler, I.; Faccin, N.; Hess, D.; Steiner, K.; Schuep, W. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma, *Food Chemistry*. **1997**, *59*, pp. 459–465.

(45) Pott, I.; Marx, M.; Neidhart, S.; Mühlbauer, W.; Carle, R. Quantitative determination of  $\beta$ -carotene stereoisomers in fresh, dried, and solar-dried mangoes (*Mangifera indica* L.), *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, pp. 4527–4531.

(46) O'Neil, C. A.; Schwartz, S. J. Photoisomerization of  $\beta$ -Carotene by Photosensitization with Chlorophyll Derivatives as Sensitizers, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, pp. 631–635.

- (47) Jensen, N. H.; Nielsen, A. B.; Wilbrandt, R. Chlorophyll a-sensitized trans-cis photoisomerization of all-trans- $\beta$ -carotene, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, pp. 6117–6119.
- (48) Chen, J.; Shi, J.; Xue, S. J.; Ma, Y. Comparison of lycopene stability in water- and oil-based food model systems under thermal- and light-irradiation treatments, *LWT - Food Science and Technology*. **2009**, *42*, pp. 740–747.
- (49) Calvo, M. M.; Santa-Maria, G. Effect of illumination and chlorophylls on stability of tomato carotenoids, *Food Chemistry*. **2008**, *107*, pp. 1365–1370.
- (50) Kuti, J. O.; Konuru, H. B. Effects of genotype and cultivation environment on lycopene content in red-ripe tomatoes, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2005**, *85*, pp. 2021–2026.
- (51) Conn, P. F.; Schalch, W.; Truscott, T. The singlet oxygen and carotenoid interaction, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **1991**, *11*, pp. 41–47.
- (52) Tinkler, J. H.; Böhm, F.; Schalch, W.; Truscott, T. Dietary carotenoids protect human cells from damage, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **1994**, *26*, pp. 283–285.
- (53) Burton, G.; Ingold, K.  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant, *Science*. **1984**, *224*, pp. 569–573.
- (54) Jörgensen, K.; Skibsted, L. H. Carotenoid scavenging of radicals, *Z Lebensm Unters Forch*. **1993**, *196*, pp. 423–429.
- (55) Böhm, F.; Tinkler, J. H.; Truscott, T. G. Carotenoids protect against cell membrane damage by the nitrogen dioxide radical, *Nat Med*. **1995**, *1*, pp. 98–99.
- (56) Ramel, F.; Birtic, S.; Cuine, S.; Triantaphylides, C.; Ravanat, J.-L.; Havaux, M. Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants, *PLANT PHYSIOLOGY*. **2012**, *158*, pp. 1267–1278.
- (57) Böhm, F.; Edge, R.; Truscott, G. Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: potential effects for human health, *Mol Nutr Food Res*. **2012**, *56*, pp. 205–216.
- (58) Foote, C. S.; Chang, Y. C.; Denny, R. W. Chemistry of singlet oxygen. XI. Cis-trans isomerization of carotenoids by single oxygen and a probable quenching mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, pp. 5218–5219.
- (59) Sies, H.; Stahl, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants, *Am J Clin Nutr*. **1995**, *62*, pp. 1315S-1321S.
- (60) Manitto, P.; Speranza, G.; Monti, D.; Gramatica, P. Singlet oxygen reactions in aqueous solution. Physical and chemical quenching rate constants of crocin and related carotenoids, *Tetrahedron Letters*. **1987**, *28*, pp. 4221–4224.
- (61) Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **1989**, *274*, pp. 532–538.
- (62) Ouchi, A.; Aizawa, K.; Iwasaki, Y.; Inakuma, T.; Terao, J.; Nagaoka, S.-i.; Mukai, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by carotenoids and food extracts in solution. Development of a singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method, *J. Agric. Food Chem*. **2010**, *58*, pp. 9967–9978.



- (63) Bando, N.; Hayashi, H.; Wakamatsu, S.; Inakuma, T.; Miyoshi, M.; Nagao, A.; Yamauchi, R.; Terao, J. Participation of singlet oxygen in ultraviolet-a-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary  $\beta$ -carotene: an ex vivo study, *Free Radical Biology and Medicine*. **2004**, *37*, pp. 1854–1863.
- (64) Bernstein, P. S.; Khachik, F.; Carvalho, L. S.; Muir, G. J.; Zhao, D. Y.; Katz, N. B. Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye, *Exp. Eye Res.* **2001**, *72*, pp. 215–223.
- (65) Bhosale, P.; Bernstein, P. S. Quantitative measurement of 3'-oxolutein from human retina by normal-phase high-performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Anal. Biochem.* **2005**, *345*, pp. 296–301.
- (66) Bouvier, F.; Isner, J.-C.; Dogbo, O.; Camara, B. Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants, *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, pp. 187–194.
- (67) Walter, M. H.; Strack, D. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions, *Nat Prod Rep.* **2011**, *28*, pp. 663–692.
- (68) Stratton, S. P.; Schaefer, W. H.; Liebler, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of .beta.-carotene, *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, pp. 542–547.
- (69) Ramel, F.; Birtic, S.; Ginies, C.; Soubigou-Taconnat, L.; Triantaphylidès, C.; Havaux, M. Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, pp. 5535–5540.
- (70) Yamauchi, R.; TSUCHIHASHI, K.; KATO, K. Oxidation Products of  $\beta$ -Carotene during the Peroxidation of Methyl Linoleate in the Bulk Phase, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **2014**, *62*, pp. 1301–1306.
- (71) Sy, C.; Dangles, O.; Borel, P.; Caris-Veyrat, C. Iron-induced oxidation of (all-E)- $\beta$ -carotene under model gastric conditions: kinetics, products, and mechanism, *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *63*, pp. 195–206.
- (72) Montenegro, M. A.; Nazareno, M. A.; Durantini, E. N.; Borsarelli, C. D. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, pp. 353–361.
- (73) Rodriguez, E. B.; Rodriguez-Amaya, D. B. Lycopene epoxides and apo-lycopenals formed by chemical reactions and autoxidation in model systems and processed foods, *J. Food Sci.* **2009**, *74*, pp. C674.
- (74) Caris-Veyrat, C.; Schmid, A.; Carail, M.; Boehm, V. Cleavage Products of Lycopene Produced by in Vitro Oxidations: Characterization and Mechanisms of Formation, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, pp. 7318–7325.
- (75) Khachik, F.; Pfander, H.; Traber, B. Proposed Mechanisms for the Formation of Synthetic and Naturally Occurring Metabolites of Lycopene in Tomato Products and Human Serum, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, pp. 4885–4890.
- (76) Tonucci, L. H.; Holden, J. M.; Beecher, G. R.; Khachik, F.; Davis, C. S.; Mulokozi, G. Carotenoid Content of Thermally Processed Tomato-Based Food Products, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, pp. 579–586.
- (77) Khachik, F.; Goli, M. B.; Beecher, G. R.; Holden, J.; Lusby, W. R.; Tenorio, M. D.; Barrera, M. R. Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major

carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables, *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, pp. 390–398.

(78) Khachik, F.; Steck, A.; Niggli, U. A.; Pfander, H. Partial Synthesis and Structural Elucidation of the Oxidative Metabolites of Lycopene Identified in Tomato Paste, Tomato Juice, and Human Serum, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, pp. 4874–4884.

(79) Rodrigues, E.; Mariutti, L. R. B.; Mercadante, A. Z. Scavenging capacity of marine carotenoids against reactive oxygen and nitrogen species in a membrane-mimicking system, *Mar. Drugs.* **2012**, *10*, pp. 1784–1798.

(80) Gao, Y.; Kispert, L. D. Reaction of Carotenoids and Ferric Chloride: Equilibria, Isomerization, and Products, *J. Phys. Chem. B.* **2003**, *107*, pp. 5333–5338.

(81) Gao, Y.; Webb, S.; Kispert, L. D. Deprotonation of Carotenoid Radical Cation and Formation of a Didehydrodimer, *J. Phys. Chem. B.* **2003**, *107*, pp. 13237–13240.

(82) Pennathur, S.; Maitra, D.; Byun, J.; Sliskovic, I.; Abdulhamid, I.; Saed, G. M.; Diamond, M. P.; Abu-Soud, H. M. Potent antioxidative activity of lycopene: A potential role in scavenging hypochlorous acid, *Free Radical Biology and Medicine.* **2010**, *49*, pp. 205–213.

(83) El-Agamey, A.; Lowe, G. M.; McGarvey, D. J.; Mortensen, A.; Phillip, D. M.; Truscott, T. G.; Young, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *430*, pp. 37–48.

(84) KENNEDY, T. A.; LIEBLER, D. C. Peroxyl radical scavenging by beta-carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure, *The Journal of biological chemistry.* **1992**, *267*, pp. 4658–4663.

(85) Jeevarajan, A. S.; Wei, C.-C.; Kispert, L. D. Geometrical isomerization of carotenoids in dichloromethane, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **1994**, p. 861.

(86) Gao, G.; Wei, C. C.; Jeevarajan, A. S.; Kispert, L. D. Geometrical Isomerization of Carotenoids Mediated by Cation Radical/Dication Formation, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, pp. 5362–5366.

(87) Wei, C.-C.; Gao, G.; Kispert, L. D. Selected cis/trans isomers of carotenoids formed by bulk electrolysis and iron(III) chloride oxidation, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **1997**, pp. 783–786.

(88) Lowe, G. M.; Vlismas, K.; Graham, D. L.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Young, A. J. The degradation of (all-E)-beta-carotene by cigarette smoke, *Free Radic. Res.* **2009**, *43*, pp. 280–286.

(89) Graham, D. L.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Lowe, G. M. Cigarette smoke and human plasma lycopene depletion, *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, pp. 2413–2420.

(90) Graham, D. L.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Lowe, G. M. (13Z)- and (9Z)-lycopene isomers are major intermediates in the oxidative degradation of lycopene by cigarette smoke and Sin-1, *Free Radic. Res.* **2012**, *46*, pp. 891–902.

(91) Honest, K. N.; Zhang, H. W.; Zhang, L. F. Lycopene: Isomerization Effects on Bioavailability and Bioactivity Properties, *Food Reviews International.* **2011**, *27*, pp. 248–258.

- (92) Holloway, D. E.; Yang, M.; Paganga, G.; Rice-Evans, C. A.; Bramley, P. M. Isomerization of dietary lycopene during assimilation and transport in plasma, *Free Radical Res.* **2000**, *32*, pp. 93–102.
- (93) Stahl, W.; Schwarz, W.; Sundquist, A. R.; Sies, H. Cis Trans Isomers of Lycopene and Beta-Carotene in Human Serum and Tissues, *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **1992**, *294*, pp. 173–177.
- (94) RAJENDRAN, V.; PU, Y.; CHEN, B. An improved HPLC method for determination of carotenoids in human serum, *Journal of Chromatography B.* **2005**, *824*, pp. 99–106.
- (95) Stahl, W.; Sundquist, A. R.; Hanusch, M.; Schwarz, W.; Sies, H. Separation of  $\beta$ -carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples, *Clin. Chem. (Washington, D. C.).* **1993**, *39*, pp. 810–14.
- (96) Re, R.; Fraser, P. D.; Long, M.; Bramley, P. M.; Rice-Evans, C. Isomerization of Lycopene in the Gastric Milieu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281*, pp. 576–581.
- (97) Moraru, C.; Lee, T. Kinetic studies of lycopene isomerization in a tributyrin model system at gastric pH, *J Agric Food Chem.* **2005**, *53*, pp. 8997–9004.
- (98) Harris, W. M.; Spurr, A. R. Chromoplasts of Tomato Fruits. I. Ultrastructure of Low-Pigment and High- Beta Mutants. Carotene Analyses, *American Journal of Botany.* **1969**, *56*, p. 369.
- (99) Parker, R. S. Carotenoids .4. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids, *FASEB JOURNAL.* **1996**, *10*, pp. 542–551.
- (100) Donhowe, E. G.; Kong, F. Beta-carotene: Digestion, Microencapsulation, and In Vitro Bioavailability, *Food Bioprocess Technol.* **2014**, *7*, pp. 338–354.
- (101) Schweiggert, R. M.; Mezger, D.; Schimpf, F.; Steingass, C. B.; Heller, A.; Riedl, K.; Kopec, R.; Quesada, S.; Esquivel, P.; Carle, R.; Schwartz, S. J. Bioavailability and bioaccessibility of carotenoids from papaya, tomato, and carrot are modulated by chromoplast morphology, *FASEB JOURNAL.* **2012**, *26*.
- (102) Boileau, T. W.; Boileau, A. C.; Erdman, J. W. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene, *Experimental Biology and Medicine.* **2002**, *227*, pp. 914–919.
- (103) Boileau, A. C.; Merchen, N. R.; Wasson, K.; Atkinson, C. A.; Erdman, John W. , Jr. cis-Lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets, *J. Nutr.* **1999**, *129*, pp. 1176–1181.
- (104) Jensen, C. D.; Howes, T.; Spiller, G. A.; Pattison, T. S.; Whittam, J. H.; Scala, J. Observations on the effects of ingesting cis- and trans-beta-carotene isomers on human serum concentrations, *Nutr. Rep. Int.* **1987**, *35*, pp. 413–22.
- (105) Yeum, K. J.; Booth, S. L.; Sadowski, J. A.; Liu, C.; Tang, G. W.; Krinsky, N. I.; Russell, R. M. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables, *American Journal of Clinical Nutrition.* **1996**, *64*, pp. 594–602.
- (106) Biehler, E.; Kaulmann, A.; Hoffmann, L.; Krause, E.; Bohn, T. Dietary and host-related factors influencing carotenoid bioaccessibility from spinach (*Spinacia oleracea*), *Food Chemistry.* **2011**, *125*, pp. 1328–1334.

- (107) Ferruzzi, M. G.; Lumpkin, J. L.; Schwartz, S. J.; Failla, M. Digestive Stability, micellarization, and uptake of beta-carotene isomers by Caco-2 human intestinal cells, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, pp. 2780–2785.
- (108) Courraud, J.; Berger, J.; Cristo, J. P.; Avallone, S. Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion, *Food Chemistry.* **2013**, *136*, pp. 871–877.
- (109) Stahl, W.; Sies, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans, *J. Nutr.* **1992**, *122*, pp. 2161–6.
- (110) You, C. S.; Parker, R. S.; Goodman, K. J.; Swanson, J. E.; Corso, T. N. Evidence of cis-trans isomerization of 9-cis-beta-carotene during absorption in humans, *American Journal of Clinical Nutrition.* **1996**, *64*, pp. 177–183.
- (111) Sicilia, T.; Bub, A.; Rechkemmer, G.; Kraemer, K.; Hoppe, P. P.; Kulling, S. E. Novel lycopene metabolites are detectable in Plasma of preruminant calves after lycopene supplementation, *J.Nutr.* **2005**, *135*, pp. 2616–2621.
- (112) Edwards, A. J.; Vinyard, B. T.; Wiley, E. R.; Brown, E. D.; Collins, J. K.; Perkins-Veazie, P.; Baker, R. A.; Clevidence, B. A. Consumption of watermelon juice increases plasma concentrations of lycopene and  $\beta$ -carotene in humans, *J. Nutr.* **2003**, *133*, pp. 1043–1050.
- (113) Unlu, N. Z.; Bohn, T.; Francis, D. M.; Nagaraja, H. N.; Clinton, S. K.; Schwartz, S. J. Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects, *Br. J. Nutr.* **2007**, *98*, pp. 140–146.
- (114) Clinton, S. K.; Emenhiser, C.; Schwartz, S. J.; Bostwick, D. G.; Williams, A. W.; Moore, B. J.; Erdman, John W. ,Jr. cis-trans Lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate, *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* **1996**, *5*, pp. 823–833.
- (115) Jansen, H.; Bachthaler, E.; Förster, E.; Scharpf, C. *Gärtnerischer Pflanzenbau*; Verlag Eugen Ulmer, 1998.
- (116) van den Bulck, N.; Coomans, M.; Wittemans, L.; Hanssens, J.; Steppe, K. Monitoring and energetic performance analysis of an innovative ventilation concept in a Belgian greenhouse, *Energy and Buildings.* **2013**, *57*, pp. 51–57.
- (117) Bahceci, K. S.; Serpen, A.; Gokmen, V.; Acar, J. Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage, *Journal of Food Engineering.* **2005**, *66*, pp. 187–192.
- (118) Edge, R.; Land, E. J.; McGarvey, D.; Mulroy, L.; Truscott, T. G. Relative One-Electron Reduction Potentials of Carotenoid Radical Cations and the Interactions of Carotenoids with the Vitamin E Radical Cation, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, pp. 4087–4090.
- (119) Palozza, P.; Krinsky, N. I.  $\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -tocopherol are synergistic antioxidants, *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **1992**, *297*, pp. 184–187.
- (120) Böhm, F.; Edge, R.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G.  $\beta$ -Carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NO<sub>x</sub>, *FEBS Letters.* **1998**, *436*, pp. 387–389.
- (121) Niki, E.; Noguchi, N.; Tsuchihashi, H.; Gotoh, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and  $\beta$ -carotene, *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, pp. 1322S.

- (122) Stahl, W.; Sies, H. Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1993**, *691*, pp. 10–19.
- (123) Deming, D. M.; Teixeira, S. R.; Erdman, John W Jr All-trans beta-carotene appears to be more bioavailable than 9-cis or 13-cis beta-carotene in gerbils given single oral doses of each isomer, *J Nutr.* **2002**, *132*, pp. 2700–2708.
- (124) Ozyürek, M.; Bektaşoğlu, B.; Güçlü, K.; Güngör, N.; Apak, R. Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone-water solution containing 2% methyl-beta-cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, *Anal. Chim. Acta.* **2008**, *630*, pp. 28–39.
- (125) Gurak, P. D.; Mercadante, A. Z.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J.; Meléndez-Martínez, A. J. Changes in antioxidant capacity and colour associated with the formation of  $\beta$ -carotene epoxides and oxidative cleavage derivatives, *Food Chem.* **2014**, *147*, pp. 160–169.
- (126) Mortensen, A.; Skibsted, L. H. Importance of Carotenoid Structure in Radical-Scavenging Reactions, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, pp. 2970–2977.
- (127) Stahl, W.; Sies, H. Antioxidant activity of carotenoids, *Molecular Aspects of Medicine.* **2003**, *24*, pp. 345–351.
- (128) Singh, P.; Goyal, G. K. Dietary lycopene: its properties and anticarcinogenic effects, *Compr.Rev.Food Sci.Food Saf.* **2008**, *7*, pp. 255–270.
- (129) Mendes-Pinto, M. M.; Sansiaume, E.; Hashimoto, H.; Pascal, A. A.; Gall, A.; Robert, B. Electronic absorption and ground state structure of carotenoid molecules, *J Phys Chem B.* **2013**, *117*, pp. 11015–11021.

**8. Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Biosynthese von Carotinoiden in höheren Pflanzen .....	4
Abb. 2: Strukturen der ernährungsphysiologisch bedeutsamsten Carotinoide .....	5
Abb. 3: Rotationsmechanismus zur Ausbildung von <i>cis</i> -Isomeren .....	6
Abb. 4: Potentielle-Energie-Diagramme von $\beta$ -Carotin (links) und Lycopin (rechts) im Grundzustand $S_0$ (alle angegebenen Energien (kcal/mol) sind auf das all- <i>trans</i> -Isomer referenziert) nach Guo et al. <sup>24</sup> .....	7
Abb. 5: Schematische Darstellung zur Quenching-Reaktion von $\beta$ -Carotin mit reaktiven Spezies.....	15
Abb. 6: flüchtige Reaktionsprodukte aus der Oxidation von $\beta$ -Carotin.....	16
Abb. 7: In biologischen Systemen nachweisbare Reaktionsprodukte aus der Oxidation von Lycopin <sup>78</sup> .....	17
Abb. 8: Mögliche Reaktionsmechanismen bei der Reaktion von (oxidierenden) freien Radikalen ( $R^\bullet$ ) und Carotinoiden (CAR) <sup>57</sup> .....	17
Abb. 9: Mögliche Abbauprodukte aus der Reaktion von Lycopin mit HOCl nach Pennathur et al. <sup>82</sup> .....	18
Abb. 10: Vorgeschlagene Mechanismen für die Reaktion von $\beta$ -Carotin mit Peroxyl-Radikalen nach Kennedy et al. <sup>84</sup> .....	19
Abb. 11: Schema zur Isomerisierung von Carotinoiden während der elektrochemischen Oxidation <sup>86</sup> .....	19
Abb. 12: Übersicht zu den dominant gebildeten <i>cis</i> -Isomeren während der thermischen und photochemischen Isomerisierung von all- <i>trans</i> -Lycopin und all- <i>trans</i> - $\beta$ -Carotin .....	27
Abb. 13: Bildungsraten von Carotinoid-Isomeren nach 4-stündiger Behandlung .....	28
Abb. 14: Singulett-Sauerstoff induzierte Isomerisierung von $\beta$ -Carotin und Lycopin .....	32
Abb. 15: Bildungsraten von Carotinoid-Isomeren während der $^1O_2$ induzierten Isomerisierung .....	33
Abb. 16: Schematischer Reaktionsverlauf von $\beta$ -Carotin mit ABTS-Radikalen.....	36
Abb. 17: Änderungen den Bildungsraten von $\beta$ -Carotin-Isomeren mit steigenden Anteilen an Lycopin.....	37

## 9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht zur Isomerenzusammensetzung in frischen und thermisch behandelten Lebensmitteln .....	10
Tab. 2: Lycopin-Gehalte und Isomerenzusammensetzung von Tomaten nach Kuti et al. <sup>50</sup> ....	13
Tab. 3: Carotinoid-Isomerenzusammensetzung authentischer Gemüseproben .....	29
Tab. 4: $\beta$ -Carotin-Isomerenzusammensetzung verschiedener Obst- und Gemüseproben .....	31
Tab. 5: Bildungsraten von $\beta$ -Carotin-Isomeren in Abhängigkeit von verschiedenen Lycopin-Anteilen .....	34
Tab. 6: Carotinoid-Konzentrationen und Isomerenzusammensetzung in humanem Plasma (15 Probanden) .....	38

## 10. Anhang

### 10.1 Supporting Information zu *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 11133–11139

1           Photo-induced Isomerization of Lycopene and Application to Tomato Cultivation

2                           Thomas Heymann, Julia Raeke and Marcus A. Glomb\*

3

4   Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-

5   Mothes-Str. 2, 06120 Halle/Saale, Germany

6

7

8   \* To whom correspondence should be addressed (e-mail [marcus.glomb@chemie.uni-halle.de](mailto:marcus.glomb@chemie.uni-halle.de),

9   Fax ++049-345-5527341)



## SUPPORTING INFORMATION

**NMR-data of synthesized and isolated standard compounds.**

**All-trans-lycopene**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-d):  $\delta$  [ppm] = 1.62 (s, 3H-C17), 1.69 (s, 3H-C16), 1.82 (s, 3H-C18), 1.91 (s, 3H-C20), 1.91 (s, 3H-C19), 2.10 – 2.15 (m, 2H-C3 and 2H-C4), 5.11 (m, 1H-C2), 5.95 (d,  $^3J = 11.0$  Hz, 1H-C6), 6.19 (d,  $^3J = 11.6$  Hz, 1H-C10), 6.26 (m, 1H-C8 and 1H-C14), 6.35 (d,  $^3J = 14.9$  Hz, 1H-C12), 6.49 (dd,  $^3J = 15.0$  Hz and  $^3J = 11.0$  Hz, 1H-C7), 6.58 – 6.68 (m, 1H-C11 and 1H-C15);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  [ppm] = 139.6 (C5), 137.5 (C12), 136.7 (C13), 136.3 (C9), 135.6 (C8), 132.8 (C14), 131.9 (C1), 131.7 (C10), 130.2 (C15), 125.9 (C6), 125.3 (C11), 125.0 (C7), 124.1 (C2), 40.4 (C4), 26.9 (C3), 25.9 (C16), 17.9 (C17), 17.1 (C18), 13.1 (C19), 13.0 (C20).

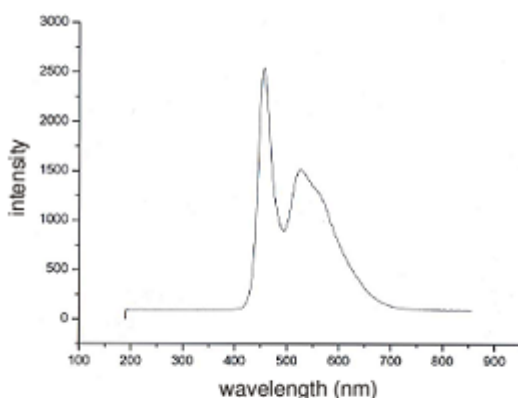
**5-cis-lycopene**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-d):  $\delta$  [ppm] = 1.58 (s, 3H-C17), 1.64 (s, 3H-C16), 1.78 (s, 3H-C18), 1.91 (s, 3H-C19), 1.92 (s, 3H-C20), 2.05 – 2.12 (m, 2H-C3 and 1H-C4'), 2.20 (m, 1H-C4), 5.09 (m, 1H-C2), 5.90 (d,  $^3J = 11.0$  Hz, 1H-C6), 6.13 (d,  $^3J = 12.0$  Hz, 1H-C10), 6.18 (d,  $^3J = 15.0$  Hz, 1H-C8), 6.21 (d,  $^3J = 15.0$  Hz, 1H-C14), 6.31 (d,  $^3J = 15.0$  Hz, 1H-C12), 6.44 (dd,  $^3J = 15.0$  Hz and  $^3J = 11.0$  Hz, 1H-C7), 6.55 – 6.61 (m, 1H-C15 and 1H-C11);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  [ppm] = 139.7 (C5'), 139.5 (C5), 137.5 (C12'), 137.4 (C12), 136.6 (C13), 136.2 (C9), 135.6 (C8'), 135.3 (C8), 132.8 (C14), 132.0 (C1), 131.7 (C10'), 131.6 (C10'), 130.2 (C15), 126.7 (C6), 125.9 (C6'), 125.2 (C11), 124.9 (C7'), 124.8 (C7), 124.1 (C2), 40.4 (C4'), 32.9 (C4), 27.0 (C3), 26.8 (C3'), 25.8 (C16), 24.2 (C18), 17.8 (C17'), 17.7 (C17), 17.0 (C18'), 13.0 (C19), 12.9 (C20).

**15-cis-lycopene**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-d):  $\delta$  [ppm] = 1.61 (s, 3H-C17), 1.68 (s, 3H-C16), 1.81 (s, 3H-C18), 1.96 (s, 3H-C20), 1.97 (s, 3H-C19), 2.06 – 2.17 (m, 2H-C3 and 2H-C4), 5.09 (m, 1H-C2), 5.95 (d,  $^3J = 10.5$  Hz, 1H-C6), 6.15 (d,  $^3J = 11.2$  Hz, 1H-C10), 6.23 (d,  $^3J = 15.1$  Hz, 1H-C8), 6.34 (d,  $^3J = 15.0$  Hz, 1H-C15), 6.41 (d,  $^3J = 15.0$  Hz, 1H-C12), 6.52 (dd,  $^3J = 15.0$  Hz and  $^3J = 11.1$  Hz, 1H-C7), 6.60 – 6.73 (m, 1H-C11 and 1H-C14);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  [ppm] = 139.6 (C5), 137.7 (C12), 137.4 (C13), 136.4

(C9), 135.3 (C8), 131.8 (C1), 131.6 (C10), 127.3 (C14), 125.8 (C6), 125.7 (C15), 125.6 (C11), 125.0 (C7), 124.0 (C2), 40.4 (C4), 26.8 (C3), 25.8 (C16), 17.8 (C17), 17.1 (C18), 12.9 (C19), 12.6 (C20).

**15-*cis*- $\beta$ -carotene**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*):  $\delta$  [ppm] = 1.04 (s, 3H-C16/17), 1.47 (m, 2H-C2), 1.61 (m, 2H-C3), 1.73 (s, 3H-C18), 1.97 (br. s, 3H-C19/20), 2.03 (m, 2H-C4), 6.10 – 6.20 (m, 1H-C8, 1H-C10 and 1H-C7), 6.35 (d,  $^3J = 15.1$  Hz, 1H-C15), 6.42 (d,  $^3J = 15.0$  Hz, 1H-C12), 6.64 (d,  $^3J = 15.0$  Hz, 1H-C14), 6.69 (dd,  $^3J = 14.9$  Hz and  $^3J = 11.4$  Hz, 1H-C11);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  [ppm] = 138.1 (C8), 137.9 (C6), 137.6 (C12), 137.4 (C13), 136.3 (C9), 130.9 (C10), 129.5 (C5), 127.0 (C7), 126.9 (C7), 125.7 (C15), 125.6 (C11), 39.8 (C2), 34.4 (C1), 33.3 (C4), 29.1 (C16/17), 21.9 (C18), 19.4 (C3), 12.9 (C19), 12.7 (C20).

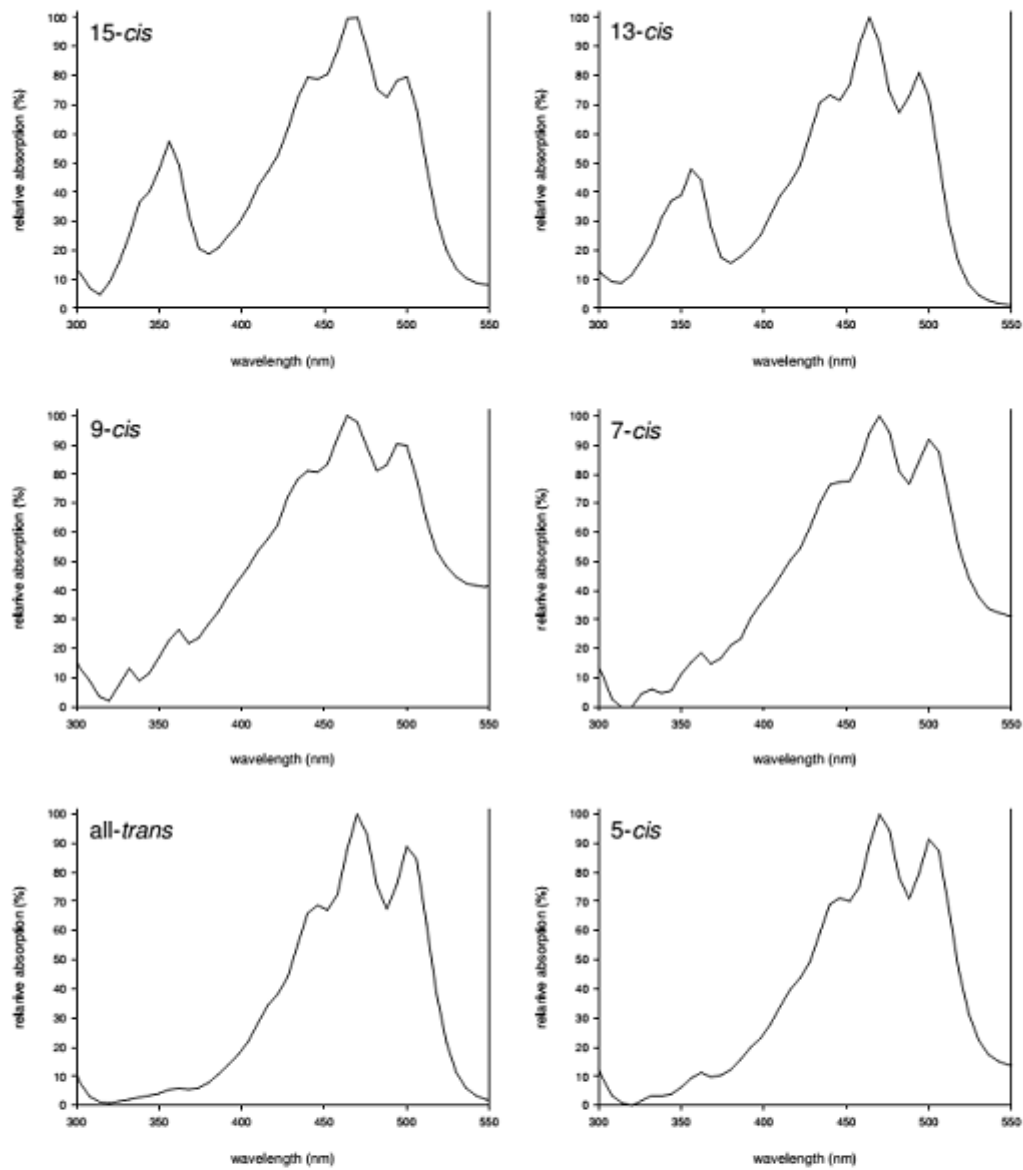
#### Characteristics of the used halogen lamp for irradiation experiments.



#### UV/VIS-data of all identified carotenoid isomers.

isomer	wavelength maxima (nm)				Q-ratio
15- <i>cis</i> - $\beta$ -carotene	344	422	440	464	0.61
13- <i>cis</i> - $\beta$ -carotene	338	422	446	470	0.46
all- <i>trans</i> - $\beta$ -carotene	350	428	452	476	0.06
9- <i>cis</i> - $\beta$ -carotene	350	428	452	476	0.09
15- <i>cis</i> -lycopene	356	440	470	500	0.57
13- <i>cis</i> -lycopene	356	440	464	494	0.48
9- <i>cis</i> -lycopene	362	440	464	494	0.26
7- <i>cis</i> -lycopene	362	446	470	500	0.19
all- <i>trans</i> -lycopene	362	446	470	500	0.06
5- <i>cis</i> -lycopene	362	446	470	500	0.11

## UV/VIS-spectra of lycopene isomers.



**10.2 Supporting Information zu *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62, 4960–4967**

1 Growing and Processing Conditions lead to Change in the Carotenoid Profile of Spinach

2 Thomas Heymann<sup>†</sup>, Lore Westphal<sup>‡</sup>, Ludger Wessjohann<sup>‡</sup> and Marcus A. Glomb<sup>\*†</sup>

3

4 <sup>†</sup>Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-

5 Mothes-Str. 2, 06120 Halle/Saale, Germany

6 <sup>‡</sup>Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Bioorganic Chemistry, Weinberg 3, 06120

7 Halle/Saale, Germany

8

9

10 \* To whom correspondence should be addressed (e-mail [marcus.glomb@chemie.uni-halle.de](mailto:marcus.glomb@chemie.uni-halle.de),

11 Fax +049-345-5527341)

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

**NMR-data of  $\beta$ -carotene standards.**

**all-trans- $\beta$ -carotene**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-d):  $\delta$  [ppm] = 1.03 (s, 3H-C16/17), 1.47 (m, 2H-C2), 1.62 (m, 2H-C3), 1.72 (s, 3H-C18), 1.97 (s, 3H-C19/20), 2.02 (t,  $^3J = 6.3$  Hz, 2H-C4), 6.12 – 6.16 (m, 1H-C8, 1H-C10 and 1H-C7), 6.25 (dd,  $^3J = 7.8$  Hz and  $^4J = 2.4$  Hz, 1H-C14), 6.35 (d,  $^3J = 14.9$  Hz, 1H-C12), 6.60 – 6.69 (m, 1H-C11 and 1H-C15);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  [ppm] = 137.9 (C6), 137.8 (C8), 137.2 (C12), 136.5 (C13), 136.0 (C9), 132.4 (C14), 130.9 (C10), 130.0 (C15), 129.4 (C5), 126.7 (C7), 125.0 (C11), 39.7 (C2), 34.3 (C1), 33.1 (C4), 29.0 (C16/17), 21.8 (C18), 19.3 (C3), 12.8 (C19), 12.7 (C20).

**15-cis- $\beta$ -carotene**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-d):  $\delta$  [ppm] = 1.04 (s, 3H-C16/17), 1.47 (m, 2H-C2), 1.61 (m, 2H-C3), 1.73 (s, 3H-C18), 1.97 (br. s, 3H-C19/20), 2.03 (m, 2H-C4), 6.10 – 6.20 (m, 1H-C8, 1H-C10 and 1H-C7), 6.35 (d,  $^3J = 15.1$  Hz, 1H-C15), 6.42 (d,  $^3J = 15.0$  Hz, 1H-C12), 6.64 (d,  $^3J = 15.0$  Hz, 1H-C14), 6.69 (dd,  $^3J = 14.9$  Hz and  $^3J = 11.4$  Hz, 1H-C11);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  [ppm] = 138.1 (C8), 137.9 (C6), 137.6 (C12), 137.4 (C13), 136.3 (C9), 130.9 (C10), 129.5 (C5), 127.0 (C7), 126.9 (C7), 125.7 (C15), 125.6 (C11), 39.8 (C2), 34.4 (C1), 33.3 (C4), 29.1 (C16/17), 21.9 (C18), 19.4 (C3), 12.9 (C19), 12.7 (C20).

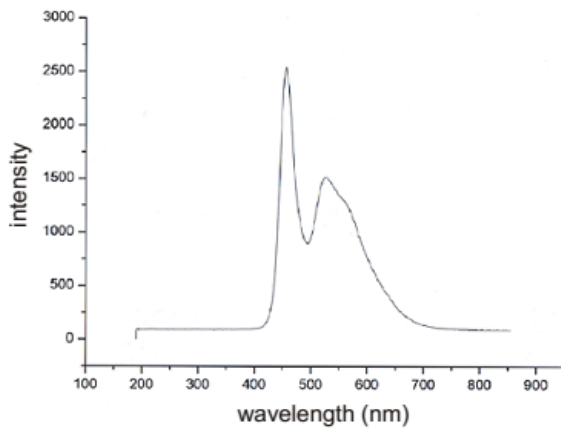
**9-cis- $\beta$ -carotene**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-d):  $\delta$  [ppm] = 1.03 (s, 3H-C16/17), 1.47 (m, 2H-C2), 1.62 (m, 2H-C3), 1.71 and 1.75 (2s, 3H-C18 and 3H-C18'), 1.96 (s, 3H-C19/19' or 3H-C20/20'), 1.97 (s, 3H-C19/19' or 3H-C20/20'), 2.02 (m, 2H-C4), 6.07 (d,  $^3J = 11.8$  Hz, 1H-C10), 6.15 (m, 1H-C10' and 1H-C8'), 6.18 (m, 1H-C7/7'), 6.22 (d,  $^3J = 15.8$  Hz, 1H-C14/14'), 6.28 (d,  $^3J = 14.7$  Hz, 1H-C12), 6.35 (d,  $^3J = 15.0$  Hz, 1H-C12'), 6.59 – 6.69 (m, 1H-C15/15', 1H-C8 and 1H-C11'), 6.75 (dd,  $^3J = 15.3$  Hz and  $^3J = 11.5$  Hz, 1H-C11);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  [ppm] = 138.1 (C6/6'), 137.9 (C8'), 137.4 (C12/12'),

136.6 (C13/13'), 132.8 (C9'), 132.2 (C14/14'), 132.1 (C8), 131.0 (C10'), 130.7 (C9), 130.1 (C15/15'), 129.5 (C5/5'), 128.6 (C7), 126.8 (C7'), 126.8 (C10), 125.0 (C11'), 124.1 (C11), 39.8 (C2'), 39.7 (C2), 34.4 (C1/1'), 33.3 (C4/4'), 29.0 and 29.1 (C16/16' and C17/17'), 22.0 (C18'), 21.9 (C18), 20.9 (C19'), 19.4 (C3/3'), 13.0 (C19, C20/20').

### UV/VIS-data of various carotenoid isomers.

isomer	wavelength maxima (nm)				Q-ratio
15- <i>cis</i> - $\beta$ -carotene	344	422	440	464	0.61
13- <i>cis</i> - $\beta$ -carotene	338	422	446	470	0.46
all- <i>trans</i> - $\beta$ -carotene	350	428	452	476	0.06
9- <i>cis</i> - $\beta$ -carotene	350	428	452	476	0.09

### Wavelength spectrum of the used halogen lamp.



### Light transmittance of typical greenhouse materials according to Jansen et al. (1998)

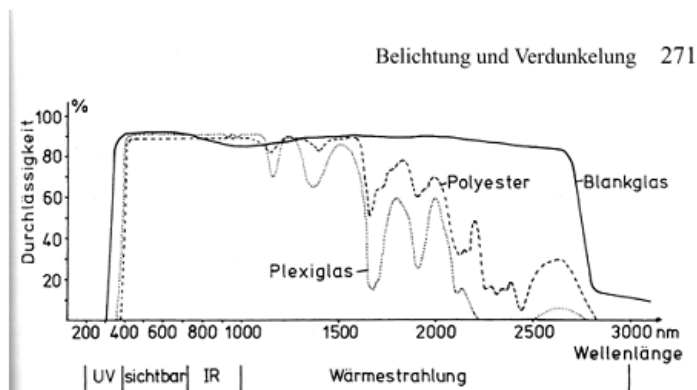


Abb. 136. Spektrale Durchlässigkeit von Blankglas (3,8 mm), glasfaserverstärktem Wellpolyester (1,2 mm) und Plexiglas (3 mm) (nach MACKROTH 1971).

**10.3 Supporting Information zu *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, XX,  
XXXX-XXXXX**

Lycopene Inhibits The Isomerization Of  $\beta$ -Carotene During Quenching Of Singlet Oxygen

And Free Radicals

Thomas Heymann, Philipp Heinz and Marcus A. Glomb\*

Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-

Mothes-Str. 2, 06120 Halle/Saale, Germany

\* To whom correspondence should be addressed (e-mail [marcus.glomb@chemie.uni-halle.de](mailto:marcus.glomb@chemie.uni-halle.de),

Fax ++049-345-5527341)

**Table S1.** Analytical data for the identification and characterization of all observed carotenoid isomers.

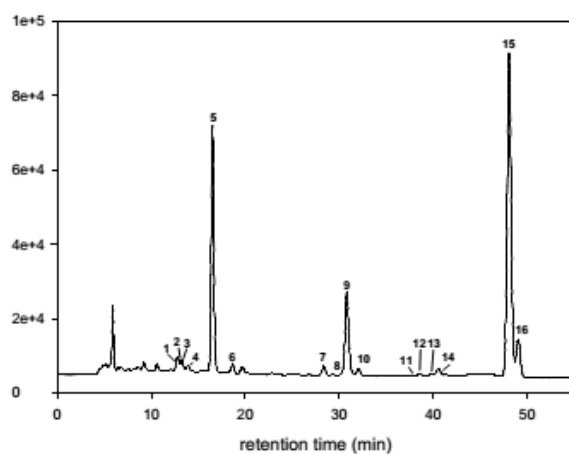
No	Carotenoid Isomer	Retention time (min)	Detected ions LC-MS/MS		Absorption maxima $\lambda_{max}$ HPLC-DAD analyses			Q-ratio (nm)	NMR data reference	
			Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	"Z" (nm)	I (nm)	II (nm)			III (nm)
1	(15Z)- $\beta$ -carotene	12.65	536.8	-	344	422	440	464	0.61	[2]
2	(13Z,15Z)- $\beta$ -carotene	13.11	536.8	-	350	422	440	464	0.37	-
3	(13Z)- $\beta$ -carotene	13.40	536.8	-	338	422	446	470	0.46	-
4	(9Z,13Z)- $\beta$ -carotene	14.03	536.8	-	344	422	446	470	0.42	-
5	(all-E)- $\beta$ -carotene	16.54	536.8	-	350	428	452	476	0.06	[2]
6	(9Z)- $\beta$ -carotene	18.63	536.8	-	350	428	452	476	0.09	[2]
7	(15Z)-lycopene	28.07	536.8	467.6	356	440	470	500	0.57	[1]
8	(xZ)-lycopene	29.76	536.8	467.6	362	434	464	488	0.22	-
9	(13Z)-lycopene	30.65	536.8	467.6	356	440	464	494	0.48	-
10	(7Z,9Z)-lycopene	31.95	536.8	467.6	362	422	446	470	0.10	[3]
11	(xZ)-lycopene	37.86	536.8	467.6	362	440	464	494	0.55	-
12	(9Z)-lycopene	38.83	536.8	467.6	362	440	464	494	0.26	-
13	(xZ)-lycopene	40.15	536.8	467.6	362	440	464	494	0.22	-
14	(7Z)-lycopene	40.75	536.8	467.6	362	446	470	500	0.19	[3]
15	(all-E)-lycopene	48.68	536.8	467.6	362	446	470	500	0.06	[1]
16	(5Z)-lycopene	49.60	536.8	467.6	362	446	470	500	0.11	[1]

[1]  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of synthesized standards were published before (*J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11133–11139)

[2]  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of synthesized standards were published before (*J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4960–4967)

[3]  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of synthesized standards were presented below.

### Representative Chromatogram according to the established analytical method

**Figure S1.** Chromatogram of a tomato sample analyzed by HPLC-UV (450 nm)



**NMR-Data for recently synthesized standards****Table S2.** Summary of NMR-data of (7*Z*)-lycopene

**(7*Z*)-lycopene**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*):  $\delta$  [ppm] = 1.61 (3H-C17/17'), 1.69 (3H-C16/16'), 1.79 (3H-C18), 1.82 (3H-C18'), ca. 1.95 (3H-C20/20'), 1.97 (3H-C19'), 2.08 (3H-C19), ca. 2.13 (2H-C3/3' and 2H-C4/4'), 5.11 (2H-C2/2'), 5.87 (1H-C8), 5.96 (1H-C6'), 6.13 (11.4 Hz, 1H-C7), 6.20 (1H-C10'), 6.25 (1H-C10 and 1H-C14/14'), 6.26 (1H-C8'), 6.36 (1H-C12/12'), 6.43 (1H-C6), 6.53 (1H-C7'), 6.60 – 6.67 (1H-C11/11' and 1H-C15/15');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  [ppm] = 140.9 (C5), 139.6 (C5'), 137.7 (C12), 137.5 (C12'), 136.7 (C13'), 136.6 (C13), 136.4 (C9), 136.3 (C9'), 135.5 (C8'), 132.8 (C14'), 132.8 (C14), 132.7 (C10), 131.9 (C1/1'), 131.7 (C8), 131.7 (C10'), 130.2 (C15'), 130.2 (C15), 125.9 (C6'), 125.1 (C11'), 125.0 (C11), 124.9 (C7), 124.9 (C7'), 124.1 (C2), 124.1 (C2'), 122.5 (C6), 40.5 (C4), 40.4 (C4'), 26.8 (C3'), 26.7 (C3), 25.8 (C16/16'), 17.8 (C17/17'), 17.6 (C19), 17.1 (C18'), 16.6 (C18), 13.0 (C19'), 12.9 (C20/20')

Assignment was additionally performed by H,H-COSY,  $^{13}\text{C}$ -APT, HSQC and HMBC spectra.

**Table S2.** Summary of NMR-data of (7*Z*,9*Z*)-lycopene

**(7*Z*,9*Z*)-lycopene**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*):  $\delta$  [ppm] = 1.57 (3H-C17), 1.61 (3H-C17'), 1.65 (3H-C16), 1.69 (3H-C16'), 1.79 (3H-C18), 1.82 (3H-C18'), 1.88 (3H-C20), 1.97 (3H-C19' and 3H-C20'), 2.00 (3H-C20), 2.05 – 2.16 (2H-C3/3' and 2H-C4/4'), 5.10 (2H-C2/2'), 5.93 (1H-C6'), 6.05 (1H-C8 and 1H-C10), 6.12 (1H-C6), 6.18 (1H-C10'), 6.21 (1H-C14), 6.24 – 6.25 (1H-C12, 1H-C8' and 1H-C14'), 6.32 (1H-C7), 6.35 (1H-C12'), 6.49 (1H-C11 and 1H-C7'), 6.62 (1H-C15/15'), 6.66 (1H-C11');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  [ppm] = 140.9 (C5), 139.4 (C5'), 137.6 (C12'), 136.7 (C13), 136.4 (C13'), 136.0 (C9'), 135.8 (C9), 135.8 (C8'), 135.6 (C12), 132.8 (C14'), 132.2 (C14), 131.9 (C1/1'), 131.7 (C10'), 130.2 (C15'), 130.0 (C15), 129.9 (C10), 126.5 (C11), 126.3 (C7), 126.0 (C8), 125.9 (C6'), 125.0 (C11'), 124.9 (C7'), 124.1 (C2/2'), 122.6 (C6), 40.4 (C4), 40.4 (C4'), 26.9 (C3/3'), 25.9

(C16/16'), 24.8 (C19), 17.9 (C17'), 17.8 (C17), 17.1 (C18'), 16.8 (C18), 13.1 (C19'), 13.0 (C20'), 12.9 (C20)

Assignment was additionally performed by H,H-COSY, <sup>13</sup>C-APT, HSQC and HMBC spectra.

## 11. Publikationsliste

### Veröffentlichungen

**Heymann, T.;** Raeke, J.; Glomb, M. A. Photoinduced Isomerization of Lycopene and Application to Tomato Cultivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, *61*, 11133–11139

**Heymann, T.;** Westphal, L.; Wessjohann, L.; Glomb, M. A. Growing and Processing Conditions Lead to Changes in the Carotenoid Profile of Spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2014**, *62*, 4960–4967

**Heymann, T.;** Glomb, M. A. Bedeutung der photochemischen Isomerisierung von Carotinoiden. *Lebensmittelchemie*, **2014**, *68*, 83–87

**Heymann, T.;** Heinz, P.; Glomb, M. A. Lycopene Inhibits The Isomerization Of  $\beta$ -Carotene During Quenching Of Singlet Oxygen And Free Radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2015**, *accepted (published as soon as possible)*

### Tagungsvorträge

**Heymann, T.;** Glomb, M. A. Unterscheidung von Anbaubedingungen von Tomaten und Spinat anhand der Carotinoid-Isomerenverteilung. 24. Arbeitstagung Regionalverband Süd-Ost, 27. März 2014, Halle (Saale)

Glomb, M. A.; **Heymann, T.** Growing and processing conditions of tomatoes and spinach can be differentiated by the carotenoid isomeric profile. 248th American Chemical Society National Meeting & Exposition, 11. August 2014, San Francisco

**Heymann, T.;** Glomb, M. A. Untersuchung des Carotinoidisomerenmusters als Marker zur Authentizitätsbestimmung von Tomaten und Spinat. 43. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 23. September 2014, Gießen

### Posterbeiträge

**Heymann, T.;** Raeke, J.; Glomb, M. A. Unterscheidung von Freiland- und Gewächshaus-Tomaten anhand der Lycopinisomerenverteilung. 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 16. – 18. September 2013, Braunschweig

## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Thomas Heymann

geboren am 14.11.1984 in Merseburg

ledig

### Berufliche Laufbahn

seit 08.2014 Beauftragter für Validierung und Stabilitätsprüfung QK bei der EVER Pharma Jena GmbH, Jena

05.2010 – 07.2014 Wissenschaftliche Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Chemie – Lebensmittelchemie und Umweltchemie, Arbeitskreis Prof. Dr. M. A. Glomb

### Hochschul- und Berufsausbildung

05.2009 – 04.2010 berufspraktische Ausbildung zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker am Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt

09.2004 – 04.2009 Studium zum Diplom-Lebensmittelchemiker an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### Schulische Ausbildung

09.1995 – 08.2004 Abitur am Domgymnasium Merseburg

### 13. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation „Isomerisierung von Carotinoiden und deren Bedeutung für die Lebensmittelauthentizität und *in vivo*“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Halle (Saale), 16.03.2015

.....