

**Analytische Parameter zur objektiven Qualitätsbewertung von  
Olivenölen**

Vom Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften der  
Bergischen Universität Wuppertal  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

**Georg Dierkes**

aus Essen

2012

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20120305-132243-5

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20120305-132243-5>]

## **Abstract**

The rising olive oil consumption outside the Mediterranean area can be explained besides the health benefits attributed to olive oil, basically by its specific odor and taste characteristics. It is therefore not surprising that the quality of olive oil is determined primarily by its sensory properties. High quality olive oil is characterized by the characteristic green and fruity odor notes and a well observable bitter and pungent taste. While the aroma of olive oil is based on the presence of volatile aroma active compounds, the bitter and pungent taste is caused by non-volatile hydrophilic compounds. There are disadvantages in the sensory quality evaluation: i) the lack of stable and standardized reference oil and ii) the large number of panelists, which is needed for statistically confirmed results. Therefore an objective instrumental method for evaluation of olive oil quality is of great interest. In this work an instrumental methods for classifying olive oils into the categories “native extra” and “non-native extra” was set up. Furthermore objective methods for predicting fruitiness and bitterness/pungency of olive oil were developed.

For building up a classification method, 24 relevant aroma active compounds were quantified in 95 olive oil samples of different quality by headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) and dynamic headspace coupled to GC-MS. Based on these stable isotope dilution assay results, statistical evaluation by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was performed. Important variables were concentrations of ethyl isobutanoate, ethyl-2-methyl butanoate, 3-methyl butanol, butyric acid, E,E-2,4-decadienal, hexanoic acid, guaiacol, 2-phenyl ethanol and the sum of the odor activity values of Z-3-hexenal, E-2-hexenal, Z-3-hexenyl acetate and Z-3-hexenol. Classification performed with these variables, predicted quality of 88% of the olive oils correctly.

Prediction of olive oil fruitiness was performed using odor activity values of Z-3-hexenal, E-2-hexenal, Z-3-hexenylacetat and Z-3-hexenol as variables for partial least square regression. The regression model was able to predict fruitiness for most of the samples in the error margin of the sensory evaluation ( $\pm 0.5$ ).

Additionally, the aroma compounds which are characteristic for some off-flavors and these one which are responsible for the positive green-fruity aroma, were dissolved in refined plant oil. Sensory evaluation of these models demonstrated that the off-flavors rancid, fusty and vinegary could be successfully simulated by a limited number of odorants. Even the green-

fruity aroma could be simulated by the used aroma compounds. However, results show that there must be more important compounds, which have to be considered.

Two strategies for developing a method for prediction bitterness and pungency of olive oil were pursued. The first one is based on the photometric measurement of total phenolic compounds content, whereas the second one is based on the semiquantitative evaluation of hydrophilic compounds by HPLC-MS. Evaluation of total phenolic compounds content was performed by a modified method for determination of  $K_{225}$  value using a more specific detection based on the pH value dependency of absorbance coefficients of phenol at  $\lambda=274$  nm. The first method was not suitable for correct prediction, because no significant correlation between bitterness/pungency and total phenolic compounds content could be found. For the second method, areas of 25 peaks detected in another set of 54 olive oils by a HPLC-MS profiling method were correlated with bitterness and pungency by partial least square regression. Six compounds (oleuropein aglycon, ligstroside aglycon, decarboxymethyl oleuropein aglycon, decarboxymethyl ligstroside aglycon, elenolic acid and elenolic acid methyl ester) show high correlations to bitterness and pungency. The first five are well known components of olive oil, while the last one is described for the first time in olive oil. The computed model using these six compounds was able to predict bitterness and pungency of olive oil in the error margin of the sensory evaluation ( $\pm 0.5$ ) for most of the samples.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Helmut Guth (†) für die Überlassung des Themas und für die lehrreichen gemeinsamen Jahre an der Bergischen Universität Wuppertal. Ich hoffe er wäre mit den Ergebnissen meiner Arbeit zufrieden gewesen.

Herrn Prof. Dr. Michael Petz danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit nach dem Tod von Prof. Guth und für die Möglichkeit diese Arbeit nach meinen eigenen Vorstellungen fertigstellen zu können.

Herrn Dr. Heiko Hayen danke ich für die Unterstützung bei der Realisierung der LC-MS-Messungen und für seine große Hilfe bei der Verfassung der Publikationen, die ohne ihn nicht zustande gekommen wären.

Dem Schweizer Olivenöl Panel und vor allem dessen Leiterin Frau Annette Bongartz danke ich für die Olivenölproben und die dazu gehörigen Sensorikdaten.

Herrn Prof. Dr. Oliver Schmitz und seinen Mitarbeitern Roman Dück und Sonja Krieger danke ich für die Möglichkeit LC-MS-Messungen durchführen zu können und für die Unterstützung bei diesen.

Herrn Axel Brakelmann und der Belegschaft der Feinmechanikwerkstatt danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und für die Herstellung diverser Materialien.

Für die gute Zusammenarbeit und die wirklich tolle Zeit möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Lebensmittelchemie bedanken. Die zahllosen speziellen Diskussionen, Internetrecherchen und Bastellaktionen waren stets eine willkommene Bereicherung des Laboralltags.

Frau Isabel Herling danke ich fürs Korrekturlesen und die geduldige Aufschlüsselung von etlichen in der Arbeit vorhanden gewesenen sprachlich und rechtschreibtechnisch fehlgeleiteten Wort- bzw. Satzkonstruktionen, welche die Lesbarkeit und Verständlichkeit der Arbeit erheblich herabsetzten und unnötigerweise vom Inhalt der eigentlich gewollten Aussage ablenkten.

<b>1</b>	<b>Einführung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Aktuelle Qualitätsbestimmung von Olivenöl.....	1
1.2	Probleme der Sensorik .....	5
1.3	Aromastoffe und Geruchswahrnehmung .....	7
1.4	Aromaprofil von Olivenöl.....	9
1.5	Olivenölqualität: Einflussfaktoren .....	17
1.6	Aromastoffanalytik von Olivenöl mittels instrumenteller Techniken.....	24
1.7	Chemometrie .....	28
1.8	Korrelation von Analytik- und Sensorikdaten .....	32
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnis und Diskussion .....</b>	<b>39</b>
3.1	Probenmaterial.....	39
3.2	Identifizierung wichtiger Aromastoffe per GC-O.....	39
3.3	Quantifizierung wichtiger Aromastoffe .....	47
3.4	Korrelation der Analysendaten mit der Sensorik .....	53
3.5	Bestimmung der Fruchtigkeit .....	68
3.6	Modellöle mit definierten Aromafehlern bzw. Fruchtigkeit .....	73
3.7	Bestimmung der Bitterkeit/Schärfe.....	76
3.8	Photometrische Bestimmung.....	76
3.9	Selektive Bestimmung hydrophiler Phenole im Olivenöl .....	79
3.10	Identifizierung von Bitter- und Scharfstoffen über eine Profilingmethode.....	80
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>109</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>115</b>
5.1	Sensorische Beurteilung.....	115
5.2	Bestimmung der Aromastoffe .....	115
5.3	Herstellung der Modellöle .....	133
5.4	Bestimmung der hydrophilen Substanzen .....	133
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>140</b>
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>142</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>149</b>

## **1 Einführung**

Olivenöl ist das Öl, welches aus der Frucht des Olivenbaumes (*Olea europaea L.*) ausschließlich durch mechanische Verfahren gewonnen wird. Der Olivenbaum ist einer der ältesten kultivierten Bäume und spielt seit der Antike eine wichtige Rolle in den Kulturen des Mittelmeerraumes. Auch heutzutage sind es vor allem die mediterranen Länder, in denen Olivenbaumplantagen bewirtschaftet werden. Spanien stellt, gefolgt von Italien und Griechenland, den weltweit größten Olivenölproduzenten dar. Die Bedeutung des Olivenöls in der Ernährung in Mitteleuropa, aber auch in den USA und Australien, ist in den letzten Jahrzehnten stark gestiegen. Die Vorzüge von Olivenöl, wie die hohe ernährungsphysiologische Güte, hohe Oxidationsstabilität auch während des Erhitzens und die vorbeugende Wirkung gegen kardiovaskuläre Erkrankungen, erklären nicht alleine den steigenden Olivenölkonsum außerhalb des Mittelmeerraumes. Vielmehr sind es auch die besonderen organoleptischen Eigenschaften, die das Olivenöl beim Verbraucher immer beliebter werden lassen (1).

Auf Grund dieser besonderen Aromaeigenschaften nimmt die Sensorik bei der Qualitätsbewertung von Olivenölen eine wichtige Rolle ein. So handelt es sich beim Olivenöl um das erste Lebensmittel, bei welchem eine sensorische Beurteilung Teil der amtlichen Überwachung wurde (2).

### **1.1 Aktuelle Qualitätsbestimmung von Olivenöl**

Olivenöl besitzt besondere geschmackliche und ernährungsphysiologische Eigenschaften, die ihm, unter Berücksichtigung seiner Produktionskosten, ein Marktsegment mit verhältnismäßig hohen Preisen gegenüber den meisten anderen Pflanzenölen eröffnet. Aufgrund dieser Situation wurden für Olivenöl neue Vermarktungsvorschriften für die Etikettierung, Aufmachung und Werbung erlassen (Verordnung (EG) Nr. 1513/2001). Die Bezeichnungen der Olivenölkategorien

entsprechen physikalisch-chemischen und organoleptischen Eigenschaften, die im Anhang der Verordnung 136/66/EWG und in der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 der Kommission vom 11. Juli 1991 über die Merkmale von Olivenölen und Oliventresterölen sowie die Verfahren zu ihrer Bestimmung, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 61/2011, genau festgelegt sind. Eine wichtige Ergänzung zu den oben beschriebenen Verordnungen stellt die Verordnung (EG) Nr. 2815/98 über Handelsbestimmungen für Olivenöl und zur Überprüfung der Ursprungsangaben dar. Entsprechend dem Anhang "Bezeichnung und Definition für Olivenöl und Oliventresteröl nach Artikel 35" der Verordnung (EWG) Nr. 136/66 geändert durch die Verordnung 1638/98/EG und 1513/2001/EG, lassen sich folgende neun Olivenölkategorien unterscheiden:

- *Natives Olivenöl Extra*
- *Natives Olivenöl*
- *Gewöhnliches natives Olivenöl*
- *Lampantöl*
- *Raffiniertes Olivenöl*
- *Olivenöl*
- *Rohes Oliventresteröl*
- *Raffiniertes Oliventresteröl*
- *Oliventresteröl*

Gemäß Artikel 35 der Verordnung Nr. 136/66/EWG können auf der Einzelhandelsstufe die Kategorien *Natives Olivenöl extra*, *Natives Olivenöl*, *Olivenöl* und *Oliventresteröl* vermarktet werden. In der Bundesrepublik Deutschland findet man im Einzelhandel hauptsächlich Olivenöle der Kategorie *Nativ extra*.

Zur Gewährleistung der Echtheit, der Qualität und des Geschmacks der vermarkteten Olivenöle wurden von der Europäischen Gemeinschaft zahlreiche Verordnungen erlassen. Folgende Zusammenstellung soll einen kurzen Überblick über bestehende Vorschriften geben: Seit 1991 ist die Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 der Kommission der Europäischen Gemeinschaften über die Merkmale von Olivenölen und Oliventresterölen sowie die Verfahren zu ihrer Bestimmung in Kraft. Diese Verordnung

legt für die verschiedenen Olivenölkategorien sowohl die Grenzwerte als auch die dazugehörigen Analysenverfahren zur Bewertung fest. Änderungen der oben bezeichneten Verordnung finden sich in den Verordnungen (EWG/EG) Nr. 3682/91, Nr. 1429/92, Nr. 620/93, Nr. 826/93, Nr. 177/94, Nr. 2632/94, Nr. 656/95, Nr. 2527/95, Nr. 2472/97, Nr. 282/98, Nr. 2248/98, Nr. 379/99, Nr. 796/2002, Nr. 1989/2003 und Nr. 640/2008.

Die Einordnung der Olivenöle in die Handelskategorien erfolgt an Hand der Ergebnisse von chemischen Analysenmethoden und vor allem über die Ergebnisse der sensorischen Untersuchung.

### **Chemische Analyse**

In der Verordnung Nr. 2568/91/EWG bzw. in den Ergänzungen und Berichtigungen werden zur chemischen Analyse folgende Verfahren vorgeschlagen:

- Bestimmung der freien Fettsäuren
- Bestimmung der Peroxidzahl
- Bestimmung des Wachsgehaltes
- Bestimmung des Gehaltes an Sterinen
- Bestimmung der Fettsäuren in 2-Stellung der Triglyceride
- Bestimmung des Trilinoleingehaltes
- Bestimmung der Zusammensetzung der Triglyceride
- Bestimmung des Erythrodiols und des Uvaols
- Bestimmung von Stigmastadienen
- Bestimmung der Fettsäuremethylester einschließlich der trans-Isomeren
- Bestimmung des Gehaltes an flüchtigen halogenierten Lösungsmitteln in Olivenöl
- UV-spektrophotometrische Analyse

## Sensorische Analyse

Neben der chemischen Analyse muss eine sensorische Untersuchung der nativen Olivenöle durchgeführt werden, welcher eine besondere Bedeutung zur Bewertung der Qualität zukommt. Der Internationale Olivenrat (COI) hat ein Verfahren zur Bewertung der organoleptischen Merkmale nativer Olivenöle entwickelt (3). Dieses Verfahren, welches als Paneltest bezeichnet wird, wurde in eine EG-Verordnung übernommen (4). Die Ausführung der sensorischen Prüfung, z.B. Einrichtung des Sensorikraums, Auswahl der Prüfer zur Aufstellung eines Panels und Bewertungskriterien der Sinneseindrücke sind genau festgelegt. Hierdurch soll eine möglichst objektive Beurteilung gewährleistet werden. Die Verfahrensvorschrift dient der Festlegung der Kriterien für die Bewertung der organoleptischen Merkmale von nativen Olivenölen und beschreibt die Methode für ihre diesbezügliche Einstufung. Die Verfahrensvorschrift gilt nur für die Einstufung nativer Olivenöle entsprechend ihrer positiven Attribute (cf. nächster Absatz) und dem Umfang der Mängel (negative Attribute, cf. nächster Absatz), wie sie von einer Gruppe ausgewählter und geschulter Prüfer (min. 8) vorgenommen wird. Die Prüfer werden anhand von Referenzproben geschult im Erkennen der Attribute: stichig-schlammig, modrig-feucht, weinige-essigartig, ranzig und bitter. Zur Zusammensetzung, Herkunft und Haltbarkeit dieser Referenzproben liegen allerdings nur wenige Informationen vor. Die Charakterisierung der nativen Olivenöle erfolgt nach folgenden olfaktorischen, gustatorischen und taktilen Merkmalen auf einer dimensionslosen Intensitätsskala:

### • *Positive Attribute:*

**Fruchtig** (Gesamtheit der je Olivensorte und Merkmale eines Öls unmittelbar oder retronasal wahrgenommenen Geruchsempfindungen aus gesunden und frischen, grünen oder reifen Früchten)

**Bitter** (typischer Geschmack von Öl aus grünen oder grünlichen Oliven)

**Scharf** (taktilempfundenes Prickeln, typisch für Öle, die zu Beginn des Wirtschaftsjahres hauptsächlich aus noch grünen Oliven gewonnen werden)

• **Negative Attribute:**

**Stichig-schlammig** (typisches Aroma von Öl aus Oliven, die sich in einem Zustand fortgeschrittener anaerober Gärung befinden)

**Modrig-feucht** (typisches Aroma von Öl aus Oliven mit Schimmel- und Hefepilzbefall bedingt durch mehrtägige Lagerung der Früchte unter feuchten Bedingungen)

**Wein- oder essigartig** (typisches Aroma von bestimmten Ölen, in erster Linie bedingt durch einen Gärungsprozess der Oliven)

**Metallisch** (an Metall erinnerndes Aroma, typisch für Öl, das beim Vermahlen, Schlagen, Pressen oder Lagern lange mit Metallflächen in Kontakt stand)

**Ranzig** (Aroma von oxidierten Ölen)

Neben diesen am häufigsten auftretenden Fehlern gibt es noch weitere (z.B. heuartig, holzig, erdig, wurmstichig, gurkenartig) die unter der Kategorie „andere Fehler“ zusammengefasst werden. Ein Bewertungsbogen, wie er vom Schweizer Olivenöl Panel verwendet wird, ist im Anhang (Abbildung A1) abgebildet.

Die Einteilung der Olivenöle in die einzelnen Kategorien erfolgt anhand der sensorischen Bewertung durch die Panelmitglieder. Olivenöle der Kategorie „Nativ extra“ zeichnen sich durch eine wahrnehmbare Fruchtigkeit (Bewertung fruchtig >0) und durch die Abwesenheit von Fehleraromen aus. Schwache Aromafehler (Summe der negativen Attribute  $\leq 3,5$ ) führen zu einer Einordnung der Öle in die Kategorie „Nativ“. Sind die negativen Attribute sehr stark ausgeprägt (Summe  $\geq 3,5$ ) wird das Öl als „Lampante“ eingestuft und es ist für den direkten Verzehr nicht mehr geeignet.

## 1.2 Probleme der Sensorik (5, 6, 7)

Das Aroma von Olivenöl setzt sich aus mehr als hundert verschiedenen Aromastoffen zusammen. Dabei handelt es sich um hydrophobe flüchtige Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner 300 amu. Das menschliche Riechorgan stellt ein sehr

empfindliches System zur Wahrnehmung dieser Substanzen dar. So reichen häufig schon wenige Moleküle aus, um durch Interaktion mit den Geruchsrezeptoren eine Reizweiterleitung ins Gehirn auszulösen. Im Gehirn werden die Reize der einzelnen Geruchsrezeptoren zu einer komplexen Geruchswahrnehmung zusammengesetzt (cf. Abschnitt 1.3). Die menschliche Nase stellt somit ein empfindliches Messgerät dar, welches auch komplex zusammengesetzte Mischungen erkennen kann. Die Qualitätsbeurteilung von Olivenöl sollte somit über eine sensorische Untersuchung gut möglich sein, wobei die sensorische Bewertung einige Probleme birgt. Die menschliche Nase ist zwar sehr empfindlich und kann sehr viele Aromastoffe unterscheiden, jedoch fehlt für eine hinreichende Beschreibung häufig das passende Vokabular. Untersuchungen haben auch gezeigt, dass einzelne Aromastoffe in komplexen Aromastoffgemischen nicht differenziert werden können (8) und die Konzentrationsverhältnisse der Aromastoffe einen entscheidenden Einfluss auf die wahrgenommene Aromaqualität haben (9). Daher sind reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse nur durch intensives Training zu erreichen. Dies und die durch das schnelle Ermüden der menschlichen Nase bedingte stark begrenzte Probenkapazität, machen die sensorische Prüfung äußerst zeitaufwendig. Zu dem benötigt man für eine sensorische Prüfung mindestens 8 Prüfpersonen, um individuelle Präferenzen und Schwächen der Prüfer auszugleichen und um statistisch abgesicherte Ergebnisse zu erhalten. Da es sich bei der sensorischen Prüfung nicht um ein absolutes sondern um ein relatives – Vergleich der Proben mit dem sensorischen Gedächtnis - Verfahren handelt, kann die Prüfreihefolge einen entscheidenden Einfluss auf das Prüfergebnis haben. So wird eine Probe mittlerer Qualität, sollte sie nach einer Probe schlechter Qualität verkostet werden, besser bewertet als sie in Wirklichkeit ist und eine Probe guter Qualität nach einer Probe sehr guter Qualität schlechter als es der Realität entspricht. Neben dem Nachteil des hohen Personal- und Zeitaufwandes lässt sich die Sensorik nicht für die Routineanalytik oder für on-line/at-line Messungen während des Herstellungsprozesses einsetzen. Daher ist die Entwicklung instrumenteller Methoden zur objektiven Geruchsbewertung von großem Interesse. Gerade beim Olivenöl, welches im Vergleich zu anderen Speiseölen zu relativ hohen Preisen angeboten wird, kann eine falsche sensorische Beurteilung und eine damit verbundene falsche Einordnung des Öls in eine der Handelskategorien zu hohen wirtschaftlichen Verlusten

führen. Daher ist eine instrumentelle Methode, welche eine objektive und reproduzierbare Qualitätsbeurteilung gewährleistet, für die Einstufung von Olivenölen in die einzelnen Handelskategorien unabdingbar (10).

### 1.3 Aromastoffe und Geruchswahrnehmung

Das Aroma von Lebensmitteln setzt sich in der Regel aus vielen hundert verschiedenen flüchtigen Verbindungen zusammen. Der Einfluss der einzelnen Verbindungen auf das Gesamtaroma hängt dabei weniger von deren Konzentration in der Lebensmittelmatrix, sondern viel mehr von der Konzentration im Gasraum über dem Lebensmittel und der chemischen und geometrischen Struktur der Verbindung ab. Damit eine Substanz als geruchsaktiv wahrgenommen wird, muss diese mit den Rezeptorproteinen der im Riechepithel lokalisierten Riechzellen interagieren. Durch die Bindung von aromaaktiven Substanzen an eines der ca. 1000 verschiedenen Rezeptorproteine wird eine Signalkaskade ausgelöst, welche nach Weiterleitung ins Gehirn die Geruchswahrnehmung auslöst (11). Bei den aromaaktiven Verbindungen handelt es sich um flüchtige, hydrophobe Verbindungen mit einem Molekulargewicht  $< 300$  amu. Obwohl die Verbindungen hydrophob und relativ klein sind, müssen diese spezifische Strukturmerkmale aufweisen, welche ein selektives Binden an bestimmte Geruchsrezeptoren ermöglichen. Diese meist polaren funktionellen Gruppen werden als osmophile Gruppen bezeichnet (12). Das Zusammenspiel dieser osmophoren Gruppen bewirkt die unterschiedlichen Geruchsqualitäten der verschiedenen Aromastoffe, wie z.B. apfelartig oder fettig. Dabei können kleine Änderungen in der Molekülgeometrie zu einer starken Änderung der Geruchsqualität führen, wie man am Beispiel der Stereoisomere des Carvons feststellen kann (13). (R)-(-)-Carvon riecht nach Minze, während das (S)-(+)-Carvon nach Kümmel riecht. Die Wahrnehmung unterschiedlicher Geruchsqualitäten kommt durch die unterschiedlich stark ausgeprägte Affinität der Aromastoffe zu den verschiedenen Geruchsrezeptoren zustande. Dadurch entsteht ein Signalmuster, welches vom Gehirn interpretiert und mit einer bekannten

Geruchsqualität verbunden wird (14). Da das Bindungsverhalten der Aromastoffe konzentrationsabhängig ist, zeigt die Geruchsqualität einzelner Aromastoffe ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit. Bei höheren Konzentrationen werden auch Geruchsrezeptoren besetzt, welche nur eine geringe Affinität zu dem Aromastoff aufweisen. Dies führt zu einer Änderung des Signalmusters. Ein Beispiel für die Konzentrationsabhängigkeit der Geruchsqualität stellt das 4-Methyl-4-mercaptopentan-2-on dar, welches in geringen Konzentrationen nach schwarzer Johannisbeere und in hohen Konzentrationen nach Katzenurin riecht (15).

Neben der Geruchsqualität ist die Geruchsintensität der Aromastoffe entscheidend für die Bildung des Gesamtaromas. Die Geruchsintensität eines Aromastoffes hängt neben seiner Bindungsaffinität zum Geruchsrezeptor von seiner Konzentration im Gasraum ab. Die Bindungsaffinität einer Substanz steht in Zusammenhang mit dessen chemischer und geometrischer Struktur und kann sich um mehrere Zehnerpotenzen unterscheiden. Sie wird durch den Geruchsschwellenwert charakterisiert, welcher die kleinste wahrnehmbare Konzentration angegeben in ng/l Luft darstellt. Kleine Änderungen in der Molekülgeometrie können auch hier zu einer starken Veränderung führen. So liegen die Geruchsschwellenwerte der acht verschiedenen Stereoisomeren des Weinlactons zwischen  $1 \times 10^{-5}$  und 1000 ng/l Luft (16). Die Konzentration der Aromastoffe im Gasraum über dem Lebensmittel hängt neben der Umgebungstemperatur und dem Dampfdruck der Substanz von der Lebensmittelmatrix ab. So kann eine sehr fettreiche Matrix zu einer besseren Löslichkeit der lipophilen Aromastoffe führen, was eine Verschiebung des Verteilungsgleichgewichts zwischen Gasraum und Lebensmittel in Richtung des Lebensmittels bewirkt. Aber auch durch Wechselwirkung der Aromastoffe mit Makromolekülen wie Polysaccharide oder Proteine kann es zu einer Veränderung der Konzentrationen im Gasraum kommen (17). Daher sollte bei der Beurteilung der Bedeutung eines Aromastoffes der Geruchsschwellenwert zu Grunde gelegt werden, welcher in einer dem betrachteten Lebensmittel ähnlichen Matrix bestimmt wurde. Dieser Wert gibt die minimal wahrnehmbare Konzentration eines Aromastoffes in einer bestimmten Matrix, z.B. Wasser oder Öl, an. Um die Bedeutung eines Aromastoffes für das Gesamtaroma eines Lebensmittels beurteilen zu können, wurde von Ullrich und Grosch das Aromawertkonzept entwickelt (18). In diesem Konzept wird die Bedeutung eines Aromastoffes durch seinen Aromawert (odour

activity value, OAV) ausgedrückt. Dieser berechnet sich aus dem Quotienten der Konzentration des Aromastoffes und dessen Geruchsschwellenwertes, bestimmt in der entsprechenden Matrix.

$$OAV_{x,y} = \frac{c_x}{a_{x,y}}$$

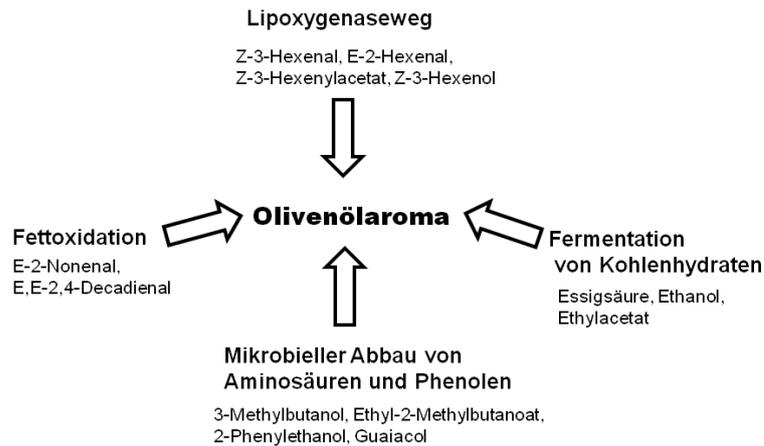
mit  $c_i$  = Konzentration des Aromastoffes x

und  $a_{x,y}$  = Geruchsschwellenwert des Aromastoffes x in der Matrix y

Der OAV gibt also an, um welchen Faktor der Geruchsschwellenwert überschritten wurde. Je höher der OAV einer Substanz ist, umso bedeutender ist dieser für das Aroma.

#### **1.4 Aromaprofil von Olivenöl**

Ungefähr 180 flüchtige Verbindungen wurden im Olivenölaroma nachgewiesen, wobei das Aromastoffprofil je nach Qualität des betrachteten Öles sehr stark variiert. Das Aroma von qualitativ hochwertigen Ölen wird dominiert von Substanzen, welche durch Enzymsysteme in der Olive über den sogenannten Lipoxygenaseweg aus ungesättigten Fettsäuren gebildet werden. Diese Substanzen kommen in allen Olivenölen vor, allerdings können die Gehalte der einzelnen Aromastoffe in Abhängigkeit von der Olivensorte, dem Anbaugebiet, Reifegrad und den klimatischen Bedingungen starken Schwankungen unterliegen. Sehr viel komplexer setzt sich das Aromaprofil von Olivenölen mit Aromafehlern zusammen. Hier findet man typische Verbindungen aus Verderbnisprozessen, verursacht durch Mikroorganismen und Oxidationsprodukte von ungesättigten Fettsäuren (19). Abbildung 1 fasst die Entstehungswege der im Olivenöl vorkommenden Aromastoffe zusammen.



**Abbildung 1: Bildungswege für das Olivenöl-Aroma und wichtige flüchtige Verbindungen (20)**

### **Lipoxygenaseweg (21)**

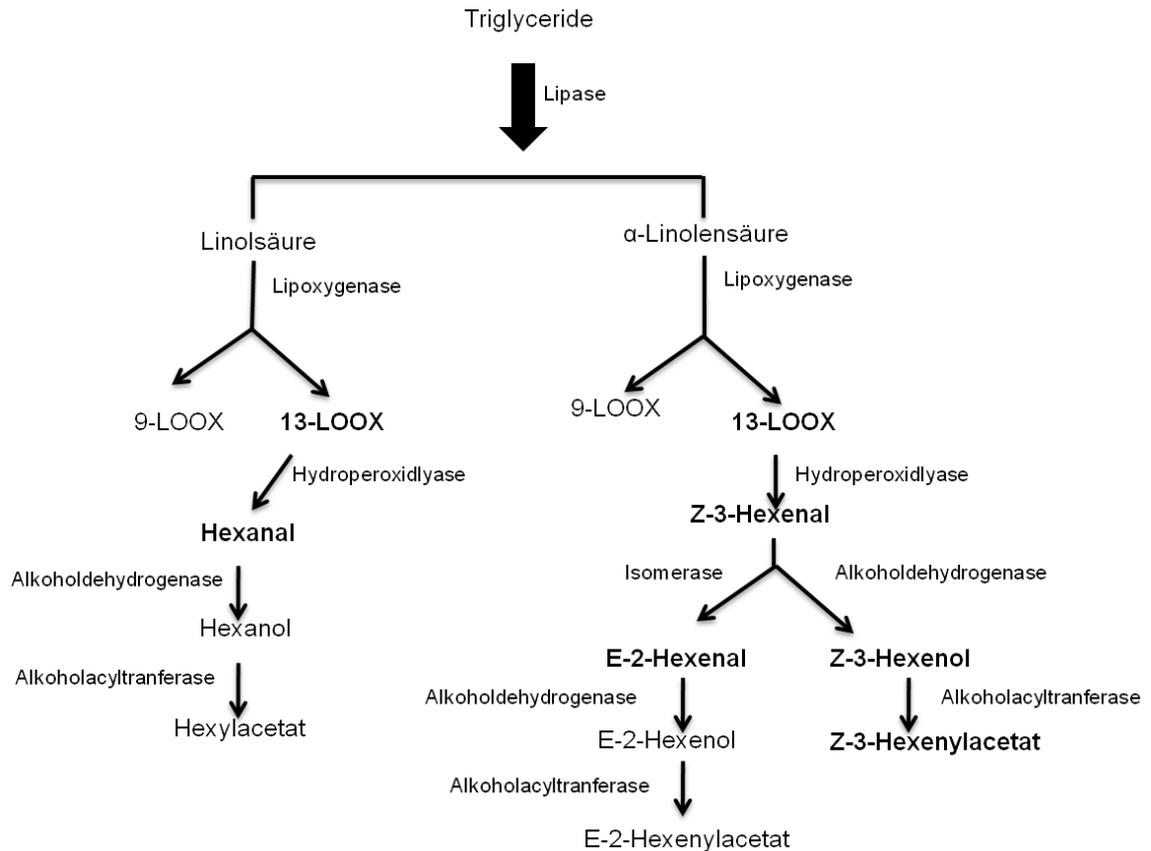
Das Enzym Lipoxygenase ist eine in höheren Pflanzen weitverbreitete Dioxygenase, welche die Dioxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Linol- und Linolensäure, katalysiert. Die Dioxygenierung der ungesättigten Fettsäuren ist der erste Schritt einer längeren Enzymkaskade, welche bei Verletzung des Pflanzengewebes zur Bildung von Bakterioziden, Fungiziden und Insektiziden wie dem E-2-Hexenal und von Phytohormonen wie dem Traumatol und der Jasmonsäure führt (22). Die entstehenden Aldehyde, Alkohole und Ester stellen sehr geruchsaktive Substanzen dar und sind für das grün-fruchtige Aroma vieler Früchte und Gemüsearten verantwortlich. Auch die Aromastoffe aus der Olive werden hauptsächlich über diesen Weg gebildet. Abbildung 2 zeigt die Hauptreaktionen des Lipoxygenasewegs in der Olivenfrucht.

Die Lipoxygenase aus der Olive katalysiert bevorzugt die Umsetzung der Linolensäure zum 13-Hydroperoxid. Linolensäure wird mit einer geringeren Aktivität auch bevorzugt zum 9-Hydroperoxid umgesetzt. In einem zweiten Schritt katalysiert das Enzym Hydroperoxid-Lyase die Spaltung der Hydroperoxide, wobei ein Aldehyd und eine Oxosäure entstehen. Die Hydroperoxid-Lyasen aus der Olive sind hochspezifisch für das 13-Hydroperoxid der Linolensäure, welches zum Z-3-Hexenal und zur 12-Oxo-

dodec-9-ensäure gespalten wird. Die Aktivität der Hydroperoxid-Lyase bezüglich der Spaltung der 13-Hydroperoxide der Linolsäure beträgt ca. 40-50 % im Vergleich zur Aktivität bezüglich der Spaltung der 13-Hydroperoxide der Linolensäure. Als flüchtige Verbindung entsteht hier das Hexanal. Durch Isomerasen, aber auch durch nicht-enzymatische Isomerisierungsreaktionen, wird ein Teil des Z-3-Hexenals zum E-2-Hexenal umgewandelt. Die gebildeten Aldehyde können durch weitere Reaktionsschritte durch Alkoholdehydrogenasen zu den Alkoholen Z-3-Hexenol, E-2-Hexenol und Hexanol reduziert und durch Alkoholacyltransferasen zu den Estern Z-3-Hexenylacetat und Hexylacetat umgesetzt werden. Neben diesen Hauptprodukten findet man in geringeren Konzentrationen auch C5-Carbonylverbindungen, Alkohole und Pentendimere. Die quantitative Zusammensetzung des Olivenöls an diesen Aromastoffen hängt stark von der jeweiligen Enzymausstattung der Oliven, aus dem es gewonnen wird, zum Zeitpunkt der Pressung ab. Die Enzymausstattung der Oliven variiert stark in Abhängigkeit von der Olivensorte, Anbauregion, den klimatischen Bedingungen und dem Reifegrad zum Zeitpunkt der Ernte. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Enzymaktivität während der Malaxation<sup>1</sup>, welche durch ungünstige Lagerbedingungen oder zu hohen Temperaturen herabgesetzt werden kann.

---

<sup>1</sup> Prozessschritt während der Olivenölgewinnung bei dem das Öl durch langsames Rühren aus dem mechanisch aufgeschlossenen Pflanzengewebe austritt.



**Abbildung 2: Hauptreaktionen des Lipoxygenasewegs in Oliven (23)**

### **Aromafehler im Olivenöl (24)**

Die Ursache für das Auftreten von Aromafehlern in Olivenölen liegt meist im mikrobiellen Verderb der Oliven während der Lagerung vor der Pressung oder durch oxidative Veränderung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Öl während der Lagerung des fertigen Olivenöls. So entstehen die Aromafehler modrig-feucht, stichig-schlammig und essigsauer-weinartig bei einer unsachgemäßen Lagerung der Oliven auf großen Haufen bei zu hoher Feuchtigkeit. Ein Pilzbefall durch Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* oder *Penicillium* führt zu einer Anreicherung von aromaaktiven Stoffwechselprodukten der Pilze wie den Methylketonen 2-Nonanon und 2-Heptanon, die aus dem Lipidabbau stammen. Durch Hefen der Gattungen *Candida*, *Pichia* und

*Saccharomyces* kommt es zu einer vermehrten Reduktion von Aldehyden zu Alkoholen und zu deren Veresterung mit kurzkettigen Fettsäuren. Dies führt zu dem als modrig-feucht bezeichneten Aromafehler. Im Gegensatz dazu bildet sich der Aromafehler stichig-schlammig durch einen bakteriellen Befall aus. Zu Beginn des Verderbs dominieren die *Enterobacteriaceae*-Arten *Aerobacter* und *Escherichia*, bei längerer Lagerung der Oliven kommt es auch zu einem Befall mit *Clostridium*- und *Pseudomonas*-Arten. Abbauprodukte von Aminosäuren wie das 3-Methylbutanol, 2-Methylbutanol und die korrespondierenden Säuren sowie deren Ester bilden die Hauptfraktion dieses Fehlaromas. Die Fermentation von Kohlenhydraten durch Essigsäure- und Milchsäurebakterien führt zu den leichtflüchtigen Verbindungen Essigsäure, Ethanol und Ethylacetat, die für das essigsäure-weinartige Fehlaroma verantwortlich sind. Flüchtige Phenole wie Guaiacol oder 4-Vinylguaiacol stellen weitere wichtige Produkte aus dem mikrobiellen Stoffwechsel dar. Sie entstehen durch Decarboxylierung von Vanillin- bzw. Cumarsäure durch verschiedene Mikroorganismen (25).

Zusätzlich zur Bildung der erwähnten Stoffwechselprodukte führt ein mikrobieller Verderb stets zu einer Abnahme der Konzentrationen der Aromastoffe aus dem Lipoxygenaseweg. Da die beteiligten Enzyme entweder durch invasive Mikroorganismen direkt inaktiviert oder durch die hohen Temperaturen in sogenannten Hotspots denaturiert werden.

Einen weiteren Bildungsweg für Fehlaromen stellt die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren dar. Hierbei entstehen durch Addition von Sauerstoff zunächst Hydroperoxide, welche zu sehr geruchsaktiven ungesättigten Aldehyden zerfallen. Auf diesem Wege kann sich während der Lagerung der Öle das ranzige Fehlaroma ausbilden.

Olivenöle mit Aromafehler weisen im Allgemeinen eine größere Vielzahl von aromaaktiven Substanzen und auch höhere Gehalte von diesen auf. Die Art und Zusammensetzung der Aromastoffe hängt davon ab, welche der oben aufgeführten Verderbnisreaktionen überwogen hat. Wobei stets eine mehr oder weniger starke Abnahme an den erwünschten Aromastoffen aus dem Lipoxygenaseweg, die das grün-fruchtige Aroma von Olivenöl ausmachen, festzustellen ist.

## Hydrophile Phenole im Olivenöl (26, 27)

Phenole aus Olivenöl lassen sich in lipophile und hydrophile Substanzen einteilen. Während die lipophilen Phenole wie die Tocopherole auch in anderen Pflanzenölen vorkommen, sind die meisten hydrophilen Phenole im Olivenöl nur in *Olea europaea* Varietäten zu finden. Hydrophile Phenole spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilität von Olivenölen. Desweiteren sind sie verantwortlich für die positiven gesundheitsfördernden und organoleptischen Aspekte von Olivenöl.

Olivenöl zeichnet sich gegenüber anderen Pflanzenölen durch eine relativ hohe Stabilität gegen einen oxidativen Verderb aus. Dies liegt zum einen daran, dass Olivenöl zum größten Teil aus der einfach ungesättigten Fettsäure Ölsäure besteht, die nicht so schnell oxidiert wird wie die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linol- und Linolensäure, und zum anderen an den guten antioxidativen Eigenschaften der hydrophilen Phenole im Olivenöl. Durch Übertragung von Wasserstoffatomen auf reaktive Radikale unter Ausbildung von stabilen radikalischen Strukturen bzw. Weiteroxidation zu chinoiden Systemen wird der Kettenmechanismus der Autoxidation unterbrochen. Ein weiterer Mechanismus zur Verminderung des oxidativen Fettverderbs ist die Komplexierung von Metallionen, welche die Fettoxidation katalysieren, durch die Phenole.

Die gesundheitsfördernden Eigenschaften, die dem Olivenöl im Rahmen des Ernährungskonzepts der sogenannten "Mediterranen Diät" zugeschrieben werden, gehen neben dem hohen Gehalt an einfach ungesättigter Fettsäuren, hauptsächlich Ölsäure, auf die hydrophilen Phenole im Olivenöl zurück. Diese fördern den Schutz gegen Karzinogenese, Atherosklerose sowie Leberschäden und Entzündungen.

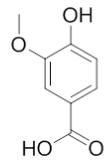
Die hydrophilen Phenole im Olivenöl werden auch für den bitteren und scharfen Geschmack, der vor allem für Olivenöl aus grünen Oliven charakteristisch ist, verantwortlich gemacht. Der bittere bzw. scharfe Geschmack von Olivenöl stellt ein gewünschtes Qualitätsmerkmal dar. Eine zu ausgeprägte Bitterkeit und Schärfe führt allerdings zu einer verminderten Akzeptanz beim Endverbraucher.

Die Olivenfrucht enthält hohe Konzentrationen an phenolischen Verbindungen, zwischen 1-3% des Frischgewichtes. Ein Teil dieser Verbindungen gelangt während des

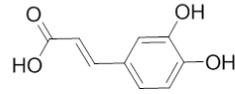
Extraktionsvorgangs ins Olivenöl. Die phenolischen Verbindungen im Olivenöl (cf. Abbildung 3) lassen sich in folgende Klassen einteilen:

Phenolsäuren, wie z.B. Kaffeesäure, Vanillinsäure und Gallussäure, stellen die im Olivenöl in geringsten Konzentrationen vorkommende Fraktion dar. In höheren Konzentrationen kommen die Phenolalkohole Hydroxytyrosol und Tyrosol vor, die durch Hydrolyse von komplexeren Verbindungen während der Pressung entstehen. Die Hauptfraktion der hydrophilen Phenole bilden die Secoiridoide, bei denen es sich um Ester aus Hydroxytyrosol bzw. Tyrosol und Elenolsäure handelt. Beim ersteren handelt es sich um das Oleuropeinaglycon und beim zweiten um das Ligstrosidaglycon. In der intakten Olive liegen diese als Glucoside vor. Während der mechanischen Ölextraktion wird der Glucoserest durch  $\beta$ -Glucosidasen abgespalten. Durch weitere enzymatische Prozesse kommt es zur Decarboxymethylierung und es entstehen Secoiridoid-Derivate wie das Decarboxymethyloleuropeinaglycon und das Decarboxymethyligstrosidaglycon (cf. Abbildung 4).

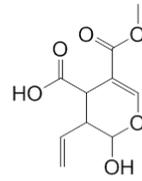
Weiterhin wurden die Lignane Pinoresinol und 1-Acetoxypinoresinol und die Flavone Apegenin, Luteolin und Chrysoeriol im Olivenöl gefunden (28).



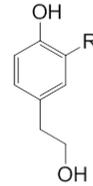
Vanillinsäure



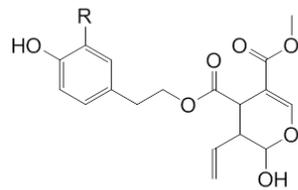
Kaffeesäure



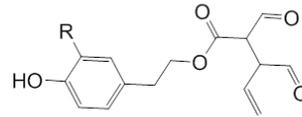
Elenolsäure



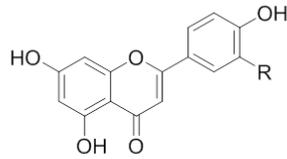
R=H Tyrosol  
R=OH 3-Hydroxytyrosol



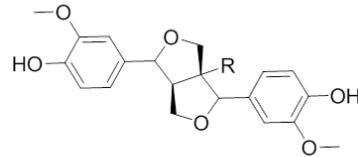
R=H Ligstroside glycon  
R=OH Oleuropein glycon



R=H Decarboxymethyl ligstroside glycon  
R=OH Decarboxymethyl oleuropein glycon



R=H Apigenin  
R=OH Luteolin  
R=OCH<sub>3</sub> Chrysoeriol



R=H Pinoresinol  
R=COOCH<sub>3</sub> Acetoxypinoresinol

**Abbildung 3: Hydrophile Phenole aus Olivenöl**

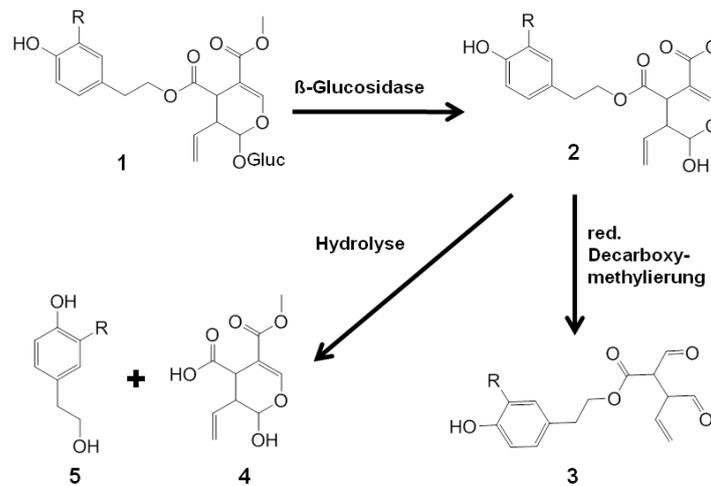


Abbildung 4: Bildungswege hydrophiler Phenole im Olivenöl.

**1** R=H Ligstroside, R= OH Oleuropein; **2** R=H Ligstrosideaglycon, R= OH Oleuropeinaglycon; **3** R=H Decarboxymethyligstrosideaglycon, R= OH Decarboxymethyloleuropeinaglycon; **4** Elenolsäure; **5** R= H Tyrosol, R=OH Hydroxytyrosol

### 1.5 Olivenölqualität: Einflussfaktoren (29)

Olivenöl, welches aus gesunden Früchten mit dem richtigen Reifegrad unter geeigneten technologischen Extraktionsbedingungen gewonnen wird, weist ein Aromaprofil aus vornehmlich C6-Aldehyden, C6-Alkoholen und deren Ester auf, die aus dem Lipoxygenaseweg stammen. Diese Substanzen sorgen für ein ausgewogenes grünfruchtiges Aroma, durch welches sich qualitativ hochwertige Olivenöle auszeichnen. Des Weiteren weisen diese Öle eine deutlich wahrnehmbare Bitterkeit und Schärfe auf, die durch die hydrophilen Phenole im Olivenöl verursacht werden. Neben der Olivensorte, dem Anbaugebiet und dem Reifegrad der Olivenfrüchte zum Erntezeitpunkt sind es vor allem verschiedene, während der Ölgewinnung auftretende Einflussfaktoren, die die Ölqualität mehr oder weniger bestimmen.

## **Reifegrad der Oliven zum Erntezeitpunkt**

Grüne unreife Oliven liefern genau so hohe Ölausbeuten wie reife Oliven und sind auf Grund einer höheren Festigkeit resistenter gegen physikalische Verletzungen während der Lagerung und damit weniger anfällig gegen mikrobiellen Verderb. Allerdings weisen grüne Oliven auf Grund eines hohen Phenolgehaltes eine sehr hohe Bitterkeit auf. Eine zu hohe Bitterkeit führt zu einer verminderten Akzeptanz beim Endverbraucher (30).

Mit zunehmender Reife steigt der Gehalt an flüchtigen Verbindungen insbesondere E-2-Hexenal bis zu einem Maximum, wenn die Farbe der Oliven von gelb-grün nach violett umschlägt. Danach ist ein starkes Absinken der Konzentrationen bedingt durch eine geringere Enzymaktivität zu beobachten. So beschreiben Aparicio et al. eine Verringerung der Konzentrationen der Verbindungen aus dem Lipoxygenaseweg (u.a. E-2-Hexenal, Z-3-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat) um ca. 50 %, wenn man Olivenöle aus unreifen bzw. überreifen Oliven vergleicht. Dementsprechend schwächer wird der wahrnehmbare grün-fruchtige Aromaeindruck und die Qualität des Olivenöls verschlechtert sich. Der Gehalt an Phenolen ist in reifen bis überreifen Oliven stark vermindert. Daraus hergestellte Olivenöle weisen einen nur sehr schwach ausgeprägtem Bitter- bzw. Schärfegeschmack auf.

## **Olivensorte**

Auf Grund sortenspezifischer Enzymausstattungen und verschiedener Gehalte an den mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linol- und Linolensäure der Olivenfrüchte weisen Olivenöle, die aus unterschiedlichen Olivensorten gewonnen wurden, ein unterschiedliches Spektrum an Verbindungen aus dem Lipoxygenaseweg auf.

Auch das Spektrum der hydrophilen Phenole unterscheidet sich sortenabhängig. Dabei variieren vor allem das Vorkommen und die Gehalte an verschiedenen Phenolsäuren und das Vorkommen der verschiedenen Secoiridoid-Derivate.

## **Klima und Ursprungsregion**

Die Ursprungsregion, die klimatischen Bedingungen und vor allem die Wasserverfügbarkeit haben einen großen Einfluss auf das Aromaprofil der Olivenöle. Auf Grund von Veränderungen in der Aktivität der einzelnen Enzyme des Lipoxygenaseweges kommt es zu unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen der einzelnen Aromastoffe. Der Phenolgehalt hängt stark mit der Wasserverfügbarkeit zusammen. So enthalten Oliven, welche unter eher trockenen Bedingungen gewachsen sind, mehr phenolische Verbindungen als solche, welche regelmäßig gewässert wurden.

## **Technologische Parameter (31)**

Die Ölqualität hängt stark von der physiologischen Beschaffenheit der Olivenfrüchte, aus denen es gewonnen wird, ab. Ein Parasitenbefall durch Olivenfliegen oder Schimmelpilze in der Zeit zwischen Ernte und Pressvorgang ist der häufigste Grund für die Bildung von Fehlparfums und der Verminderung der LOX-Aktivität (30). Abbildung 5 zeigt ein Fließschema des Olivenöl-Herstellungsprozesses. Nach der Ernte werden die Oliven bedingt durch Kapazitätsengpässe meist zunächst gelagert. Dies geschieht entweder auf großen Haufen oder in Kunststoffboxen/ -säcken ggf. bei reduzierten Temperaturen und kontrollierter Atmosphäre. Im ersten Verarbeitungsschritt werden die Oliven zur Entfernung von Fremdstoffen wie Erde, Steinen und Insekten gewaschen. Es folgt die Zerkleinerung entweder in traditionellen Steinmühlen oder in Hammer-/Messermühlen aus Metall. Beide Verfahren führen zu einer starken mechanischen Beanspruchung der Oliven, bei welcher auch die Olivensteine mit zerstört werden. Moderne Verfahren arbeiten mit so genannten Entsteinern, bei welchen die Oliven durch Zentripetalkräfte an einem scharfkantigen Gitter entlang geführt werden. Dadurch wird das Fruchtfleisch aufgeschlossen und von den Steinen entfernt. Durch Nachschalten eines Wärmeaustauschers kann eine bei diesem Verfahren resultierende verminderte Ölausbeute ausgeglichen werden (32). Zur Erhöhung der Ölausbeute wird die Olivenpaste nach der Zerkleinerung während der

Malaxation über einen Zeitraum von 20 bis 50 min langsam gerührt. Dabei tritt das Öl aus den aufgeschlossenen Zellen aus und lagert sich zu größeren Öltröpfen zusammen. Bei der Zerkleinerung, vor allem bei den schnellrotierenden Hammer-/Messermühlen, entstandene Emulsionen werden aufgebrochen. Darauf folgt die Separation des Öls vom Fruchtfleisch und Fruchtwasser. Dies geschieht entweder mittels einer Pressung oder durch Zentrifugen. Bei der Pressung wird die Olivenpaste auf Pressmatten aufgetragen und auf diese mittels einer Stempelpresse Druck ausgeübt. Dadurch treten das Öl und das Fruchtwasser aus. Diese werden in einem separaten Zentrifugationsschritt voneinander getrennt. Moderne Dreiphasen-Dekanter entfernen das Fruchtwasser und die festen Fruchtrückstände in einem einzigen Zentrifugationsschritt. Das Öl wird dann bis zur Abfüllung in großen Tanks, meist aus Edelstahl, gelagert.

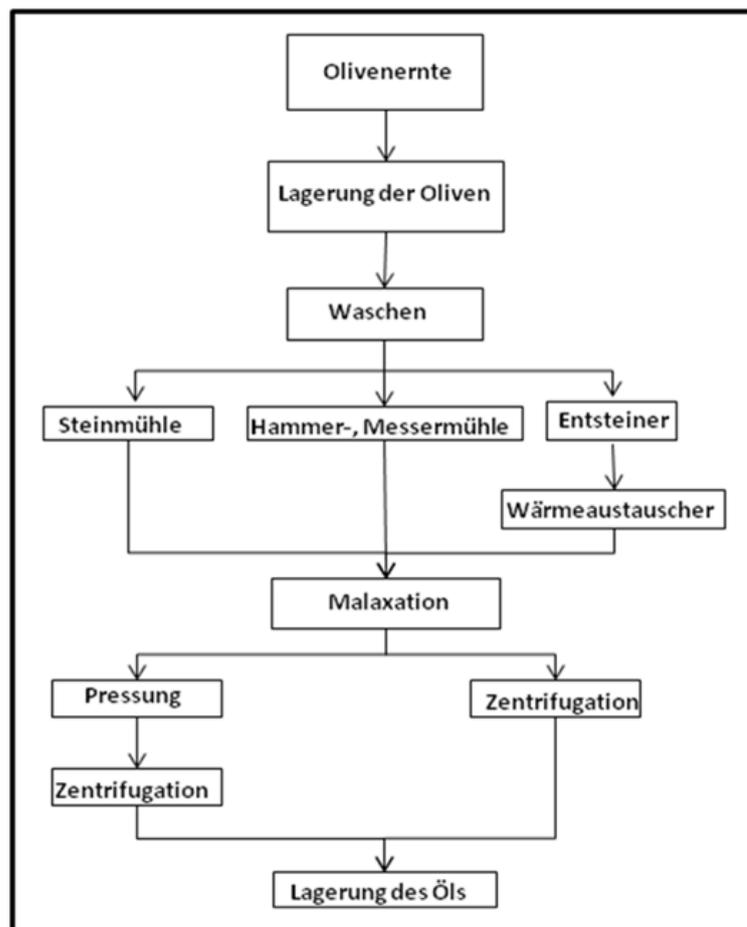


Abbildung 5: Fließschema der Olivenölgewinnung (32, 33)

## **Erntemethoden**

Um Öl hoher Qualität zu erhalten, müssen die Oliven möglichst von Hand direkt vom Baum gepflückt werden. Ein Abschlagen der Oliven mit langen Stangen führt zu Verletzungen der Früchte und damit zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber mikrobiellem Verderb. Oliven, welche vom Boden aufgesammelt wurden, liefern ein Öl mit einem erdigen, schimmeligen Fehlaroma, welches meist nur als lampante eingestuft werden kann (34).

## **Olivenfruchtlagerung**

Nach der Ernte sollten die Oliven möglichst zeitnah gepresst werden, da es während der Lagerung zu einem Abbau der Polyphenole und einem mikrobiellen Befall kommen kann. Beides führt zu einer verminderten Ölqualität (35). So führte in Lagerversuchen eine Lagerung bei 7,5 °C zu einem starken Schimmelbefall und damit zu stark ausgeprägten Aromafehlern. Dem entgegen führte eine Lagerung bei 0 °C zu einem starken Verlust an Polyphenolen, wodurch die Stabilität des resultierenden Öles gegenüber Oxidationsreaktionen stark vermindert war. Eine Lagerung bei 5 °C erhöhte die Haltbarkeit der Oliven auf 30 Tage (36). Desweiteren empfiehlt sich eine Lagerung unter Sauerstoff- und Lichtausschluss (37).

## **Waschen**

Vor der Verarbeitung der Oliven sollten diese zur Entfernung von Erd- und Schlammresten gewaschen werden. Zu hohe Temperaturen des Waschwassers können zu einer Inaktivierung von Enzymen führen, wodurch es zu einer Verminderung der Konzentrationen an Aromastoffen aus dem Lipoxygenaseweg kommen kann.

## **Entsteinen**

Auf Grund der hohen Aktivität von Peroxidasen in den Olivensteinen, führt ein Entfernen der Steine vor der Zerkleinerung zu einer bis zu 25% höheren Ausbeute an Polyphenolen im Öl (38).

## **Zerkleinern**

Die Wahl der Mühle hat einen Einfluss auf das Aromaprofil. So kommt es beim Einsatz von metallischen Hammermühlen auf Grund von lokalen Temperaturanstiegen zu einer Verminderung der Enzymaktivität, was eine geringere Konzentration an E-2-Hexenal, Hexenal und Z-3-Hexenol zur Folge hat im Vergleich zu Ölen, die mit einer Steinmühle gewonnen wurden. Dies kann durch einen Zusatz von Olivenbaumblättern ausgeglichen werden. Hammermühlen liefern größere Ausbeuten an Polyphenolen, da durch die stärkere mechanische Beanspruchung die Zellen besser aufgeschlossen werden.

Durch den Einsatz von modernen Messermühlen konnte durch die geringere thermische Belastung der Gehalt an Hexenal, E-2-Hexenal und C6-Estern gegenüber herkömmlichen Hammermühlen gesteigert werden, was zu einem intensiveren grasartigen blumigen Aroma führte (31, 32).

## **Malaxation**

Durch die Zerstörung des Pflanzengewebes bei der Zerkleinerung wird die Trennung der Enzyme aus dem Lipoxygenaseweg von ihren Substraten, den mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolen- und Linolsäure, aufgehoben und die Enzymkaskade bekannt als Lipoxygenaseweg in Gang gesetzt. Die Bildung der grün-fruchtigen Aromastoffe findet zum größten Teil während der Malaxation statt. Daher haben die Dauer und die Temperatur der Malaxation einen entscheidenden Einfluss auf das Aromaprofil im fertigen Öl. Während mit der Zeit vor allem die Konzentration an Alkoholen und C6- und C5-Carbonylverbindungen ansteigt, verursacht eine erhöhte

Temperatur, bedingt durch eine Inaktivierung der Hydroperoxidlyasen, eine Verringerung der Konzentration an den Aromastoffen aus dem Lipoxygenaseweg. Zusätzlich kommt es zu einer Abreicherung der Ester Z-3-Hexenylacetat und Hexylacetat und eine Anreicherung des Öls mit Hexanol und E-2-Hexenol. Letztere führen so einem Olivenölaroma, welches beim Endverbraucher weniger beliebt ist. Lange Malaxationszeiten und hohe Temperaturen begünstigen die Bildung der verzweigten Aldehyde 2-Methylpropional, 3-Methylbutanal und 2-Methylbutanal aus den Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin durch den Streckerabbau. Diese Aldehyde stellen sehr potente Fehleraromen dar und führen somit zu einer verminderten Ölqualität.

Durch Luftsauerstoff kommt es während der Malaxation zu einer Oxidation der Polyphenole durch Polyphenoloxidasen, was eine verringerte Bitterkeit/Schärfe und eine geringere Stabilität des Öls nach sich zieht. Daher wird für eine optimale Ölqualität eine Malaxationszeit von 30 – 45 min bei einer Temperatur von max. 25 °C empfohlen (39). Dies steht im Konflikt mit dem Wunsch nach einer möglichst hohen Ölausbeute, die mit der Malaxationszeit und der Temperatur ansteigt (33).

## **Separation**

Je nach eingesetzter Methode, Pressung oder Zentrifugation, kann es zu unterschiedlichen Einbußen in der Ölqualität kommen. Durch Interaktion von flüchtigen Verbindungen mit festen Bestandteilen, wie Fruchtfleisch oder den Pressmatten, oder flüssigem Fruchtwasser kann es zu einem Verlust an Aromastoffen kommen. Bei der Pressung sind vor allem die Pressmatten als kritisch für die Ölqualität anzusehen, da es durch Kreuzkontamination zu einer Verschleppung von Fehleraromen aus Chargen minderer Qualität in Chargen hoher Qualität kommen kann. Desweiteren können die Matten als Nährboden für Mikroorganismen dienen, wodurch es durch Fermentationsvorgänge zur Ausbildung von Fehleraromen im Öl kommen kann. Bei der Separation in Zentrifugen wird zur besseren Phasentrennung häufig warmes Wasser zugesetzt. Dadurch kommt es zu einem Verlust an hydrophilen Phenolen und einer

erhöhten Konzentration an den eher unerwünschten Alkoholen Hexanol und E-2-Hexenol.

### **Lagerung des Olivenöls**

Während der Lagerung kann es zur Ausbildung von Fehlparomen wie ranzig oder stichig-schlammig kommen. Die Ranzigkeit geht vor allem auf die Bildung von ungesättigten Aldehyden durch Oxidation von ungesättigten Fettsäuren zurück. Faktoren, die diese begünstigen sind Licht, Temperatur, Pigmente, Schwermetalle (vor allem Eisen und Kupfer) und der Sauerstoffpartialdruck. Ein hoher Gehalt an hydrophilen Phenolen erhöht durch deren antioxidative Eigenschaften die Stabilität des Öls gegenüber Oxidationsreaktionen.

Eine unvollständige Abtrennung von Trubstoffen und Fruchtfleischsedimenten kann zur Ausbildung des Fehlparomas stichig-schlammig führen, das vor allem auf Buttersäure und deren Ester zurückzuführen ist.

### **1.6 Aromastoffanalytik von Olivenöl mittels instrumenteller Techniken**

Ungefähr 180 verschiedene Verbindungen wurden im Olivenölparoma nachgewiesen. Bei den meisten Substanzen handelt es sich um Aldehyde, Alkohole, Ester, Carbonsäuren und Ketone. In geringeren Mengen kommen auch Kohlenwasserstoffe, Ether, Furane und andere Aromaten vor. Diese Verbindungen weisen große Unterschiede in ihren Polaritäten und Molekulargewichten auf. Desweiteren unterscheiden sich die Dampfdrücke stark. Die Konzentrationen der Aromastoffe sind im Allgemeinen sehr gering und bewegen sich im 100 ppb-Bereich oder sogar darunter. An die Analytik der Aromastoffe werden also hohe Anforderungen gestellt, da der Nachweis von Substanzen über einen großen Polaritätsbereich (polar bis unpolar) als auch einen großen Flüchtigkeitsbereich (sehr leichtflüchtig bis flüchtig) im Spurenbereich erforderlich ist. Zudem muss die Bildung von Artefakten aus

Aromastoffpräkursoren, wie zum Beispiel die Bildung von Aldehyden aus den Hydroperoxiden von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vermieden werden.

Guth und Grosch (40) und später Reiners und Grosch (41) extrahierten die Aromastoffe aus verschiedenen Olivenölen über eine Vakuumdestillation. Dazu wurden 500 g Öl mit 50 ml Diethylether versetzt und diese Mischung bei einem verminderten Druck von 6 mPa und einer Temperatur von 34 °C destilliert. Der abdestillierte Ether wurde zusammen mit den flüchtigen Verbindungen in einer Kühlfalle ausgefroren. Nach der Destillation wurde der Aromaextrakt auf ein Volumen von 300 µl aufkonzentriert. Diese Methode ist äußerst schonend und liefert hohe Ausbeuten für sämtliche flüchtige Verbindungen. Allerdings ist sie sehr zeitaufwendig und nur für große Probenmengen geeignet.

Die statische Headspace (5) und die direkte Thermodesorption (42) eignen sich als schnellere Techniken auch für geringere Probenmengen. Diese Techniken arbeiten ohne vorherigen Anreicherungsschritt und sind nur für sehr flüchtige Analyten geeignet, da die geringen Ausbeuten an schwerer flüchtigen Aromastoffen zu einer schlechten Empfindlichkeit führen. Desweiteren begünstigen die notwendigen hohen Temperaturen die Bildung von Artefakten. Bei der direkten Thermodesorption wird zudem von Problemen mit Memoryeffekten berichtet.

Bei den Techniken mit Anreicherungsschritt ist die dynamische Headspace, bei der die Analyten durch ein Inertgas aus dem Öl ausgetrieben und in einer Kühlfalle absorbiert werden, die meist mit Tenax gefüllt ist, am verbreitetsten (2, 24, 43, 44). Auf Grund des Anreicherungsschrittes stellt die dynamische Headspace eine sehr empfindliche Methode dar, mit der Aromastoffe auch im Ultraspurenbereich nachgewiesen werden können.

Gleiches gilt für die Festphasen-Mikroextraktion aus dem Gasraum über der Probe (HS-SPME). Einer relativ neuen Analysenmethode, bei der die Analyten aus dem Gasraum an einer Festphase aus verschiedenen Polymeren angereichert werden. Diese Technik wurde erstmals im Jahr 1990 von Arthur und Pawliszyn (45) für die Analytik von Schadstoffen in Wasser beschrieben und findet inzwischen auch in der Aromastoffanalytik breite Anwendung. Diverse Publikationen beschäftigen sich mit der Anwendung der HS-SPME in der Aromastoffanalytik von Olivenöl (34, 46, 47, 48, 49). So wurden verschiedene Festphasen und Analysenparameter wie die Extraktionszeit

und -temperatur untersucht. Dreikomponentenphasern aus Polymethylsiloxan, Polydivinylbenzen und Carboxen (PDMS/DVB/Car) haben sich als das beste Material für die Anreicherung der verschiedenen Aromastoffe mit einem breiten Polaritätsspektrum aus Olivenöl herausgestellt. Die optimale Extraktionszeit beträgt 30 min und die optimale Probentemperatur liegt bei 40 – 60 °C.

Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit ist die exakte Einhaltung der Extraktionsbedingungen wie Temperatur, Probenvolumen und Volumen des Gasraums bzw. bei der dynamischen Headspace das Gasvolumen wichtig. Diese Problematik kann durch Verwendung stabilisotopenmarkierter Standards umgangen werden. Da sich diese Standards, abgesehen von einem vernachlässigbaren Isotopeneffekt, während der Anreicherung und Desorption genauso verhalten wie die Analyten selbst, werden Verluste und unterschiedliche Wiederfindungsraten ausgeglichen. Nachteil der Stabilisotopenverdünnungsanalyse ist, dass die meisten markierten Standards nicht kommerziell erhältlich sind und daher erst synthetisiert werden müssen. Deswegen eignet sich diese Methode nicht für die Quantifizierung aller Aromastoffe, sondern nur für eine Auswahl besonders wichtiger Indikatorsubstanzen.

### **Analyse der hydrophilen Phenole (50)**

Die Bestimmung der hydrophilen Phenole im Olivenöl kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Entweder man bestimmt über ein für das gemeinsame Strukturmerkmal der Phenole selektives Verfahren alle phenolischen Verbindungen simultan als Summenparameter oder bestimmt selektiv die einzelnen Verbindungen nach vorangegangener chromatographischer oder elektrophoretischer Trennung.

Neben der für viele Matrices bekannten kolorimetrischen Bestimmung der Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu (51) werden in der Literatur speziell für die Bestimmung der Gesamtphenole im Olivenöl entwickelte Methoden beschrieben. Beltrán et al. schildern eine photometrische Methode, die auf der Bestimmung der Extinktion bei 225 nm nach Isolierung der Phenole durch eine Festphasenextraktion (SPE C<sub>18</sub>) (52) beruht. Diese Methode lieferte vergleichbare Ergebnisse wie die Bestimmung der Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu. Mateos et al. beschreiben

dagegen eine direkte photometrische Methode, welche ohne vorherige Isolierung der Phenole auskommt (53). Das Öl wird mit 1-Propanol und Puffer verdünnt und die Extinktion bei 274 nm bei zwei verschiedenen pH-Werten (pH=5 bzw. pH=13) gemessen. Auf Grund der pH-Wert-Abhängigkeit des Absorptionsverhaltens der Phenole ergibt sich aus der Differenz der Extinktionen ein zum Gesamtphenolgehalt proportionales Messsignal.

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes hat den Nachteil, dass Unterschiede im Phenolmuster verschiedener Olivenöle nicht erkannt werden und der Einfluss der verschiedenen phenolischen Substanzen auf beispielsweise die sensorischen Eigenschaften des Olivenöls nicht differenziert betrachtet werden kann.

Auf Grund der Vielzahl an verschiedenen hydrophilen Phenolen im Olivenöl ist eine selektive Bestimmung der einzelnen Spezies von hohem Interesse. Die selektive Bestimmung erfolgt nach Isolierung der Phenole aus dem Öl mittels hochauflösender Trenntechniken wie der Gaschromatographie (GC) (54, 55), der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder der Kapillarelektrophorese (CE) (56). Die Isolierung der hydrophilen Phenole kann mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) oder Festphasenextraktion (SPE) erfolgen. LLE erfolgt mittels eines Lösungsmittel-Gemisches aus Methanol oder Ethanol und Wasser mit einem Alkoholanteil von 50-90% (57, 58, 59).

Die Anreicherung der Phenole mittels SPE erfolgt über eine C<sub>18</sub>-Festphase und Elution mit Wasser:Methanol (30:70, v:v) (60, 61) oder über eine Diol-Festphase mit Hexan/Ethylacetat (90:10, v:v) (62, 63) bzw. Methanol (28, 56) als Elutionsmittel.

Hrcirik und Fritsche (64) führten eine Studie zum Vergleich der verschiedenen Extraktionstechniken durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die LLE mit Methanol:Wasser (60:40, v:v) höhere Gesamtphenolgehalte lieferte als die Anreicherung an C<sub>18</sub>- bzw. Diol-Phasen. Eine andere Studie von Montedoro et al. (65) zeigte, dass die Extraktion mittels C<sub>18</sub>-Festphase für einfache Phenole höhere Ausbeuten lieferte als die LLE mit Methanol:Wasser (80:20, v:v). Die Secoiridoide und deren Derivate ließen sich allerdings besser mittels LLE isolieren.

Die Bestimmung der hydrophilen Phenole wurde in den meisten Veröffentlichungen mittels HPLC an einer C<sub>18</sub>-Phase durchgeführt. Die Detektion erfolgte in den meisten Fällen entweder spektralphotometrisch (UV 280 nm (58) oder 225 nm (60)) oder

massenspektrometrisch (MS) (28, 56, 57, 63, 66). Die massenselektive Bestimmung bietet den Vorteil einer selektiven Bestimmung der einzelnen hydrophilen Phenole trotz ggf. auftretender Koelutionen. Mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie (HR-MS) und der Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS) konnten in der jüngeren Vergangenheit viele bis dahin unbekannte hydrophile Substanzen aus Olivenöl bzw. Oliven identifiziert und deren Struktur aufgeklärt werden (28, 56, 57).

### **1.7 Chemometrie (67, 68)**

Das von der menschlichen Nase wahrgenommene Aroma eines Olivenöls beruht auf der Wechselwirkung einer Vielzahl von leichtflüchtigen Verbindungen mit den Geruchsrezeptoren im Riechepithel. Auf Grund der komplexen Zusammensetzung des Aromas benötigt man eine Vielzahl von Messdaten, um Zusammenhänge zwischen dem Aromaprofil und den sensorischen Messergebnissen ausfindig machen zu können. Die klassische Herangehensweise ist durch die auf drei Dimensionen beschränkte menschliche Vorstellungskraft eingeschränkt. Daher sind für höher dimensionale Datensätze mathematische Methoden zur Datenanalyse erforderlich, um Variabilität, Inhomogenität und bestimmte Strukturen und Zusammenhänge innerhalb der Messdaten zu erkennen. Die Aufgabe der Datenanalyse ist es, die für eine konkrete Fragestellung relevanten Informationen aus der Gesamtdatenmenge zu isolieren und zu visualisieren bzw. für den Betrachter leichter erfassbar zu machen.

Im Einzelnen werden dabei die folgenden Ziele verfolgt:

- Auffinden von Strukturen (Gruppierungen, Klassen, Muster) oder sonstiger Auffälligkeiten in den Daten
- Ermittlung der Variablen oder Merkmalskombinationen, die als Einflussfaktoren für die Strukturen in den Daten und damit für Klassenbildung verantwortlich sind. Dabei sind Zusammenhänge und Beziehungen innerhalb der Variablen von großer Bedeutung. Diese Informationen kann man z.B. aus der Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) gewinnen.

- Quantitative Beschreibung der Modelle mit dem Ziel, zukünftige unbekannte Objekte zuordnen zu können oder Eigenschaften unbekannter Objekte vorherzusagen. Hierfür sind Methoden der Diskriminanzanalyse, wie z.B. die Linear Discriminant Analysis (LDA), oder multivariate Kalibrationsmethoden wie Multilinear Regression (MLR) oder die Partial Least Square Regression (PLS-R) geeignet.

### **Hauptkomponentenanalyse (PCA)**

Ziel der Hauptkomponentenanalyse ist es, unter weitgehendem Erhalt der ursprünglichen Information, die Originaldatenmatrix mit  $m$  Variablen durch eine geringere Anzahl  $h < m$  von orthogonalen zueinander stehenden Hauptkomponenten (Principal Components, PCs) zu beschreiben. So lässt sich der größte Teil der Informationen häufig durch zwei bis drei Hauptkomponenten darstellen. Vorausgesetzt es bestehen Zusammenhänge zwischen den einzelnen Variablen. Auf Grund dieser Datenreduktion kann man die Information aus hochdimensionalen Datensätzen in zwei oder drei Dimensionen grafisch darstellen.

Bei der Findung der Hauptkomponenten geht man davon aus, dass sich die Variablen durch Linearkombination von orthogonalen Hauptkomponenten beschreiben lassen.

Mathematisch lässt sich dies durch folgende Matrixschreibweise darstellen:

$$X = TP^T + E$$

Die Originaldatenmatrix  $X$  wird dargestellt als das Produkt aus der Hauptkomponentenmatrix  $P$  (den sogenannten Loadings) mit der Wertematrix  $T$  (den sogenannten Scores), zu dem die Restfehlermatrix  $E$  (Residuen) addiert wird. Die Loadingsmatrix  $P$  enthält die für alle Objekte gleichen Hauptkomponenten. Sie hat dieselbe Anzahl an Spalten wie die Matrix  $X$ , dies entspricht der Anzahl an Variablen in der Originaldatenmatrix. Die Anzahl der Zeilen ist durch die Anzahl der verwendeten

Hauptkomponenten gegeben. Die Scoresmatrix  $T$  besteht aus den für jedes Objekt individuellen Gewichtungsfaktoren. Die Zeilenzahl entspricht hier der Anzahl an Objekten in der Originalmatrix und die Spaltenzahl der Anzahl an verwendeten Hauptkomponenten. Die Residuenmatrix  $E$  stellt die Differenz aus der Originalmatrix und dem Produkt aus den Matrizen  $TP^T$  dar und enthält damit die restliche nicht erklärte Varianz der Originaldaten. Dabei handelt es sich im Idealfall lediglich um die für die Fragestellung irrelevante Information, welche auch als Rauschen bezeichnet wird. Die Hauptkomponenten werden so gewählt, dass sie jeweils in die Richtung der maximalen Varianz der Daten zeigen. Der Einfluss der einzelnen Variablen auf die Hauptkomponenten lässt sich an den Loadings ablesen. Je höher der Wert in der Loadingsmatrix für eine Variable ist, umso größer ist ihr Einfluss auf die jeweilige Hauptkomponente.

### **Partial Least Square Regression (PLS-R)**

Bei der Hauptkomponentenanalyse handelt es sich um ein reines Projektionsverfahren, mit welchem keine quantitativen Vorhersagen unbekannter Proben an Hand der Variablen möglich sind. Dies ist jedoch mit multivariaten Regressionsmethoden möglich, von denen die Partial Least Square Regression (PLS-R) die in der Chemometrie am häufigsten verwendete darstellt, da sie im Vergleich zu anderen multivariaten Regressionsmethoden weniger Hauptkomponenten benötigt und diese leichter zu interpretieren sind. Einer der größten Vorteile der PLS-R ist die Möglichkeit, nicht nur den Zusammenhang zwischen einer einzigen Zielgröße ( $y$ ) und vielen Messgrößen ( $X$ ) zu bestimmen, sondern es besteht zudem die Möglichkeit gleich mehrere Zielgrößen ( $Y$ ) über die Messdaten ( $X$ ) zu berechnen. Der erste Fall wird PLS1 und der zweite Fall PLS2 genannt. In Prinzip stellt die PLS1 einen Sonderfall der PLS2 dar, bei dem sich die Zielgrößenmatrix  $Y$  auf den Vektor  $y$  reduziert. Das Prinzip hinter der PLS-R ist, sowohl von den  $X$ -Daten als auch von den  $Y$ -Daten eine PCA zu berechnen, wobei die Auswahl der Hauptkomponenten unter Berücksichtigung der

Varianz in der jeweils anderen Datenmatrix erfolgt. Abbildung 6 soll die mathematische Prozedur veranschaulichen. Aus der mittenzentrierten Datenmatrix X werden über eine PCA die Scores T und die Loadings P berechnet. Über die Matrix W wird in einem Zwischenschritt die Verbindung zu den Y-Daten hergestellt. Über eine PCA erhält man gleichermaßen für die mittenzentrierten Y-Daten die Scores U und die Loadings Q. Bei den Berechnungen werden jeweils Informationen aus der jeweils anderen Datenmatrix berücksichtigt. Auf die genauen mathematischen Berechnungsschritte soll hier nicht weiter eingegangen werden. Diese können in der gut verständlich beschriebenen Literatur (68) nachgelesen werden. Als Endresultat liefert die PLS-R wie jedes Regressionsverfahren eine Regressionsgleichung. Diese sieht für die PLS-R allgemein formuliert wie folgt aus:  $y_i = b_0 + x_i^T b$

Durch Einsetzen der Messwerte x in die Gleichung kann y für unbekannte Proben berechnet werden.

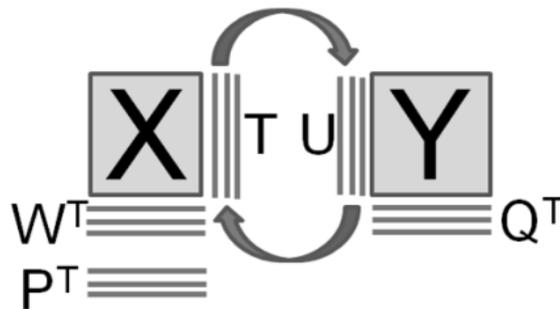


Abbildung 6: Schematische Darstellung der PLS-R Berechnungsprozedur (68)

### Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)

Bei der Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) handelt es sich nicht wie bei der PLS-R um eine Regressionsmethode, sondern um eine Klassifizierungsmethode. Daher ist die Zielgröße y keine Messgröße, sondern die kodierte Darstellung der Zugehörigkeit der Probe zu einer bestimmten Kategorie oder Klasse. Bei der Unterscheidung von zwei verschiedenen Klassen wird die Zugehörigkeit zur ersten Klasse mit +1 und die Zugehörigkeit zur zweiten Klasse durch -1 dargestellt. Bei

Fragestellungen mit drei oder mehr Klassen erfolgt die Kodierung durch zusätzliche y-Variablen. Die Berechnung der PLS-DA verläuft analog zur Berechnung der PLS-R. Entsprechend ergibt sich dieselbe Gleichung:

$$y_i = b_0 + x_i^T b$$

Durch Einsetzen der x-Werte unbekannter Proben kann man diese anhand der erhaltenen Werte für die jeweiligen y-Variablen den Klassen zuordnen. Die PLS-DA hat gegenüber anderen Klassifizierungsmethoden wie z.B. der Linear Discriminant Analysis (LDA) den Vorteil, dass bei der Berechnung des Klassifizierungsmodells die Information aus der Y-Datenmatrix, also die Zugehörigkeit zu den einzelnen Klassen, berücksichtigt wird. Dadurch wird die Anzahl der benötigten Hauptkomponenten reduziert. Desweiteren wird eine unbekannte Probe im Gegensatz zur LDA nicht unbedingt einer der Klassen zugeordnet, sondern kann auch als zu keiner der Klassen zugehörig gelten.

## **1.8 Korrelation von Analytik- und Sensorikdaten**

Auf Grund der oben erwähnten Probleme mit der sensorischen Qualitätsbestimmung von Olivenölen wurden viele Forschungsarbeiten durchgeführt, um die Sensorik durch objektive instrumentelle Methoden zu ersetzen. Dazu wurde nach den für die Fehleraromen und für das grün-fruchtige Aroma von Olivenöl verantwortlichen Aromastoffen und nach den für den bitteren und scharfen Geschmack verantwortlichen hydrophilen Substanzen im Olivenöl gesucht. Auf Basis der gefundenen Verbindungen wurden Regressionsmodelle zur Bestimmung der Olivenölqualität erstellt. Allerdings besteht noch viel Forschungsbedarf bei der Beurteilung der Bedeutung der einzelnen Aromastoffe und hydrophilen Substanzen für die Olivenölqualität.

### **Korrelation von Aromastoffen mit der Olivenölqualität**

Verschiedene Autoren haben sich in der Vergangenheit mit dem Zusammenhang des Auftretens bestimmter Aromastoffe in Olivenölen und deren sensorischer Beurteilung

beschäftigt. So untersuchten Angerosa et al. (69) 204 italienische Olivenöle mittels dynamischer Headspace gekoppelt mit der Gaschromatographie. Auf Basis von 114 gaschromatographischen Peaks nutzten sie ein neuronales Netzwerk zur erfolgreichen Vorhersage von Sensorikergebnissen. Allerdings wurden die für die Vorhersage herangezogenen Verbindungen weder identifiziert, noch auf ihre Aromaaktivität hin untersucht. Es ist somit nicht klar, ob die an der Vorhersage maßgeblich beteiligten Verbindungen auch tatsächlich für das Olivenölaroma verantwortlich sind. Eine Plausibilitätsprüfung ist somit nicht möglich, die gerade bei den zu einem Overfitting neigenden neuronalen Netzwerken besonders wichtig ist.

Servili et al. (43) untersuchten die Aromaprofile von 30 Olivenölen und korrelierten diese mit den Ergebnissen einer sensorischen Beurteilung. So konnten sie mit Hilfe der PLS einen Zusammenhang erhöhter Konzentrationen an Ethylacetat, Butan-1-ol und Essigsäure mit dem Auftreten des Aromafehlers „essigstichig“ aufzeigen. Weitere Korrelationen wie z.B. mit dem Aromaeindruck „grasartig“ basierten hauptsächlich auf nicht identifizierten Verbindungen oder konnten einer Kreuzvalidierung nicht standhalten. Jiménez et al. untersuchten Olivenöle, die entweder aus direkt vom Baum gepflückten Oliven stammten oder von Oliven, die vom Boden aufgesammelt wurden und in der Sensorik die Einstufung „Lampante“ erhielten (34). Sie entwickelten aus 12 aromaaktiven Verbindungen ein PCA-Modell mit welchem die Differenzierung zwischen den Ölqualitäten möglich war. Die dabei wichtigsten Indikatorverbindungen für einen vorhandenen Aromafehler waren Hexanal, Nonanal, 4-Ethylguaiacol, 2-Methylbutanol und Ethylacetat. Da die Olivenöle geringerer Qualität als „Lampante“ eingestuft wurden, waren die Aromafehler bei diesen sehr stark ausgeprägt. Diese Methode eignet sich also nur für die Erkennung von Ölen im fortgeschrittenen Stadium des Verderbs. Garcia-González et al. bestimmten die flüchtigen Verbindungen im Gasraum über verschiedenen Olivenpasten, um die Qualität des resultierenden Öles vorhersagen zu können (70). Über eine Stepwise Linear Discriminant Analysis (SLDA) gelang ihnen eine Unterscheidung zwischen Olivenpasten, die hochwertige Olivenöle der Kategorie „Nativ“ bzw. „Nativ extra“ liefern, und solchen, welche „Lampante“ Öle liefern. Als Indikatorsubstanzen dienten Essigsäure, Oktan, Toluol, E-2-Hexenal, Hexylacetat und 3-Methylbutanol. Auch in dieser Arbeit wurde lediglich zwischen den Qualitätsstufen „Lampante“ und „Nativ“ bzw. „Nativ extra“ unterschieden. Desweiteren

wurde bei der Auswahl der Indikatorsubstanzen deren tatsächlicher Einfluss auf das Olivenölaroma nicht berücksichtigt. Dies kann über die Bestimmung der einzelnen Odor Activity Values (OAV) geschehen. Liegt der OAV unter 1 hat der Aromastoff keinen Einfluss auf das Aroma. Im Fall von Toluol und Oktan dürfte ein tatsächlicher Einfluss auf das Aroma vermutlich nicht gegeben sein. Neben der Bestimmung des Aromaprofils mittels HS-SPME-GC setzten die Autoren auch eine elektronische Nase basierend auf Metalloxid-Sensoren (MOS) ein. Diese Sensoren reagieren mehr oder weniger selektiv auf verschiedene Substanzklassen und erlauben somit die Erstellung eines „Fingerabdrucks“ der Substanzen im Gasraum über der Probe. Da nicht genau ermittelt werden kann, welche Substanzen genau die jeweiligen Sensorsignale auslösen und in welchen Konzentrationen diese vorliegen, ist der tatsächliche Einfluss der zur Korrelation herangezogenen Variablen auf das Olivenölaroma nicht bestimmbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in der Literatur beschriebenen instrumentellen Methoden zur Aromaqualitätsbestimmung von Olivenöl häufig nur eine Unterscheidung zwischen Olivenölen der Kategorie „Nativ“ bzw. „Nativ extra“ und der Kategorie „Lampante“ erlauben und dass zum anderen der tatsächliche Einfluss der untersuchten Substanzen auf das Aroma nicht ermittelt wurde. Die aus wirtschaftlicher Sicht sehr interessante Unterscheidung zwischen den Kategorien „Nativ“ und „Nativ extra“ gestaltet sich sehr viel schwieriger, da die in den Olivenölen der Kategorie „Nativ“ auftretenden Aromafehler wesentlich weniger ausgeprägt sind und damit schwerer zu erfassen sind als in Olivenölen der Kategorie „Lampante“. Die Bestimmung des tatsächlichen Einflusses der zur Qualitätsbestimmung herangezogenen Verbindungen über das Aromawertkonzept stellt eine wichtige Voraussetzung für die Überprüfung der Allgemeingültigkeit des Vorhersagemodells dar. Daher sollte eine Qualitätsbestimmung von Olivenöl über die OAVs, berechnet über exakte Quantifizierungsdaten und den Geruchsschwellenwerten erfolgen. Über multivariate Analyseverfahren sollte eine Auswahl der wichtigsten flüchtigen Substanzen und eine Gewichtung dieser durchgeführt werden (10).

## **Korrelation der hydrophilen Phenole mit der Bitterkeit/Schärfe**

In der Literatur lassen sich zwei verschiedene Ansätze zur instrumentellen Bestimmung der Bitterkeit und Schärfe von Olivenölen finden. Der eine beruht auf der Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes und der andere auf der quantitativen Bestimmung von ausgewählten Verbindungen. Gutiérrez Rosales et al. beschreiben eine spektralphotometrische Methode zur Bestimmung der Bitterkeit von Olivenöl (61). Die Autoren bestimmten für 75 Olivenöle die Extinktion der durch Festphasenextraktion an einem C<sub>18</sub>-Material gewonnenen polaren Fraktionen bei  $\lambda=225$  nm, den sogenannten K<sub>225</sub>-Wert, und korrelierten diesen mit der sensorisch bestimmten Bitterkeit. Es ergab sich eine hochsignifikante lineare Korrelation. Andere Autoren wie Mateos et al. (53) und Beltrán et al. (52) nutzten diese Regression zur Bestimmung der Bitterkeit über den K<sub>225</sub>-Wert und korrelierten diesen mit dem über eine jeweils neuentwickelte Methode bestimmten Gesamtphenolgehalt. Eine Bestätigung der Korrelation zwischen dem K<sub>225</sub>-Wert und der sensorisch ermittelten Bitterkeit erfolgte nicht.

Gutiérrez et al. entwickelten eine HPLC-UV- (225 nm) Methode zur quantitativen Bestimmung der Bitterstoffe im Olivenöl (60). Die Autoren berechneten ein multiples lineares Regressionsmodell auf Basis der Peakflächen von vier Signalen. Allerdings wurden lediglich zehn verschiedene Olivenöle untersucht und die für die Regression herangezogenen Substanzen nicht identifiziert. Eine solide Validierung des Regressionsmodells erfolgte demnach nicht. In einer anderen Studie bestimmten Gutiérrez Rosales et al. die vier hydrophilen Phenole Oleuropeinaglycon (OA), Ligstrosidaglycon (LA), Decarboxymethyl-Oleuropeinaglycon (DOA) und Decarboxymethyl-Ligstrosidaglycon (DLA) quantitativ mittels einer HPLC-UV- (280 nm) Methode (63). Die Identifizierung der einzelnen Substanzen erfolgte schließlich mittels HPLC-MS. Die Quantifizierungsdaten von 20 Olivenölen wurden mit den Ergebnissen der sensorischen Bitterkeitsbestimmung korreliert. Die besten Korrelationen zeigten die hydrophilen Phenole DOA und DLA. Eine multivariate Korrelation aller Analysendaten mit der Bitterkeit fand nicht statt. Mateos et al. bestimmten die Gehalte von OA, LA, DOA und DLA mittels HPLC-UV (280 nm) in 46 Olivenölen (71). Die Autoren stellten Korrelationen zwischen den einzelnen Gehalten der hydrophilen Phenole und der Summe aus allen möglichen Kombinationen auf. Die

beste Korrelation ergab sich durch eine lineare Regression über den Gehalt an Oleuropein-Aglycon (OA). Auch Siliani et al. fanden bei ihren Untersuchungen die beste Korrelation zwischen dem OA-Gehalt und dem Bittergeschmack. Eine exponentielle Regression verbesserte in diesem Fall die Ergebnisse noch. Die widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien zeigen, dass der Einfluss der einzelnen hydrophilen Verbindungen im Olivenöl auf die Bitterkeit im Olivenöl noch nicht geklärt ist.

Bezüglich der Schärfe von Olivenöl gibt es nur wenige Untersuchungen. Andrews et al. untersuchten sensorisch verschiedene per HPLC gewonnene hydrophile Fraktionen aus Olivenöl (58). Sie fanden eine Fraktion mit einem stark wahrnehmbaren scharfen Geschmack und identifizierten in dieser Fraktion das Decarboxymethyl-Ligstrosidaglycon (DLA) als Scharfstoff mittels NMR. Eine Quantifizierung des DLA in mehreren Olivenölen mit unterschiedlich stark ausgeprägter Schärfe und eine Korrelation dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen der sensorischen Untersuchung erfolgte allerdings nicht.

## 2 Zielsetzung

Das primäre Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer instrumentellen Methode zur Qualitätsbeurteilung von Olivenöl. Dabei ging es vor allem um die Differenzierung zwischen Olivenölen der höchsten Kategorie „Nativ extra“ und solchen, die von einem Sensorikpanel schlechter eingestuft wurden. Dazu waren Messparameter für die Bestimmung sowohl von Fehleraromen als auch der Bestimmung der Fruchtigkeit der Olivenöle notwendig. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Methoden, sollte eine Methode entwickelt werden, welche auf der Analyse der tatsächlich für das Aroma von Olivenöl verantwortlichen Aromastoffe und nicht auf Indikatorverbindungen, welche eine Korrelation mit den Fehleraromen zeigen, beruht.

Zur Erreichung dieses Ziels sollten zunächst die für die Fehleraromen als auch die für das grün-fruchtige Aroma von Olivenöl verantwortlichen Aromastoffe identifiziert werden.

Anschließend sollten ausgewählte, für die Qualität von Olivenöl entscheidende Aromastoffe über eine empfindliche und präzise Analysenmethode quantitativ bestimmt werden. Da zur statistischen Absicherung und Validierung der Ergebnisse eine große Probenzahl untersucht werden sollte, galt für die Quantifizierungsmethode als weiteres Entwicklungsziel eine möglichst einfache und schnelle Durchführbarkeit. Über statistische Methoden der multivariaten Datenanalyse sollten die Quantifizierungsdaten zur Erstellung von Klassifizierungsmodelle zur Einordnung von Olivenölproben in die Kategorien „Nativ extra“ und „nicht Nativ extra“ genutzt werden.

Desweiteren sollte mit Hilfe der Quantifizierungsdaten ein Regressionsmodell zur Bestimmung der Fruchtigkeit von Olivenölen der Kategorie „Nativ extra“ berechnet werden.

Da eines der größten Defizite der Sensorik das Fehlen von definierten und in beliebiger Menge vorhandenen Standardölen darstellt, sollten auf Basis der ermittelten quantitativen Daten und der Erkenntnisse über die Bedeutung der einzelnen Aromastoffe für die Qualität von Olivenölen, Modellöle mit definierten Fehleraromen bzw. definierter Fruchtigkeit hergestellt und sensorisch untersucht werden.

Die Bitterkeit und Schärfe stellt ein weiteres Qualitätskriterium von Olivenöl dar. Auch zur Bestimmung dieser Parameter sollten objektive instrumentelle Methoden entwickelt werden. Dabei sollte zunächst der aus der Literatur bekannte Einsatz der schnellen und

einfachen Bestimmung des Summenparameters Gesamtphenolgehalt verfolgt werden. Da der Versuch auf diese Weise die Bitterkeit und Schärfe von Olivenöl vorherzusagen nicht erfolgreich war, wurde die Strategie auf die selektive Bestimmung der im Olivenöl enthaltenen Bitter- und Scharfstoffe geändert. Zur Verfolgung dieser Strategie sollte eine HPLC-MS-Profilierungsmethode entwickelt und die gefundenen Substanzen über statistische Methoden mit der sensorisch ermittelten Bitterkeit und Schärfe korreliert werden. Über die Gehalte der Substanzen, welche eine starke Korrelation mit der Bitterkeit bzw. Schärfe zeigen, sollten dann Regressionsmodelle zur Vorhersage der Bitterkeit bzw. Schärfe von Olivenölproben erstellt werden.

### **3 Ergebnis und Diskussion**

#### **3.1 Probenmaterial**

Als Probenmaterial für die Untersuchung der Aromastoffe standen 95 Olivenöle (Proben A1-95) aus dem Teilnehmerfeld des International Olive Oil Awards - Zurich aus den Jahren 2008 bis 2010 und für die Untersuchung der hydrophilen Bitter- und Scharfstoffe 54 Olivenöle (Proben B1-54) aus 2011 zur Verfügung. Die Herkunft der Olivenöle verteilt sich auf insgesamt 12 Nationen, wobei der größte Teil der Olivenöle aus den Hauptanbaugebieten Spanien, Italien und Griechenland stammt. Sämtliche Olivenöle wurden vom Schweizer Olivenöl Panel sensorisch untersucht. Die Ergebnisse der sensorischen Untersuchung sind in Tabelle A1 und Tabelle A3 im Anhang zusammengefasst. Die Qualität der Olivenöle erstreckt sich von sehr hochwertigen Olivenölen mit ausgeprägter Fruchtigkeit und Bitterkeit/Schärfe zu sehr schlechten Olivenölen mit deutlich auftretenden Fehleraromen. Bei den Ölen mit Aromafehler sind die häufigsten Fehleraromen ranzig, modrig-feucht und stichig-schlammig vertreten.

#### **3.2 Identifizierung wichtiger Aromastoffe per GC-O**

Als erster Schritt zur Entwicklung einer instrumentellen Methode zur Qualitätsbestimmung von Olivenölen mussten die für die Fehleraromen und für das grün-fruchtige Olivenölaroma verantwortlichen Verbindungen identifiziert werden. Zur Identifizierung der wichtigsten Aromastoffe im Olivenöl wurden die flüchtigen Verbindungen aus verschiedenen guten und schlechten Olivenölen mittels Hochvakuumdestillation isoliert. Die geruchsaktiven Verbindungen wurden mittels Gaschromatographie mit olfaktometrischer Detektion (GC-O) identifiziert und mittels Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion (GC-MS) nach Trennung auf zwei verschiedenen Kapillarsäulen charakterisiert. Drei typische Chromatogramme der GC-O mit den wahrgenommenen Geruchsqualitäten sind in Abbildung 7 dargestellt. Bei den

GC-O-Chromatogrammen a und b wurden Olivenöle mit Aromafehlern (modrig-feucht bzw. ranzig) untersucht, während Chromatogramm c das Aromaprofil eines fehlerfreien Olivenöls zeigt. Die GC-O-Chromatogramme zeigen große Unterschiede sowohl was die Peakverteilung angeht, als auch in den wahrgenommenen Geruchsqualitäten. Während der blattartige Geruch und der Geruch nach grünem Apfel in allen drei Olivenölen wahrgenommen wurde, sind in den fehlerhaften Olivenölproben (Chromatogramme a und b) vermehrt Aromaqualitäten wie stichig, schweißig, fettig oder phenolisch, welche als unangenehm empfunden werden, zu finden. Im Gegensatz dazu tritt in dem fehlerfreien Olivenöl (Chromatogramm c) ein Peak mit einem sehr intensiven Geruch nach frisch geschnittenem Gras auf.

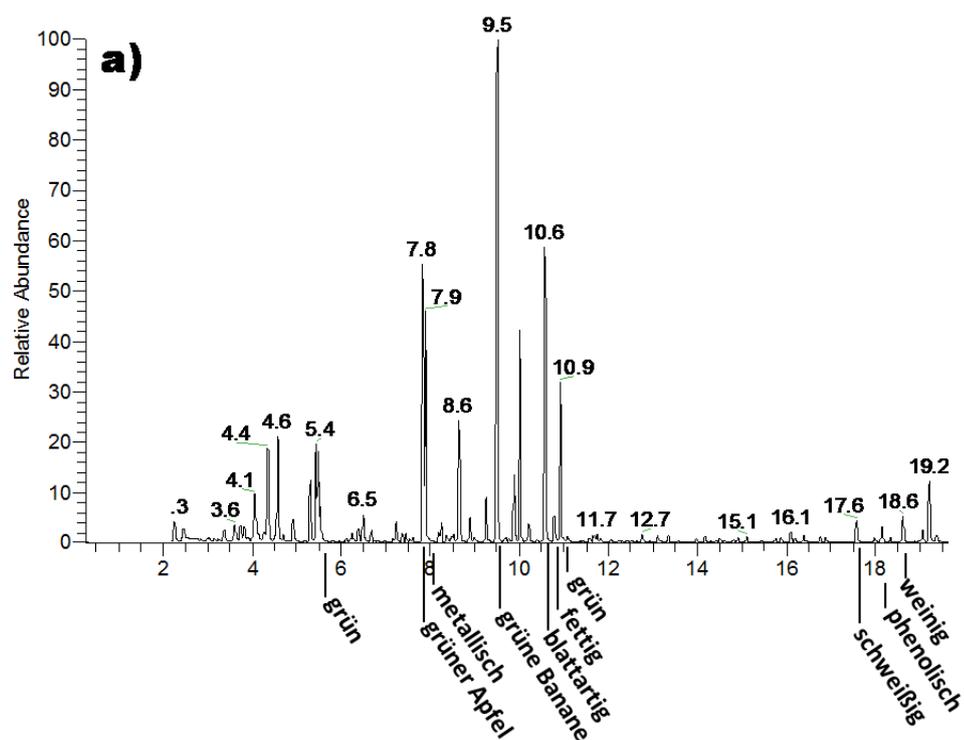


Abbildung 7a: GC-O-Chromatogramm. Olivenölprobe mit Aromafehler modrig-feucht.

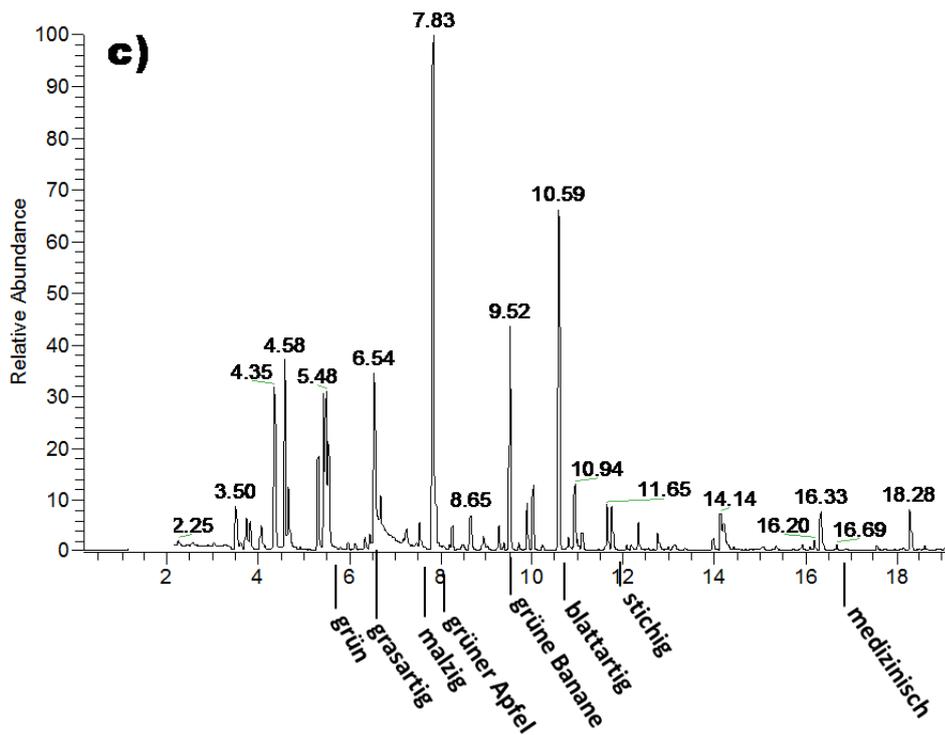
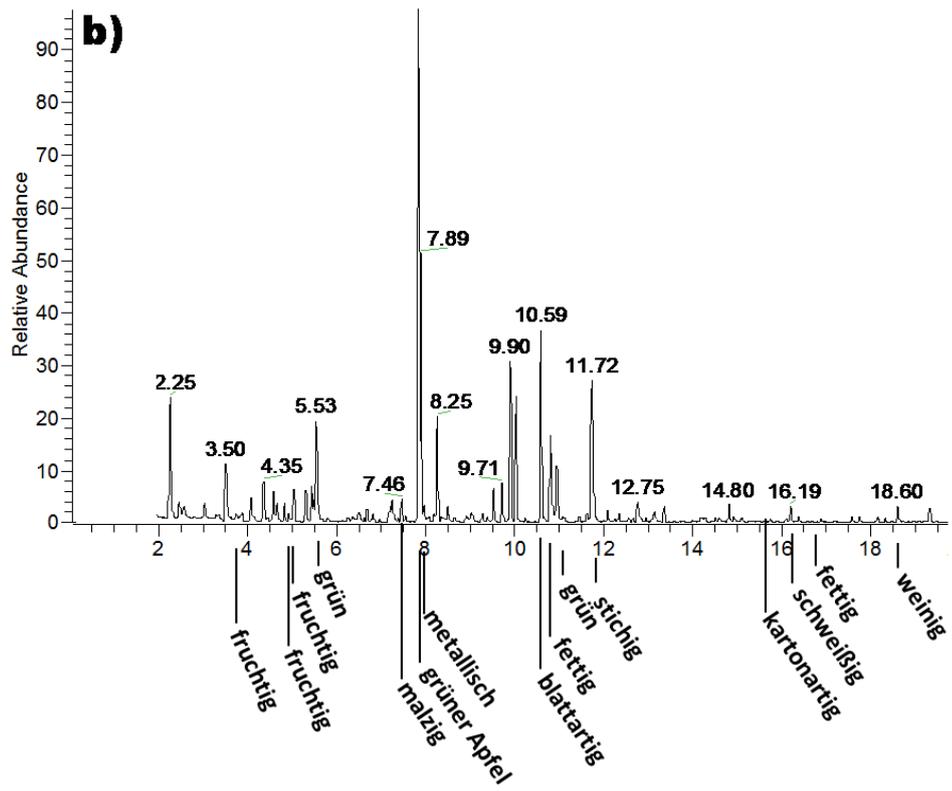


Abbildung 7 b und c: GC-O Chromatogramme.

Probe b: ranzig; Probe c: fehlerfrei.

Desweiteren verdeutlichen die Chromatogramme den großen Vorteil der GC-O, da mit dieser geruchsaktive Substanzen auch in sehr geringen Konzentrationen, welche nur ein sehr kleines Detektorsignal liefern und leicht im Rauschen untergehen können, detektiert werden können. Dies ist zum Beispiel bei den Peaks mit den Retentionszeiten 4,8 min bzw. 16,6 min im mittleren Chromatogramm der Fall. In der Detektor-Spur sind keine Peaks zu erkennen, aber am Sniffingport konnte ein deutlich wahrnehmbares fruchtiges bzw. fettiges Aroma wahrgenommen werden. Im Gegensatz dazu sind mehrere relativ starke Detektorsignale zu sehen, welche keinen Geruch am Sniffing-Port zeigten und keinen Einfluss auf das Olivenölaroma haben.

Die Identifizierung der aromaaktiven Substanzen erfolgte durch Vergleich der Retentionsindices auf zwei verschiedenen Kapillarsäulen (FFAP, OV-1701) und der EI-Massenspektren von Vergleichssubstanzen. Alle in den untersuchten Olivenölen gefundenen geruchsaktiven Verbindungen sind in Tabelle 1 aufgelistet. Sämtliche Peaks bis auf Peak Nr. 9 konnten über die Retentionsindices und die Massenspektren identifiziert werden.

**Tabelle 1: In Olivenöl identifizierte Aromastoffe**

Nr.	Geruchsqualität	Retentionsindex		Substanz <sup>a</sup>
		FFAP	OV1701	
1	fruchtig	982	813	Ethyl-isobutanoat
2	fruchtig	1063	907	Ethyl-2-methylbutanoat
3	fruchtig	1080	909	Ethyl-3-methylbutanoat
4	grün	1101	877	Hexanal
5	fruchtig	1135	939	3-Methylbutylacetat
6	grasartig	1160	886	Z-3-Hexenal
7	malzig	1218	840	3-Methylbutanol
8	grüner Apfel	1239	956	E-2-Hexenal
9	scharf	1246	1213	6,10-Dimethyl-1-undecen <sup>b</sup>
10	grüne Banane	1336	1076	Z-3-Hexenylacetat
11	blattartig	1397	965	Z-3-Hexenol
12	fettig	1409	1189	Nonanal
13	blattartig	1418	974	E-2-Hexenol
14	essigstichig	1468	799	Essigsäure
15	kartonartig	1547	1275	E-2-Nonenal
16	schweißig	1645	996	Buttersäure
17	fettig	1838	1452	E,E-2,4-Decadienal
18	schweißig	1863	1186	Hexansäure
19	medizinisch	1793	1299	Methylsalicylat
20	phenolisch	1872	1224	Guaiacol
21	weinartig	1941	1271	2-Phenylethanol
22	lösemittelartig	n.b.	n.b.	Aceton
23	Klebstoff	n.b.	n.b.	Ethylacetat
24	alkoholisch	n.b.	n.b.	Ethanol

**a Identifizierung über Retentionsindices und Massenspektrum;**

**b Identifiziert über Massenspektrum und <sup>1</sup>H-NMR; n.b. nicht bestimmt**

Zur Identifizierung der unbekanntes Substanz wurde diese aus dem Olivenöl isoliert und die Struktur mittels Massenspektroskopie und Kernresonanzspektroskopie aufgeklärt. Eine erste Abschätzung der Polarität der Substanz erfolgte anhand der Retentionsindices auf drei verschiedenen gaschromatographischen Trennsäulen ( $RI_{FFAP}=1246$ ,  $RI_{OV-1701}=1213$  und  $RI_{DB-5}=1205$ ). Die Retentionsindices unterscheiden sich trotz der starken Polaritätsunterschiede der Trennphasen (Polarität:  $FFAP > OV-1701 > DB-5$ ) kaum, was auf eine unpolare Substanz schließen lässt.

Tatsächlich befand sich die unbekannte Substanz nach einer Säulenchromatographie an Kieselgel eines Vakuumdestillats von Olivenöl in der unpolarsten Fraktion (Elution mit 100% Pentan). Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels präparativer Gaschromatographie, so dass die unbekannte Substanz in reiner Form gewonnen werden konnte. Die isolierte Substanz wurde mittels Protonen-Kernresonanzspektroskopie (<sup>1</sup>H-NMR) und Massenspektroskopie (Elektronenstoß- (EI) und chemische Ionisation (CI)) untersucht. Abbildung 8 zeigt die Resultate der spektroskopischen Untersuchungen. Über das CI-Massenspektrum lässt sich das Molekulargewicht anhand der Masse des schwersten registrierten Ions [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 183 auf 182 amu bestimmen. Anhand des Verhältnisses der Intensitäten des Quasimolekülionensignals (*m/z* 183) und des <sup>13</sup>C-Isotopenpeaks (*m/z* 184) lässt sich die Anzahl der im Molekül enthaltenen Kohlenstoffatome über die Häufigkeit des <sup>13</sup>C-Isotops von 1,1 % abschätzen.

$$\text{Anzahl C - Atome} = \frac{\text{Intensität}(m/z = 184)}{\text{Intensität}(m/z = 183)} \times \frac{1}{0,011}$$

Über die Intensitäten von 100 % für *m/z* 183 und 13 % für *m/z* 184 ergibt sich, unter Berücksichtigung des relativen Messfehlers von 10%, über die Formel eine Kohlenstoffatomanzahl von 11 bis 13 in dem Molekül. Auf Grund der geringen Polarität der Substanz handelt es sich vermutlich um einen Kohlenwasserstoff. Aus der Molekülmasse von 182 amu erhält man die Summenformel C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>. Das Fragmentierungsmuster des EI-Spektrums lässt auf ein verzweigtes ungesättigtes Alkan schließen. Ersteres ist an der hohen Intensität des Signals bei *m/z* 97 zu erkennen, welche auf eine hohe Stabilität des Fragmentes auf Grund einer Ladungsstabilisierung an einem sekundären Kohlenstoffatom hindeutet. Auf eine Doppelbindung im Molekül lässt das Auftreten von zwei um eine Masseneinheit verschobene Alkylkettenzerfallsreihen (*m/z* 126, 112, 98, 84, 70, 56 bzw. 111, 97, 83, 69, 55) schließen. Diese Beobachtungen decken sich mit den bestimmten Retentionsindices. Die Substanz mit 13 Kohlenstoffatomen weist einen RI-Wert von 1205 auf der DB-5 auf, was nur durch das Vorhandensein von zwei Methylverzweigungen möglich ist. Methylverzweigungen tragen im Gegensatz zu Methylengruppen innerhalb der Kohlenstoffkette lediglich 50 Einheiten anstatt 100 Einheiten zum RI-Wert bei. Der auf den polarerer Phasen (FFAP, OV-1701) höhere RI-Wert weist zudem auf eine

Doppelbindung im Molekül hin. Mit Hilfe der Verschiebungen im  $^1\text{H-NMR}$  konnte die Lage der Doppelbindung bestimmt werden. Das Multiplett bei 5,8 ppm und die beiden Dupletts bei 4,9 ppm und 5,0 ppm deuten eindeutig auf eine terminale Doppelbindung hin. Das Signal der beiden Protonen bei 2,3 ppm zeigt außerdem, dass eine Methylverzweigung frühestens an Position 4 im Molekül vorhanden sein kann. Die Interpretation aller spektroskopischen Daten ergab, dass es sich bei der unbekannt Substanz um das 6,10-Dimethyl-1-undecen handelte. Zur Überprüfung wurde die Substanz synthetisiert und massenspektroskopisch und mittels  $^1\text{H-NMR}$  charakterisiert. Es ergab sich volle Übereinstimmung mit der unbekannt Substanz. Das 6,10-dimethyl-1-undecen wurde bereits von Lanzón et al. (72) im Olivenöl identifiziert. Allerdings erfolgte die Strukturaufklärung lediglich anhand von Massenspektren diverser Derivate und nicht mittels  $^1\text{H-NMR}$ . Auch eine Synthese der Substanz zur Überprüfung der Identität wurde nicht vorgenommen.

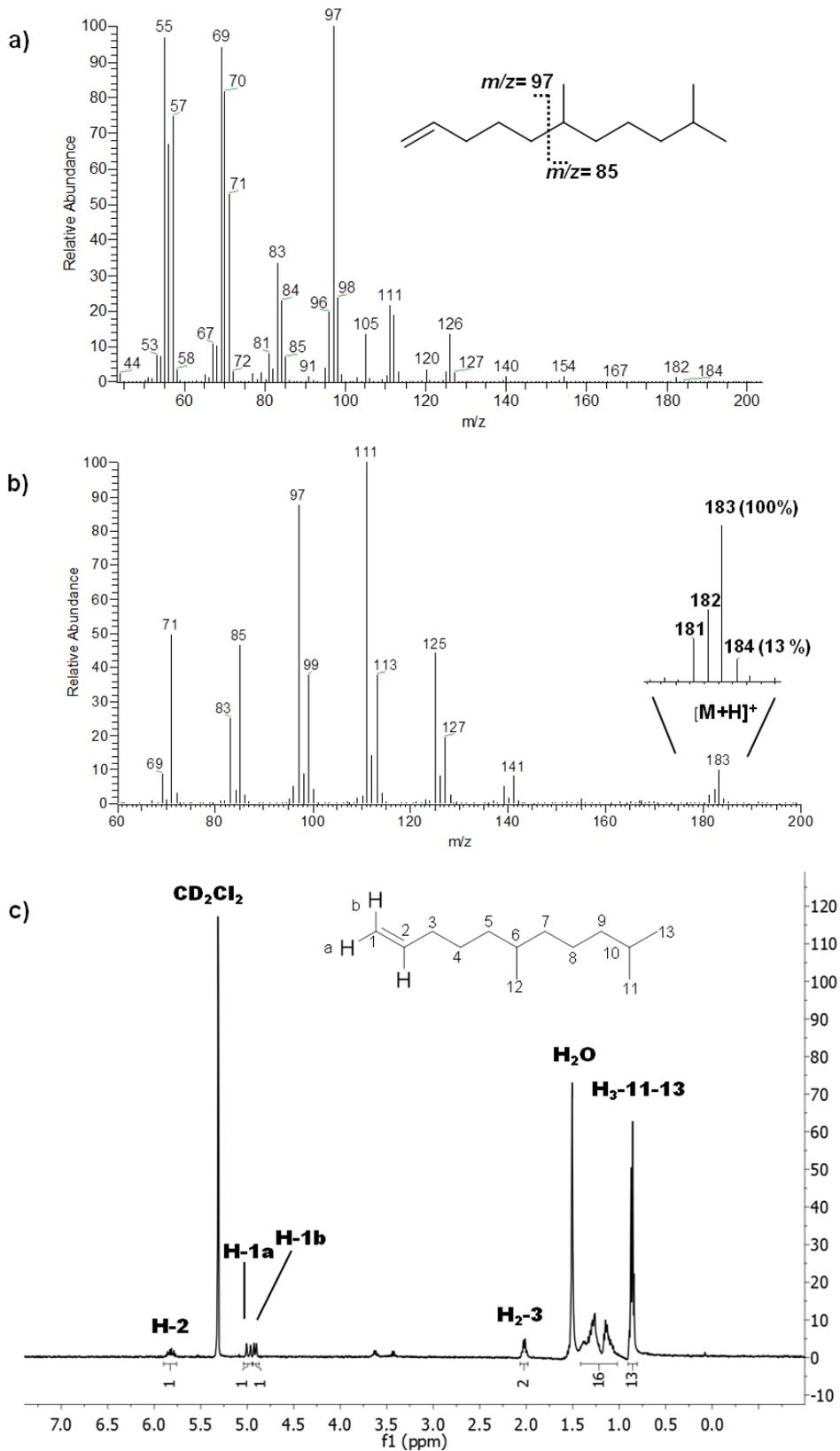


Abbildung 8: Spektroskopische Identifizierung von Substanz 9

a EI-Massenspektrum 70 eV ; b CI-Massenspektrum CH<sub>4</sub>; c <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 400 MHz

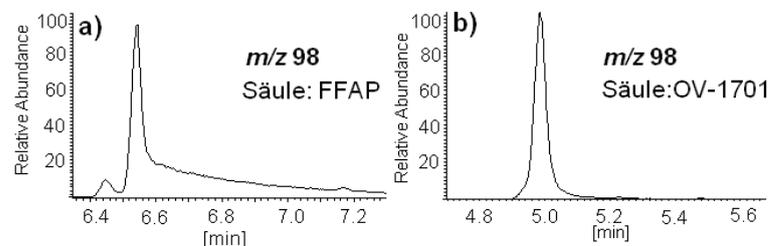
Sämtliche identifizierte Substanzen wurden bereits früher in anderen Arbeiten in Olivenöl gefunden. Unter den identifizierten Verbindungen sind die aus dem Lipoxygenaseweg stammenden grün riechenden Verbindungen Z-3-Hexenal, E-2-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol. Essigsäure und 3-Methylbutanol wurden von Morales et al. unter anderem in Olivenöl mit dem Aromafehler essigsauer-weinartig gefunden. Die Aromastoffe Hexanal, Nonanal, Hexansäure und E,E-2,4-Decadienal wurden von denselben Autoren in hohen Konzentrationen in ranzigem Olivenöl nachgewiesen (24). Guaiacol wurde von Vichi et al. in Olivenölen mit dem Aromafehlern modrig-feucht und stichig-schlammig identifiziert (73). Die Ester Ethylisobutanoat, 2-Methylbutanoat und 3-Methylbutanoat wurden von Reiners und Grosch in Olivenölen mit unterschiedlichen Aromaprofilen nachgewiesen (41). Es sind also sowohl Aromastoffe vertreten, welche für das gewünschte grün-fruchtige natürliche Aroma von Olivenöl stehen sollten, als auch solche, welche für die verschiedenen Fehlparfums verantwortlich sein sollten. Eine Qualitätsbewertung von Olivenölen über die Konzentrationsverhältnisse dieser Aromastoffe sollte demnach möglich sein.

### **3.3 Quantifizierung wichtiger Aromastoffe**

An die Quantifizierungsmethode wurden besondere Anforderungen gestellt. Zum einen musste die Methode alle wichtigen Aromastoffe aus den verschiedenen Stoffklassen (Aldehyde, Alkohole, Carbonsäuren, Ester und Kohlenwasserstoffe) simultan in Konzentrationsbereichen von wenigen  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bis hin zu mehreren  $\text{mg}/\text{kg}$  erfassen können und zum anderen musste die Methode auf Grund der hohen Probenzahl möglichst schnell und leicht durchführbar sein. Die Methode der Wahl war in diesem Fall die Solid Phase Microextraction aus dem Gasraum (HS-SPME) über dem Öl unter Verwendung von stabilisotopenmarkierten internen Standards. Die HS-SPME bietet den Vorteil einer sehr einfachen Probenvorbereitung und bei Verwendung einer Extraktionsphase aus drei Komponenten (PDMS/DVB/Carboxen) werden flüchtige Verbindungen über den gesamten Polaritätsbereich angereichert (47). Durch die Verwendung von stabilisotopenmarkierten Standards werden Probleme mit der Reproduzierbarkeit durch schwankende Wiederfindungsraten kompensiert, da sich die

markierten Standards auf Grund der großen chemischen Ähnlichkeit während der Extraktion und Desorption, abgesehen von vernachlässigbaren Isotopeneffekten, genauso verhalten wie die Analyten selbst (74). In der Literatur beschriebene Untersuchungen ergaben für die Anreicherung der flüchtigen Analyten an der SPME-Faser eine optimale Zeitspanne von 30 min und eine Proben temperatur von 40 °C (46). Diese Parameter wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen übernommen. Neben den in Tabelle 1 aufgelisteten Aromastoffen wurden noch die leichtflüchtigen Verbindungen Aceton, Ethylacetat und Ethanol quantitativ bestimmt, da diese in der Literatur als Indikatorsubstanzen für die Olivenölqualität beschrieben wurden (34, 43). Diese lassen sich auf Grund ihrer hohen Flüchtigkeit mittels HS-SPME nur schwer bestimmen und wurden daher mittels dynamischer Headspace quantitativ erfasst.

Als gaschromatographische Trennsäule wurde eine Kapillarsäule mit einer sehr polaren Trennschicht (Free Fatty Acids Phase, FFAP) verwendet. FFAP-Säulen zeigen auf Grund ihrer hohen Polarität gute Trenneigenschaften für die polaren Aromastoffe und Dank der freien Nitroterephthalsäuregruppen weisen auch freie Carbonsäuren gute Peakformen auf. So konnten auf dieser Phase für eine Quantifizierung hinreichend gute Peakformen und Trennungen für alle Substanzen bis auf das Z-3-Hexenal erreicht werden. Z-3-Hexenal zeigt auf einer FFAP-Säule vermutlich auf Grund von auftretender Keto-Enol-Tautomerie ein starkes Tailing (Abb. 9a), welches zu Problemen bei der Integration und damit zu einem größeren Analysenfehler führt. Diese Probleme können durch Verwendung einer Trennsäule mit einer Trennschicht aus Cyanopropylgruppen (OV-1701) vermieden werden, da auf dieser das Z-3-Hexenal eine gute Peakform (Abb. 9b) zeigt.



**Abbildung 9: Peakformen vom Z-3-Hexenal auf a) einer FFAP-Säule und b) auf einer OV-1701-Säule**

Auf einer OV-1701 ist eine Basislinientrennung nicht für alle Analyten gegeben und die Peakformen der Carbonsäuren sind sehr schlecht. Daher wurde Z-3-Hexenal separat auf einer OV-1701 Trennsäule bestimmt. Die Analyten 6,10-Dimethyl-1-undecen, Guaiacol und Methylsalicylat wurden zusammen mit Z-3-Hexenal bestimmt, da die Relevanz dieser Verbindungen erst nach Abschluss der Untersuchungen mit der FFAP-Säule erkannt wurde.

Die Detektion der Analyten erfolgte mittels eines massenselektiven Detektors. Damit eine Unterscheidung zwischen den Analyten und den stabilisotopenmarkierten Standards möglich ist, müssen für die Auswertung die Molekülmassen oder Massenspuren von Fragmenten, welche die Markierung beinhalten, ausgewählt werden. Dies war im Elektronenstoßionisations-Modus (EI) für die Ethylester [1-3] auf Grund der starken Fragmentierung nicht möglich. Die Markierung wurde bei diesen Analyten durch Veresterung der jeweiligen Carbonsäure mit [<sup>2</sup>H]<sub>3</sub>-Ethanol realisiert. Der Ethanolrest wird bei der Ionisierung allerdings sehr leicht abgespalten, wodurch der Molekülionenpeak in den EI-Massenspektren der Ethylester nicht beobachtet wurde. Da die Markierung mit der Ethanolgruppe verloren geht, kann die markierte Substanz im EI-Modus nicht vom unmarkierten Analyten unterschieden werden. Auch bei den Aldehyden Hexanal und Nonanal führte die harte Ionisierung im EI-Modus zu einer starken Fragmentierung, wodurch der Molekülionenpeak nur sehr schwach auftrat und viele Massensignale sowohl im Massenspektrum der markierten als auch im Massenspektrum der unmarkierten Substanz auftraten. Um diese Probleme zu umgehen, wurde die Quantifizierung der Substanzen [1-5, 7-8, 10-18, 21] im chemischen Ionisations-Modus (CI) mit Methan als Reaktandgas durchgeführt. Durch die weiche Ionisation kommt es zu weniger Fragmentierungsreaktionen der Molekülionen in der Ionenquelle. Daher konnten für die meisten dieser Analyten die Quasimolekülionen [M+H]<sup>+</sup> zur Quantifizierung herangezogen werden. Die chemische Ionisation bietet den Vorteil der geringen Fragmentierung und verbunden mit der Nutzung der Molekülionenmasse den Vorteil einer höheren Selektivität. Allerdings gehen diese Vorteile mit einer auf Grund der schlechteren Ionenausbeute geringeren Empfindlichkeit und einer geringeren Robustheit der Methode einher. Deshalb wurden die Analyten [6, 9, 19, 20, 22-24], bei welchen die oben geschilderten Probleme nicht auftraten, im EI-Modus bestimmt.

Die Quantifizierungsdaten für alle 24 Analyten sind in Tabelle A2 des Anhangs dargestellt. Auf Grund der hohen Probenzahl von 95 verschiedenen Olivenölen und der Tatsache, dass drei verschiedene Analysenmethoden zur Quantifizierung aller 24 Analyten verwendet wurden, konnte jeweils lediglich eine Einfachbestimmung durchgeführt werden. Zur Überprüfung, ob die Unterschiede in den Quantifizierungsergebnissen ggf. nur auf den Analysenfehler zurückzuführen sind bzw. dieser größer ist als die Varianz innerhalb der Quantifizierungsdaten und damit eine Aussage über den Einfluss der einzelnen Aromastoffe auf die Ölqualität nicht möglich ist, wurden durch eine Dreifachbestimmung von drei verschiedenen Olivenölproben die mittleren Variationskoeffizienten bestimmt. In Tabelle 2 sind die mittleren Variationskoeffizienten für die 24 Analyten aufgelistet. Über die mittleren Variationskoeffizienten lässt sich der Fehler der Analysenergebnisse abschätzen. Der Fehler der Quantifizierungsergebnisse liegt somit bei 10-30 % und ist damit im Vergleich zu den Unterschieden in den Konzentrationen zwischen den Olivenölproben, welche teilweise Faktor 10 und mehr betragen, zu vernachlässigen. Der größte Anteil des Fehlers kommt sicherlich durch den Volumenfehler beim Zusetzen von 1 µl interner Standardlösung zustande. Eine Erhöhung des Volumens der zugesetzten internen Standardlösung würde den Volumenfehler sicherlich reduzieren, allerdings sollte die zugesetzte Menge an Pentan möglichst klein gehalten werden, da die Pentandämpfe die SPME-Phasen zum Aufquellen bringen und diese somit beschädigen. Weitere Fehlerquellen stellen Integrationsfehler und schlussendlich der Messfehler des Massenspektrometers selber dar.

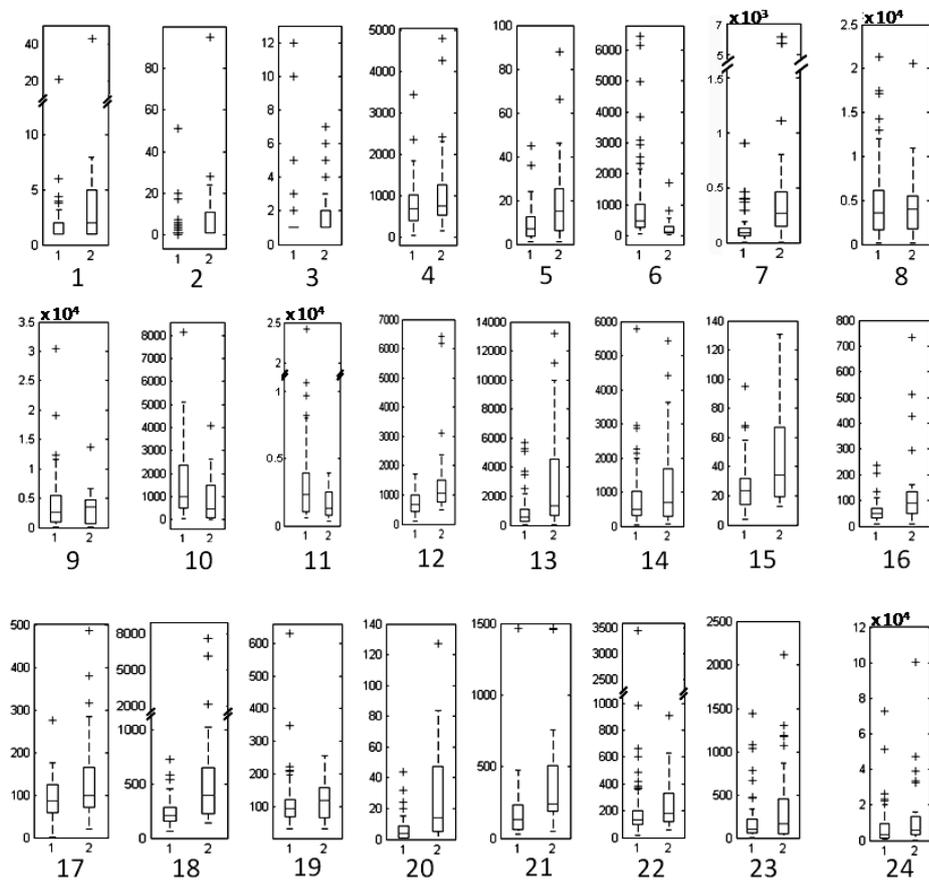
**Tabelle 2: Mittlere Variationskoeffizienten für die Bestimmung der Aromastoffe**

Substanz	$\overline{VarK}^a$	Substanz	$\overline{VarK}^a$
Ethyl-isobutanoat	12	E-2-Hexenol	13
Ethyl-2-Methylbutanoat	14	Essigsäure	12
Ethyl-3-Methylbutanoat	8	E-2-Nonenal	17
Hexanal	11	Buttersäure	28
3-Methylbutylacetat	10	E,E-2,4-Decadienal	14
Z-3-Hexenal	13	Hexansäure	12
3-Methylbutanol	13	Guaiacol	18
E-2-Hexenal	12	Methylsalicylat	11
6,10-Dimethyl-1-undecen	21	2-Phenylethanol	14
Z-3-Hexenzlactat	11	Aceton	12
Z-3-Hexenol	10	Ethylacetat	9
Nonanal	16	Ethanol	11

**a Berechnung siehe Kapitel Material und Methoden**

Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Daten gruppiert nach Olivenölen der Kategorie „Nativ extra“ (1) und solchen schlechterer Qualität (2) in Form von Boxplots in Abbildung 10 dargestellt. Sämtliche Aromastoffe konnten in allen Ölen der beiden Kategorien gefunden werden. So beinhalten die Öle der Kategorie „Nativ extra“ auch die Aromastoffe mit negativen Aromaqualitäten und die Aromastoffe mit positiven Aromaqualitäten sind auch in den Olivenölen schlechterer Qualität zu finden. Es sind allerdings große Unterschiede in den Konzentrationen zwischen den beiden Gruppen zu erkennen. So weisen die Olivenöle der Kategorie „Nativ extra“ höhere Konzentrationen an den grün riechenden Aromastoffen aus dem Lipoxygenaseweg auf. Besonders hervorzuheben ist hier das Z-3-Hexenal, welches in den fehlerfreien Olivenölen in wesentlich höheren Konzentrationen vorkommt. Die fehlerhaften Olivenöle weisen dagegen erhöhte Konzentrationen an den mit negativen Attributen assoziierten Aromastoffen wie E,E-2,4-Decadienal oder Guaiacol auf. Insgesamt gesehen weisen alle Öle die höchsten Konzentrationen an den Aromastoffen E-2-Hexenal, Z-3-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol aus dem Lipoxygenaseweg auf, wobei das E-2-Hexenal im Mittel die höchsten Konzentrationen erreicht. Die gefundenen Konzentrationsbereiche der einzelnen Aromastoffe stimmen größenordnungsmäßig gut

mit den von Guth und Grosch (75) bzw. Reiners und Grosch (41) bestimmten Konzentrationen überein.

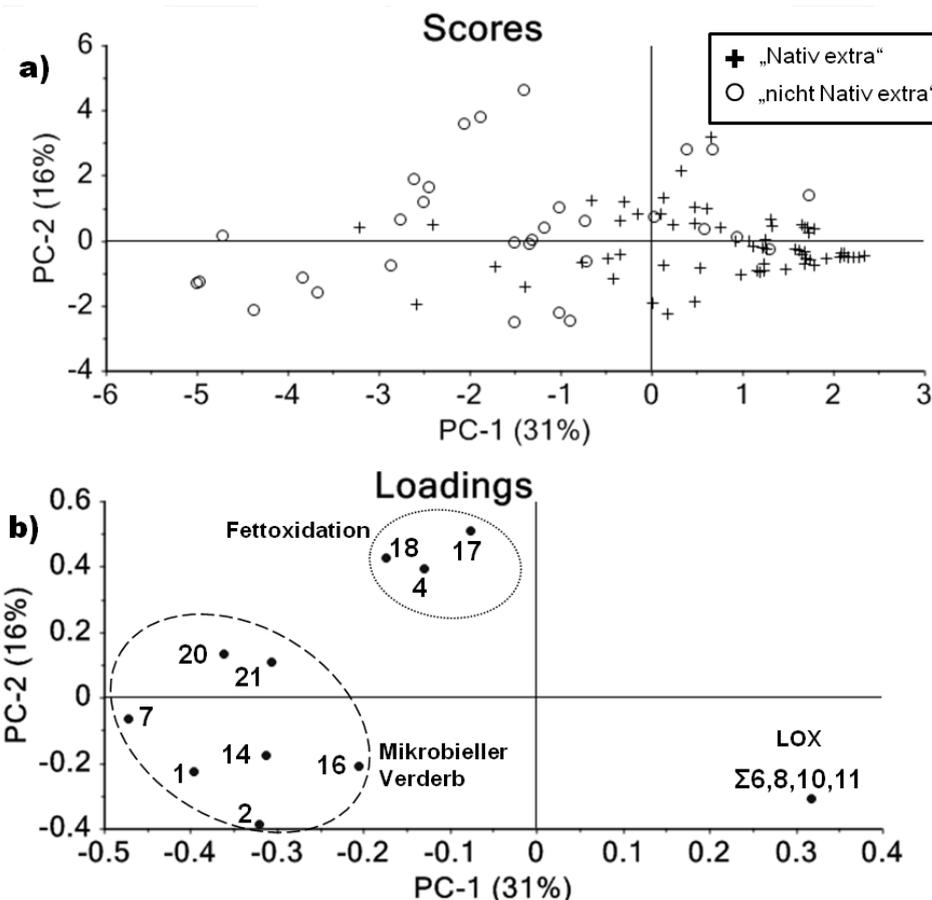


**Abbildung 10: Boxplots der Quantifizierungsdaten der 24 Analyten**

**Nummerierung der Analyten wie in Tabelle 1 angegeben. Alle Konzentrationen in  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .**

### 3.4 Korrelation der Analysendaten mit der Sensorik

Zur besseren Erkennung von Zusammenhängen und Mustern innerhalb der Quantifizierungsdaten wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Abbildung 11 zeigt den Scores- (a) und den Loadings-Plot (b). Bereits auf der ersten Hauptkomponente (PC1) ist eine Trennung der Olivenöle „Nativ extra“ (negativer Bereich der PC1-Achse) von den fehlerhaften Ölen (positiver Bereich der PC1-Achse) im Scores-Plot zu erkennen. Die Trennung beruht, wie im Loadings-Plot zu erkennen ist, im Wesentlichen auf den unterschiedlichen Gehalten der Öle an den Substanzen aus dem Lipoxygenaseweg (negativer Bereich) und den Aromastoffen, welche aus den verschiedenen Verderbnisreaktionen stammen (positiver Bereich). 6,10-Dimethyl-1-undecen und Methylsalicylat liegen nahe dem Koordinatenursprung und zeigen somit keine Korrelation mit der Olivenölqualität. Unterschiede in der Konzentration vom 6,10-Dimethyl-1-undecen innerhalb der Olivenölproben beruhen vermutlich auf Unterschieden in den Ursprungsregionen, da ein Differenzieren der Herkunft über das Kohlenwasserstoffmuster möglich ist (76). Die gleichen Überlegungen könnten auch auf das Methylsalicylat zutreffen. Über die zweite Hauptkomponente (PC2) erfolgt eine Trennung der Aromafehler verursachenden Substanzen nach ihrem Ursprung. So sind die aus der Fettoxidation stammenden Aldehyde Hexanal, E-2-Nonenal und E,E-2,4-Decadienal sowie Buttersäure und Hexansäure im Loadings-Plot positiv mit PC2 korreliert und befinden sich somit im positiven Bereich der PC2-Achse. Die Substanzen, wie z.B. 3-Methylbutanol, Ethyl-2-methylbutanoat, Essigsäure und 2-Phenylethanol, welche während eines mikrobiellen Verderbs entstehen, sind negativ mit PC2 korreliert und befinden sich somit im negativen Teil der PC2-Achse. Dementsprechend weisen Olivenöle, welche im Laufe einer Fettoxidation Aromafehler ausgebildet haben, positive Scoreswerte für PC2 auf. Die Olivenöle, welche durch mikrobiellen Befall der Oliven vor der Pressung Aromafehler verursachende Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen enthalten, weisen negative Scoreswerte für PC2 auf.



**Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse der Quantifizierungsdaten der 24 Aromastoffe**  
**a Scores-Plot; b Loadings-Plot**

Da für die Entwicklung des Klassifizierungsmodells ein sehr inhomogener Probenpool, Olivenöle aus verschiedenen Ländern, Olivensorten und Jahrgängen, verwendet wurde, wurde über das berechnete PCA-Modell überprüft, ob Unterschiede im Quantifizierungsdatensatz auf Grund dieser Einflussfaktoren zu finden sind. Wäre dies der Fall müsste ggf. eine Normierung der Daten oder eine separate Berechnung der Klassifizierungsmodelle für die Olivenöle getrennt, zum Beispiel nach dem Herkunftsland der Olivenöle, erfolgen. Abbildung 12 zeigt den Scores-Plot, wobei die Proben diesmal nach dem Herkunftsland (a) bzw. nach dem Jahrgang (b) gruppiert wurden. Bei der Betrachtung der Herkunftsländer wurden nur die Hauptanbauregionen Spanien, Italien und Griechenland berücksichtigt, da aus den anderen Anbauländer nur jeweils eine geringe Anzahl an Proben zur Verfügung stand. Für eine Betrachtung der

Olivensorte war die Anzahl der verschiedenen Sorten zu groß und die Anzahl der Olivenöle aus derselben Sorte zu gering. Außerdem handelte es sich bei vielen Olivenölen um Mischungen aus verschiedenen Olivensorten. Sowohl bei der Betrachtung des Herkunftslandes als auch beim Jahrgang ist keine Bildung von Clustern zu erkennen, so dass die Herkunft und das Herstellungsjahr keinen erkennbaren Einfluss auf die Aromastoffzusammensetzung der untersuchten Olivenölproben haben. Die Entwicklung eines Klassifizierungsmodells ist also über alle Olivenölproben möglich.

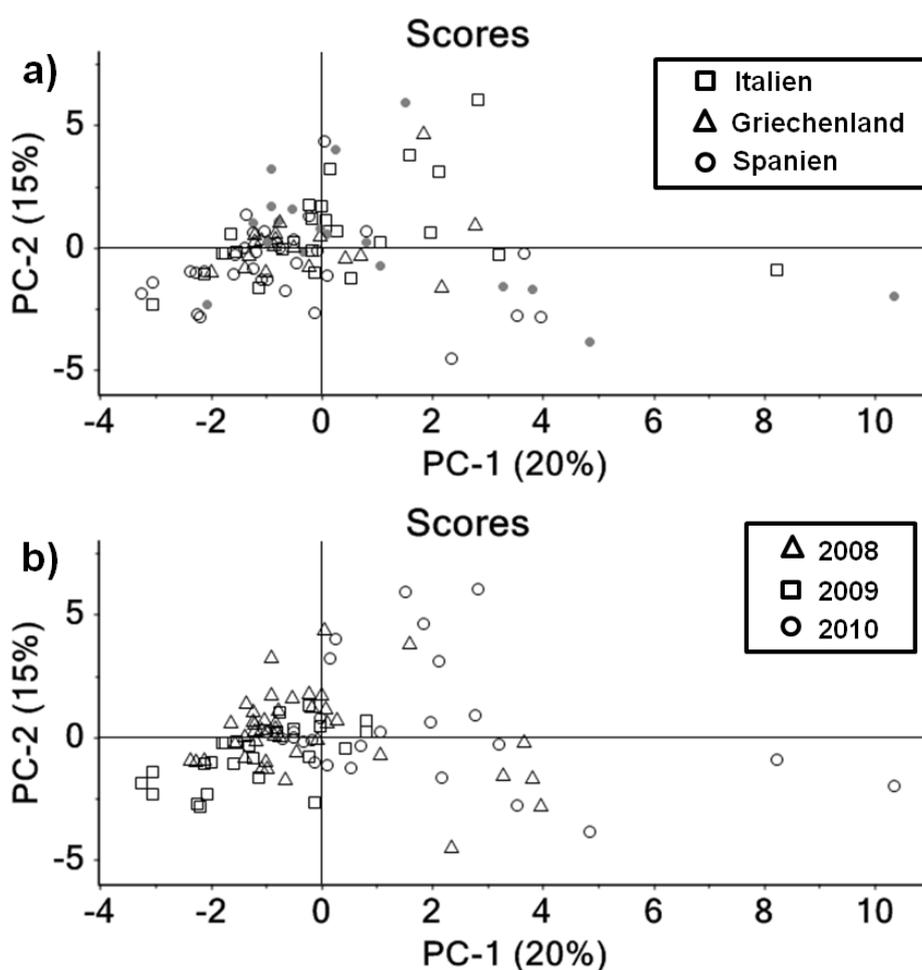


Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse der Quantifizierungsdaten der 24 Aromastoffe  
a Scores-Plot, Proben sortiert nach Herkunftsland; b Scores-Plot, Proben sortiert nach Jahrgang

Eine Trennung zwischen den Qualitätsklassen scheint wie bereits erwähnt durch die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) möglich zu sein. Allerdings erklären die beiden Hauptkomponenten zusammen lediglich 35 % (PC1 20%; PC2 15%) der Gesamtvarianz. In den Daten steckt also noch sehr viel andere Information, welche für das eigentliche Klassifizierungsproblem keinen Beitrag leistet und vielmehr bei der Validierung des Klassifizierungsmodells zu Problemen führen kann.

Zur Erstellung eines ersten Klassifizierungsmodells wurde eine PLS-DA unter Verwendung sämtlicher Quantifizierungsdaten durchgeführt. Lediglich die Daten von 6,10-Dimethyl-1-undecen und Methylsalicylat wurden nicht berücksichtigt, da die PCA gezeigt hatte, dass die Konzentrationen dieser Substanzen keine Korrelation mit der Olivenölqualität zeigt. Als Zielgröße für die PLS-DA diente die Qualitätseinstufung des Sensorikteams in die Kategorien „Nativ extra“ und „nicht Nativ extra“ (weil fehlerhaft). Da die PLS-DA als Zielgröße nur numerische Variablen verarbeiten kann, wurden die beiden Kategorien in einen binären Zahlencode transformiert. Die Olivenölproben der Klasse „Nativ extra“ wurden mit dem Wert 1 und die vom Sensorikteam als fehlerhaft eingestuften Olivenöle mit dem Wert -1 codiert. Die Validierung der PLS-DA erfolgte über eine Kreuzvalidierung. Dazu wurde der gesamte Probensatz über einen Zufallsgenerator in drei Gruppen eingeteilt. Zwei Gruppen (66 % der Proben) wurden jeweils zur Kalibrierung verwendet und die dritte Gruppe (33 % der Proben) wurde zur Validierung verwendet. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, so dass jede Gruppe einmal als Validierset diente. Abbildung 13 und Tabelle 3 zeigen die Ergebnisse der Klassifizierung über das berechnete Modell. Lediglich 83 % der Olivenöle wurden durch das Modell in dieselbe Kategorie wie durch die Sensorik eingeordnet. Auffällig ist, dass fast alle Fehlklassifizierungen (14 von 16) in der Gruppe der von der Sensorik als fehlerhaft eingestuften Olivenöle erfolgten. Dies liegt vermutlich daran, dass Olivenöle mit sehr stark ausgeprägten Aromafehlern und damit hohen Konzentrationen an den die Aromafehler verursachenden aromaaktiven Substanzen dieselbe Kodierung wie Olivenöle mit schwachen Aromafehlern und damit geringeren Konzentrationen an den jeweiligen Aromastoffen zugewiesen bekommen. Dadurch wird die Klasse sehr inhomogen und die Olivenöle mit schwachem Fehleroma ähneln mehr den fehlerfreien Ölen als den Olivenölen mit stark ausgeprägten Aromafehlern und so kommt es zu einer Einordnung dieser Olivenölproben in die falsche Kategorie. Ein weiteres Problem stellt

die schlechte Validierung des Klassifizierungsmodells (vergl. Abb. 14) dar. Bei einem robusten Modell mit einer guten Validierung sollte die über die Hauptkomponenten im Validierset erklärte Varianz (schwarze Balken) parallel zur erklärten Varianz im Kalibrierset ansteigen (graue Balken). Dies ist bei diesem Modell nicht der Fall und deutet auf im Kalibrierset zu viel enthaltene für das Klassifizierungsproblem nicht relevante Information (sogenanntes Rauschen) hin. Dies führt dazu, dass die Klassifizierung unbekannter Proben, also solcher, welche nicht für die Kalibrierung verwendet wurden, stark fehlerbehaftet erfolgt.

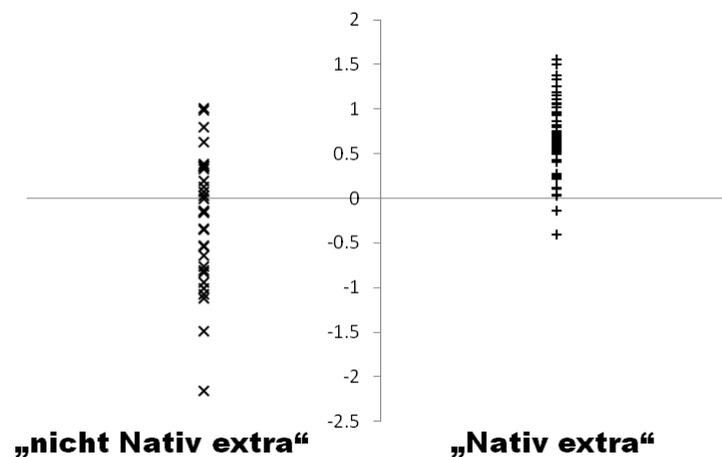
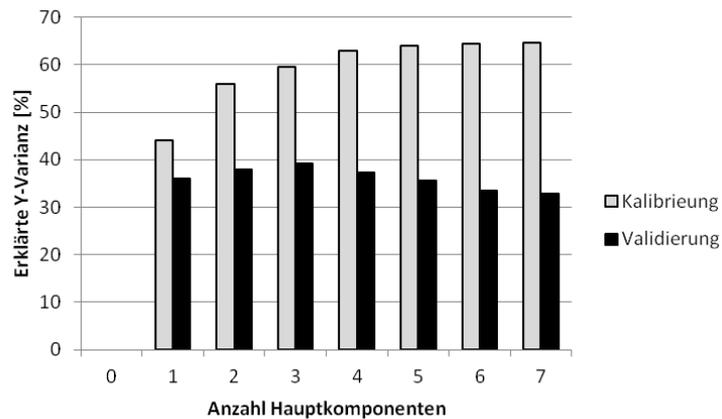


Abbildung 13: Ergebnisse Kreuzvalidierung (66% der Proben für Kalibrierung und 33% für Validierung). Zielgröße: „Nativ extra“ 1; „nicht Nativ extra“ -1

Tabelle 3: Ergebnisse Klassifizierung

Ergebnis Sensorik	Vorhersage Klassifizierungsmodell	
	„Nativ extra“	„nicht Nativ extra“
„Nativ extra“	62	2
„nicht Nativ extra“	14	17



**Abbildung 14: Erklärter Anteil an der Y-Varianz durch die Hauptkomponenten PC1 bis PC7**

Zur Verbesserung der Klassifizierungsrate und zur Erzielung eines robusten Klassifizierungsmodells, welches einer Validierung hinreichend stand hält, müsste das Rauschen aus dem Datensatz „herausgefiltert“ werden und der Einfluss von extremen Proben durch ein Normierungsverfahren gemindert werden.

Zur Verringerung des Rauschens sollten nur die Aromastoffe als Variablen herangezogen werden, welche tatsächlich als Urheber der Fehleraromen zu sehen sind. Die Aromastoffe, welche nur als Begleitsubstanzen auftreten und mit den Aromafehlern lediglich eine Korrelation zeigen, sollten nicht berücksichtigt werden. Um die tatsächliche Relevanz der einzelnen Aromastoffe auf das Olivenölaroma zu berücksichtigen, wurden für sämtliche Substanzen die Odor Activity Values (OAVs) berechnet. Beim Odor Activity Value (OAV) handelt es sich um den Quotienten aus der Konzentration eines Aromastoffs und dessen Wahrnehmungsschwelle. Der OAV gibt also an, um welchen Faktor die Wahrnehmungsschwelle überschritten wurde und damit, wie ausgeprägt der Aromastoff von der menschlichen Nase wahrgenommen wird. Dieses Konzept zeigt deutlich, dass die Aromastoffe Nonanal, E-2-Nonenal und E-2-Hexenol auf Grund ihrer im Vergleich zu den gefundenen Konzentrationen hohen Geruchsschwellenwerte (30 mg/kg, 0,94 mg/kg und 8 mg/kg (77)) und den daraus resultierenden geringen OAVs keinen bedeutenden Einfluss auf das Olivenölaroma haben können. Auch ein Einfluss der leichtflüchtigen Verbindungen Ethanol, Aceton und Ethylacetat kann auf Grund deren geringen Aromaaktivitäten ausgeschlossen werden. Daher ist es nicht sinnvoll diese Substanzen für eine Qualitätsbestimmung von

Olivenöl heranzuziehen. Da ein Aromastoff erst ab Konzentrationen höher als der Geruchsschwellenwert von der menschlichen Nase wahrgenommen wird, ändert sich sein Einfluss auf das Aroma mit dem Überschreiten dieser kritischen Konzentration drastisch. Um dieses Vorwissen in das Kalibriermodell mit einfließen zu lassen, wurden die berechneten OAVs mit Hilfe einer Aktivierungsfunktion transformiert. Ein solche individuell für jede Variable anpassbare Aktivierungsfunktion, wie sie für neuronale Netze (67) und so genannte ChemNets (78) vorgeschlagen werden, stellt die folgende Funktion dar:

$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{(a-x)*g}}$$

Durch Einsetzen der OAVs in die Funktion werden die Variablen in einen Wertebereich von 0 bis 1 transponiert. Dabei werden Werte größer als die kritische Konzentration  $a$  aufgewertet. Werte kleiner als die kritische Größe  $a$  werden dagegen abgewertet. Das Ausmaß dieser Gewichtung wird über den Gewichtungsfaktor  $g$  bestimmt. Die Funktionen für verschiedene Werte für  $a$  und  $g$  sind in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Diese Aktivierungsfunktionen bieten den Vorteil, dass zum einen die Information über die drastische Änderung des Einflusses der Aromastoffe beim Überschreiten der kritischen Konzentration in der Datenmatrix hervorgehoben wird und zum anderen wird für das Klassifizierungsproblem irrelevante Information reduziert. Letzteres geschieht dadurch, dass der Einfluss von Extremwerten, besonders hohe oder niedrige OAVs, durch die Transponierung auf einen Datenbereich zwischen 0 und 1 minimiert wird. Da ein Olivenöl bereits durch das Vorhandensein eines einzigen Aromafehlers nicht mehr als „Nativ extra“ zu bezeichnen ist, ist es für die Klassifizierung der Olivenöle in „Nativ extra“ und „nicht Nativ extra“ nicht relevant wie ausgeprägt ein Fehleraroma verursachender Aromastoff wahrnehmbar und damit wie groß sein OAV ist. Vielmehr kommt es nur darauf an, ob der jeweilige Aromastoff wahrnehmbar ist oder nicht. Daher sollte ein OAV von z.B. 4 die gleiche Gewichtung haben wie ein OAV von z.B. 10 desselben Aromastoffes. Dies wird über die Aktivierungsfunktion sicher gestellt, da beide Werte abhängig von den Koeffizienten  $a$  und  $g$  in einen Wert von annähernd 1 transponiert würden. Wie oben bereits erwähnt stellt für die meisten Aromastoffe der jeweilige Geruchsschwellenwert die kritische Konzentration dar. Daher wird für diese Aromastoffe  $a$  gleich 1 gesetzt. Es gibt

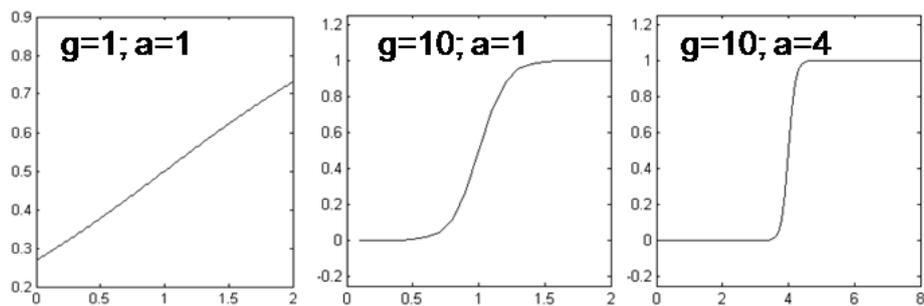
allerdings auch Aromastoffe, deren Geruchsqualität von der Konzentration abhängig ist. So riecht Hexanal in geringeren Konzentrationen angenehm grün, in höheren Konzentrationen allerdings unangenehm talgig und ranzig. Daher wurde für diesen Aromastoff der Wert für  $a$  auf 3 gesetzt. Dies bedeutet, dass die kritische Konzentration für Hexanal beim Dreifachen des Geruchsschwellenwertes ( $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) nämlich  $900 \mu\text{g}/\text{kg}$  liegt. Dieser Wert entspricht ca. dem 75. Perzentil der in der Gruppe der „Nativ extra“ Olivenöle gemessenen Hexanal Konzentrationen. Ein anderes Beispiel sind die methylverzweigten Ester Ethylisobutanoat und Ethyl-2-methylbutanoat, welche in geringen Konzentrationen fruchtig riechen und in höheren Konzentrationen eher an überreife vergorene Früchte erinnern. Um dies zu berücksichtigen wurde  $a$  für diese Aromastoffe auf 3 bzw. 4 gesetzt. Dies entspricht Konzentrationen von  $3,6 \mu\text{g}/\text{kg}$  bzw.  $2,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Auch hier wurde jeweils das 75. Perzentil der in der Gruppe der „Nativ extra“ bestimmten Konzentrationen als Richtwert herangezogen.

Essigsäure ist Bestandteil des Aromas vieler Lebensmittel und trägt dort zum positiven Gesamtaroma bei. Der als stechend beschriebene Aromaeindruck wird erst ab Konzentrationen, welche wesentlich höher sind als der Geruchsschwellenwert, als unangenehm wahrgenommen. Dies ist auch im Olivenöl so und daher wurde  $a$  für die Essigsäure gleich 8 gesetzt. Die resultierende kritische Konzentration von  $992 \mu\text{g}/\text{kg}$  entspricht wieder ca. dem 75. Perzentil der Essigsäurekonzentrationen in den „Nativ extra“ Olivenölen.

Ob ein Fehleroma im Olivenöl wahrgenommen wird oder nicht, hängt nicht nur von der Konzentration der Fehleromen verursachenden Substanzen ab, sondern auch davon, wie ausgeprägt das positive grün-fruchtige Aroma im Öl vorhanden ist. Da die menschliche Nase nur bedingt in der Lage ist einzelne Aromastoffe aus komplexen Gemischen geruchlich zu identifizieren, können die dominierenden grün-fruchtigen Aromastoffe ggf. vorhandene Fehleromen überdecken. Daher wurde die Summe der OAVs der grün-fruchtigen Aromastoffe (Z-3-Hexenal, E-2-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol) als Variable mit in das Klassifizierungsmodell aufgenommen. Die Zusammenfassung der positiven Aromastoffe zu einer Variablen bietet den Vorteil, dass Unterschiede in den Konzentrationen der Aromastoffe zwischen den verschiedenen Olivenölen, welche auf die unterschiedlichen Olivensorten und Ursprungsländer zurückgehen, nicht berücksichtigt werden und damit für das Klassifizierungsmodell

nicht relevante Information aus der Datenmatrix eliminiert wird. Da nur hohe Konzentrationen an den grün-fruchtig riechenden Aromastoffen in der Lage sein sollten Fehleraromen zu überdecken, wurde der Wert für  $a$  auf 180 gesetzt und die Steigung der Aktivierungsfunktion  $g$  auf 1 gesetzt. Damit erhält man im mittleren Bereich der Funktionen einen fast linearen Anstieg, so dass in diesem Bereich das Ausmaß der Maskierung von Fehleraromen linear mit der Summe der OAVs der grün-fruchtigen Aromastoffe ansteigt. Die 180 entsprechen ca. dem 75. Perzentil der Summe aus den in der Gruppe der „nicht Nativ extra“ Olivenölen bestimmten OAVs.

Die Koeffizienten  $a$  und  $g$  sind für die zur Klassifizierung verwendeten Aromastoffe in Tabelle 4 aufgelistet.



**Abbildung 15: Graphische Darstellung der Aktivierungsfunktionen mit verschiedenen Werten für das Aktivierungslevel  $a$  und die Steigung  $g$**

**Tabelle 4: Geruchsschwellenwerte und Koeffizienten für die Aktivierungsfunktion der für das Klassifizierungsmodell verwendeten Aromastoffe**

Aromastoff	Geruchs-Schwellenwert <sup>a</sup>	a	g
Ethyl-isobutanoat <sup>b</sup>	1,2	3	10
Ethyl-2-methylbutanoat <sup>b</sup>	0,7	4	10
Hexanal <sup>b</sup>	300	3	10
3-methylbutanol <sup>b</sup>	100	1	1
Essigsäure <sup>b</sup>	124	8	1
Buttersäure <sup>c</sup>	135	1	10
E,E-2,4-Decadienal <sup>b</sup>	180	1	10
Hexansäure <sup>c</sup>	700	1	10
Guaiacol <sup>b</sup>	16	1	10
2-Phenylethanol <sup>b</sup>	211	1	10
Z-3-hexenal <sup>b</sup>	1,7		
E-2-hexenal <sup>b</sup>	424		
Z-3-hexenyl acetate <sup>b</sup>	200		
Z-3-hexenol <sup>b</sup>	1100		
Summe <sup>d</sup>		180	1

**a Geruchsschwellenwerte [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] orthonasal in Sonnenblumenöl bestimmt; entnommen aus b Literatur (1) und c Literatur (41); d Summe der OAVs von Z-3-Hexenal, E-2-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat, Z-3-Hexenol**

Zur Überprüfung, ob die durchgeführte Datenvorbereitung zu der gewünschten Reduzierung des Rauschens und der Inhomogenität innerhalb der fehlerhaften Olivenöle geführt hat, wurde eine PCA mit den transformierten Daten durchgeführt. Der Loadings- und der Scores-Plot sind in Abbildung 16 dargestellt. Wie man am Scores-Plot (Abb. 16 a) erkennen kann, erfolgt weiterhin eine Trennung der beiden Qualitätsstufen über die erste Hauptkomponente (PC1). Nun liegen die Proben der jeweiligen Kategorien enger beisammen und es gibt keine extremen Ausreißer mehr. Das Ziel der Verringerung der Heterogenität innerhalb der Klassen wurde also erreicht. Desweiteren klären die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) nun zusammen 47 % (31 % PC1 und 16 % PC2) der Gesamtvariabilität. Das im Datensatz enthaltene Rauschen wurde somit reduziert. Die Trennung der Aromen nach ihrem Entstehungsweg (Fettoxidation, mikrobieller Verderb und Lipoxygenaseweg) ist, wie man im Loadings-Plot (Abb. 16 b) sehen kann, weiterhin vorhanden.

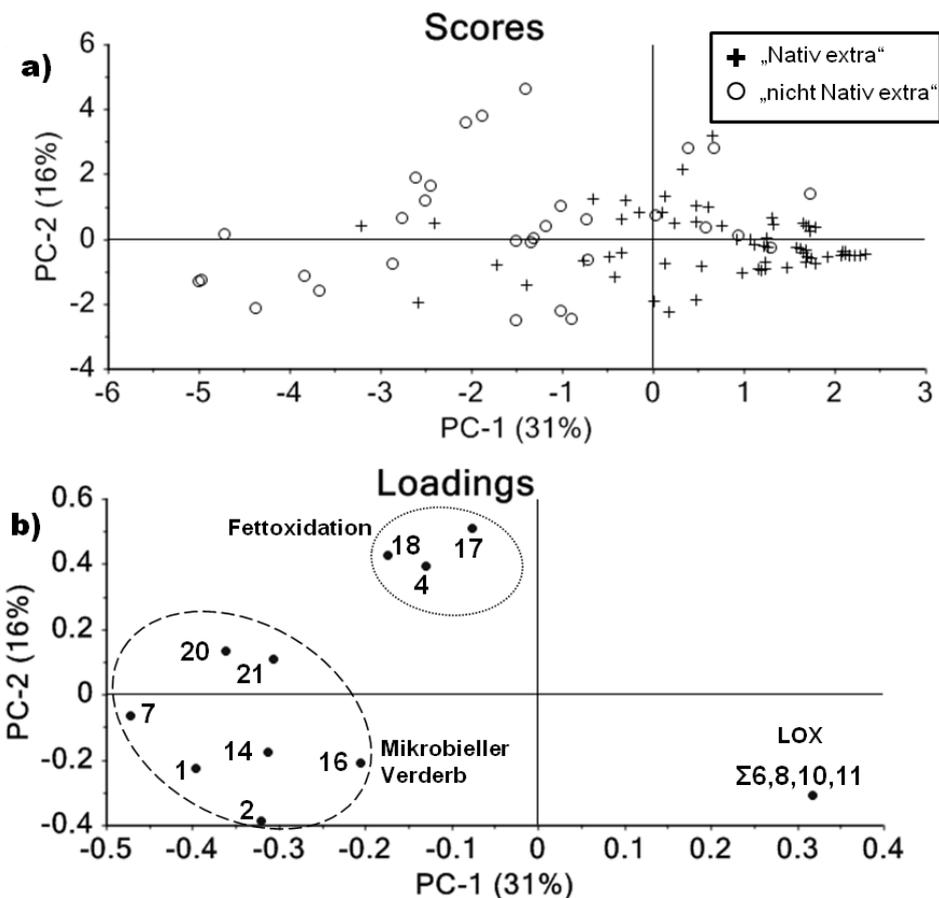


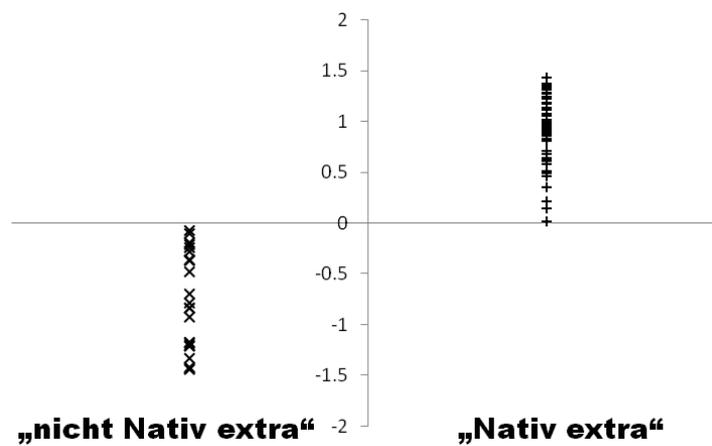
Abbildung 16: PCA der transformierten Odor Activity Values

Zur Erstellung eines neuen Klassifizierungsmodells wurden die über die Aktivierungsfunktionen transformierten OAVs mittels einer Partial Least Square Discriminant Analyse (PLS-DA) mit den Sensorikdaten korreliert. Dazu wurden wieder die vom Sensorikteam als „Nativ extra“ eingestuften Olivenöle mit dem Wert 1 und die vom Sensorikteam als fehlerhaft eingestuften Öle mit dem Wert -1 codiert. Die Optimierung der berechneten Modelle erfolgte über Minimierung der Fehlklassifizierungen in der Kreuzvalidierung (66 % der Proben zur Kalibrierung und 33 % zur Validierung). Die Ergebnisse des besten Klassifizierungsmodells sind in Abbildung 17 dargestellt. Wie man sehen kann, erfolgt eine klare Klassifizierung der Olivenöle nach ihrer Qualität über die ausgewählten Aromastoffe. Die so erzielten

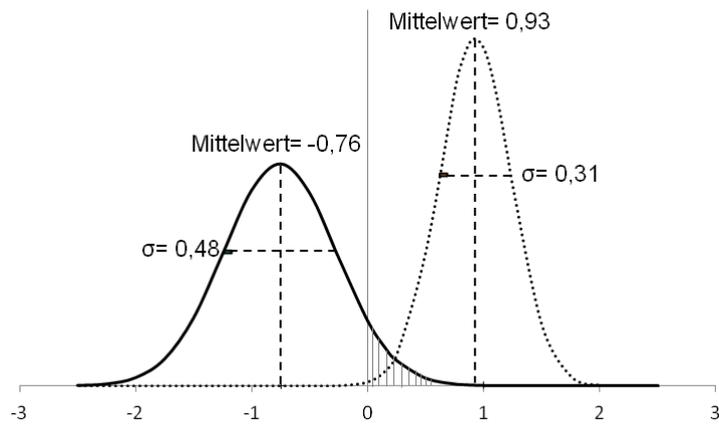
Ergebnisse stimmen bei den dargestellten Olivenölen gut mit denen aus der Sensorik überein. Es ist eine klare Abgrenzung zwischen den beiden Qualitätsstufen „Nativ extra“ und „nicht Nativ extra“ durch die X-Achse gegeben. Olivenöle, welche von dem Klassifizierungsmodell einen Wert  $>0$  zugewiesen bekommen, sind als „Nativ extra“ einzustufen und solche, welche einen Wert  $<0$  zugewiesen bekommen, als „nicht Nativ extra“ einzustufen. Wie groß der Fehler ist, wenn man den Wert null als Grenze festlegt, lässt sich über die Verteilungen der Modellausgabewerte für die beiden Klassen abschätzen. Geht man näherungsweise von normalverteilten Werten aus, lassen sich über die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen Gaußverteilungen für die beiden Klassen erstellen. In Abbildung 18 sind die beiden Verteilungen graphisch dargestellt. Wie man sehen kann ist die Gaußkurve für Olivenölproben der Kategorie „Nativ extra“ wesentlich schmaler. Dies liegt an der größeren Streuung innerhalb der Gruppe der „nicht Nativ extra“ Olivenöle und an der deutlich geringeren Probenanzahl. Über die Fläche (schraffierter Bereich in Abb. 18) unter dem Teil der Kurve für die Kategorie „nicht Nativ extra“, welcher sich im positiven Bereich der X-Achse befindet, lässt sich der  $\alpha$ -Fehler für die Klassifizierung als „nicht Nativ extra“ abschätzen. Oder anders formuliert: Der Betrag der Fläche unter diesen Kurvenabschnitt gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, dass ein vom Sensorikteam als fehlerhaft bewertetes Olivenöl vom Klassifizierungsmodell als „Nativ extra“ eingestuft wird. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt 5,8 % (einseitige Betrachtung). Dieser Wert liegt nur knapp über dem üblicherweise als Signifikanzniveau festgelegten Wert von 5%. Olivenölproben, welche vom Klassifizierungsmodell einen Ausgabewerte  $>0$  zugewiesen bekommen, können somit als signifikant „Nativ extra“ bezeichnet werden. Betrachtet man den umgekehrten Fall, muss man die Fläche unterhalb des Kurvenabschnitts der Verteilung der „Nativ extra“ Olivenöle im negativen Bereich der X-Achse bestimmen. Der Anteil dieser Fläche an der Gesamtfläche beträgt 0,1 %. Die Irrtumswahrscheinlichkeit, dass ein vom Sensorikteam als „Nativ extra“ bestimmtes Olivenöl vom Klassifizierungsmodell als fehlerhaft eingestuft wird, beträgt somit 0,1 % (einseitige Fragestellung). Olivenölproben, welche vom Klassifizierungsmodell einen Ausgabewerte  $<0$  zugewiesen bekommen, können somit als höchst signifikant „nicht Nativ extra“ bezeichnet werden. Durch Erhöhung der Probenanzahl in der Klasse der „nicht Nativ extra“ Olivenölproben würde sicherlich die Gaußkurve für diese Klasse

schmäler (kleinere Standardabweichung) und damit der Fehler für die Klassifizierung kleiner werden.

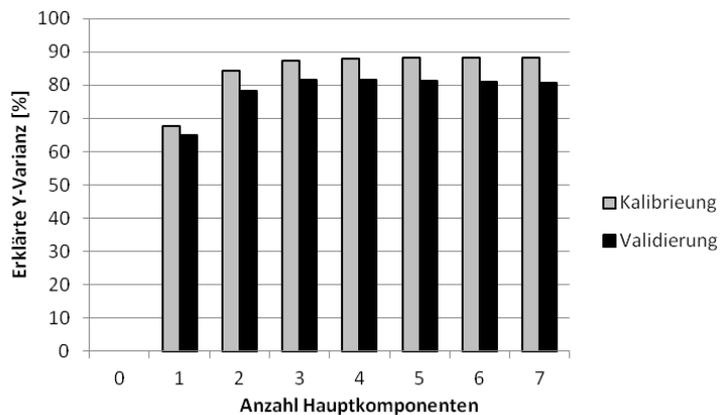
Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, erweist sich aus der Validierung die Verwendung von drei Hauptkomponenten (PC1-3) als optimal, da weitere Hauptkomponenten nur noch einen sehr geringen Beitrag zum Erklärungsanteil beisteuern. Desweiteren ist am Verlauf des Erklärungsgrades durch die Validierproben (schwarze Balken) zu erkennen, dass es sich um ein robustes Modell handelt.



**Abbildung 17: Klassifizierungsergebnisse aus der Kreuzvalidierung (66% der Proben für Kalibrierung und 33% für Validierung); 16 Olivenölproben wurden nicht berücksichtigt.**



**Abbildung 18: Verteilungen für die Olivenölproben der Kategorien "nicht Nativ extra" (links) und "Nativ extra" (rechts). Die schraffierte Fläche gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit (5,8 %) für die Kategorie "nicht Nativ extra" wieder.**



**Abbildung 19: Anteil an der erklärten Varianz durch die Hauptkomponenten**

16 Olivenölproben aus der Gesamtmenge von 95 Proben (Öl-Nr. A4, A12, A27, A28, A41-44, A54, A56, A61, A64, A72, A78, A85 und A88) wurden bei der Erstellung der Klassifizierungsmodelle nicht berücksichtigt, da diese stets falsch klassifiziert wurden. Wieso diese Öle vom Klassifizierungsmodell nicht korrekt bewertet werden, hat vermutlich unterschiedliche Gründe. Es handelt sich wie im Fall der Öle A12, A14, A54 und A61 um Öle, welche auf Grund von Fehlparfömen mit sehr geringen (0,4 bis 0,8)

Intensitätsbewertungen als fehlerhaft eingestuft wurden. Da die sensorischen Daten auch mit einem Fehler behaftet sind, könnten diese Öle vom Sensorikteam falsch klassifiziert worden sein. Ein anderes Beispiel sind die Öle A4 und A41-44, welche deutlich erhöhte Konzentrationen an Aromastoffen aufweisen, welche während eines Verderbs der Oliven vor dem Pressen oder während einer unsachgemäßen Lagerung des Öls selber entstehen. Dennoch wurden keine Aromafehler vom Sensorikpanel erkannt. Entweder sind diese Aromafehler erst nach der sensorischen Untersuchung der Olivenöle während des Transports oder der Lagerung entstanden oder die Aromafehler wurden vom Sensorikteam aus einem unbekanntem Grund nicht wahrgenommen. Insgesamt wurden 84 der 95 Olivenölproben (88 %) richtig klassifiziert. Tabelle 5 zeigt die Klassifizierungsergebnisse und Tabelle 6 die Regressionskoeffizienten.

**Tabelle 5: Ergebnisse der Klassifizierung (Kreuzvalidierung) der 95 Olivenölproben**

Ergebnis Sensorik	Vorhersage Klassifizierungsmodell	
	„Nativ extra“	„nicht Nativ extra“
„Nativ extra“	60	4
„nicht Nativ extra“	7	24

**Tabelle 6: Regressions-Koeffizienten**

Variable	Koeffizient	Variable	Koeffizient
$b_0^a$	0,61	Buttersäure	-0,49
Ethyl-isobutanoat	-0,79	E,E-2,4-Decadienal	-1,02
Ethyl-2-Methylbutanoat	-0,28	Hexansäure	-0,88
Hexanal	0,35	2-Phenylethanol	0,16
3-Methylbutanol	-0,40	Guaiacol	-0,70
Essigsäure	0,45	Summe <sup>b</sup>	0,47

**a y-Achsenabschnitt; b Summe der OAVs von Z-3-Hexenal, E-2-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol**

Anhand der Regressionskoeffizienten (cf. Tabelle 6) kann der Einfluss der einzelnen Variablen auf die Klassifizierung abgelesen werden. So ist der Einfluss von E,E-2,4-Decadienal, Hexansäure, Ethyl-isobutanoat und Guaiacol auf Grund der hohen negativen Koeffizienten (-1,02; -0,88; -0,79 und -0,70) am größten. Das Vorhandensein dieser Verbindungen in Konzentrationen über deren Geruchsschwellenwerten führt zu einem Ausgabewert von  $<0$  und damit zu einer Klassifizierung als „nicht Nativ Extra“. Während das E,E-2,4-Decadienal als Indikator für ranzige Olivenöle (79) und das Guaiacol als Indikator für einen mikrobiellen Befall der Oliven während der Lagerung vor der Pressung (25) beschrieben wurden, wurden die Hexansäure und das Ethyl-isobutanoat bisher nicht in der Literatur zur Bestimmung der Olivenölqualität herangezogen. Weniger Bedeutung für die Kategorie „nicht Nativ extra“ sind die Verbindungen Buttersäure, 3-Methylbutanol und Ethyl-2-methylbutanoat durch die geringen negativen Koeffizienten (-0,49; -0,4 und -0,28). Lediglich das 3-Methylbutanol wurde in der Literatur zur Qualitätsbestimmung von Olivenöl genutzt (70). Erstaunlich ist, dass neben der Summe aus den OAVs von Z-3-Hexenal, E-2-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol auch Hexanal, Essigsäure und 2-Phenylethanol positive Koeffizienten aufweisen. Das Auftreten dieser Aromastoffe im Olivenöl, welche mit dem Auftreten von Fehleraromen in Verbindung gebracht wurden, sollte folglich eher zu einer Klassifizierung als „Nativ extra“ führen. Allerdings dürfen die Aromastoffe nicht einzeln betrachtet werden, sondern müssen im Kontext mit den anderen Aromastoffen gesehen werden. Desweiteren gelten diese Regressionskoeffizienten nur für die hier untersuchten Proben. In weiteren Untersuchungen müsste geklärt werden, inwieweit das Klassifizierungsmodell auch mit anderen Olivenölproben funktioniert.

### **3.5 Bestimmung der Fruchtigkeit**

Neben der Unterscheidung von fehlerfreien und fehlerhaften Olivenölen sollte eine Qualitätsbewertung innerhalb der Gruppe der Olivenöle „Nativ extra“ erfolgen. Ein wichtiger Parameter für die Olivenölqualität ist die sensorisch wahrnehmbare

Fruchtigkeit der Olivenöle. Zur Erstellung einer instrumentellen Methode zur Bestimmung der Fruchtigkeit wurde der natürliche Logarithmus der OAVs der aus dem Lipoxygenaseweg stammenden grün-fruchtigen Substanzen (Z-3-Hexenal, E-2-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol) über eine Partial Least Square Regression (PLS-R) mit der Fruchtigkeitsbewertung des Sensorikteams korreliert. Diese Substanzen wurden ausgewählt, weil sie in allen Olivenölen in relativ hohen Konzentrationen vorkommen und hauptsächlich für das grün-fruchtige Aroma von Olivenöl verantwortlich sind (1, 80). Für die Entwicklung des Regressionsmodells wurden lediglich die Olivenölproben verwendet, welche vom Klassifizierungsmodell eindeutig der Kategorie „Nativ extra“ zugeordnet wurden. Die Optimierung des Regressionsmodells erfolgte durch Minimierung des Validierungsfehlers (Kreuzvalidierung: 66% der Proben für Kalibrierung und 33% der Proben für die Validierung verwendet). Die besten Ergebnisse wurden durch Umrechnung der Quantifizierungsdaten in die jeweiligen Odor Activity Values und Bildung des natürlichen Logarithmus von diesen ( $\ln(\text{OAV})$ ) erzielt. Durch die Umrechnung in die OAVs wird der tatsächliche Einfluss der Aromastoffe auf die Fruchtigkeit berücksichtigt und durch Bildung des natürlichen Logarithmus wird das Eintreten einer Sättigung der Geruchsrezeptoren bei hohen Konzentrationen mit einbezogen. Die Sättigung der Geruchsrezeptoren führt bei hohen Konzentrationen trotz steigender Aromastoffkonzentration nur zu einer geringfügig höheren Fruchtigkeitswahrnehmung und bedingt dadurch zu einer nur geringfügig höheren Fruchtigkeitsbewertung. Dadurch ist im höheren Konzentrationsbereich kein linearer Zusammenhang zwischen Aromastoffkonzentration und Intensität der sensorischen Wahrnehmung mehr gegeben. Durch Bildung des natürlichen Logarithmus kann dies ausgeglichen werden. Zusätzlich wurden die Variablen durch Division mit der Standardabweichung skaliert, damit die Varianz innerhalb der Variablen von der Größenordnung unabhängig wird (68).

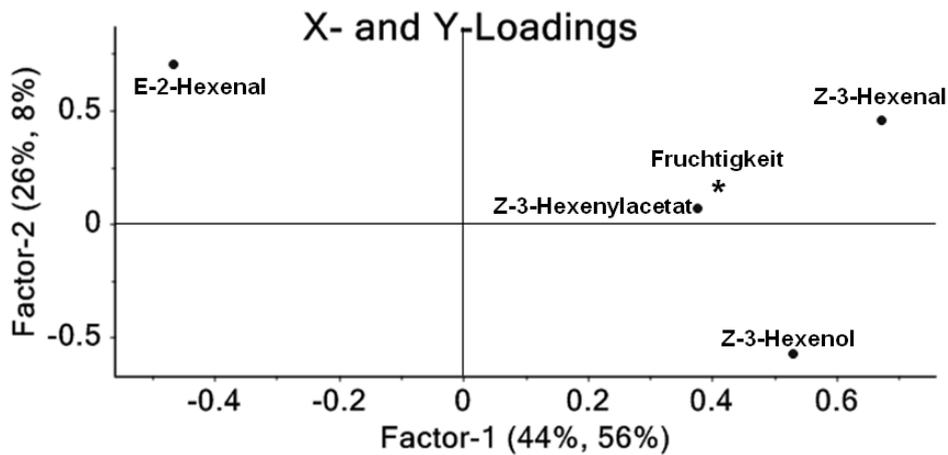
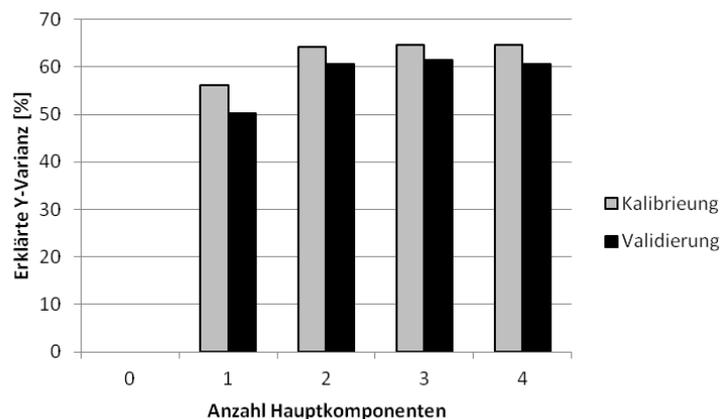


Abbildung 20: Loadings-Plot. PLS-R zur Bestimmung der Fruchtigkeit

Abbildung 20 zeigt den Loadingsplot des berechneten PLS-R Modells. Auffällig ist die Separation des E-2-Hexenals, welches als einziges auf der ersten Hauptkomponente (PC1) negativ korreliert ist, von den drei anderen Variablen. Dies lässt sich durch die Bildung des E-2-Hexenals über einen anderen Zweig des Lipoxygenaseweges erklären. Durch eine Isomerase wird E-2-Hexenal aus Z-3-Hexenal gebildet (23). Eine gegenläufige Korrelation zwischen dem E-2-Hexenal-Gehalten und den Gehalten der anderen Aromastoffe aus dem Lipoxygenaseweg wurde auch von Angerosa et al. gefunden (20).

Über den erklärten Anteil an der Gesamtvarianz innerhalb der Validierproben wurde die optimale Anzahl an Hauptkomponenten auf zwei festgelegt (vgl. Abb. 21). Anhand der Regressionskoeffizienten (Tabelle 7) erkennt man, dass Z-3-Hexenal den größten Einfluss auf die wahrzunehmende grün-fruchtige Note von Olivenöl hat. Diese Substanz zeichnet sich durch ein intensives Aroma nach frisch geschnittenem Gras aus. Den zweitgrößten Einfluss hat das nach grüner Banane riechende Z-3-Hexenylacetat. Z-3-Hexenol hat nur noch eine geringe Bedeutung und das E-2-Hexenal einen sehr geringen negativen Einfluss auf die Fruchtigkeit. Die Ergebnisse der Validierung des besten Modells sind in Abbildung 22 dargestellt. Aufgetragen sind die vom Modell berechneten Fruchtigkeitswerte gegen die vom Sensorikteam bestimmten Werte. Für die meisten Olivenölproben wird die Intensität des grün-fruchtigen Aromas innerhalb der Fehlergrenzen der Sensorik ( $\pm 0,5$ ) vorhergesagt. Acht Olivenölproben weisen eine

große Abweichung des berechneten Fruchtigkeitwertes vom sensorisch bestimmten auf. Diese Olivenölproben (A1, A3, A13, A26, A33, A36, A40, A45, A55, A60, A86, A89 und A93) wurden bei der Berechnung des Modells nicht berücksichtigt. Die Fruchtigkeit für die Proben A26, A33, A36, A45, A55, A60 und A86 wurde vom Regressionsmodell niedriger berechnet als die per Sensorik bestimmte Fruchtigkeit. Dies lässt sich durch weitere im Olivenöl vorhandene Aromastoffe, welche die grün-fruchtige Wahrnehmung verursachen, erklären. Um die Fruchtigkeit dieser Olivenöle korrekt vorhersagen zu können, müssten diese, ggf. vorhandenen, Aromastoffe identifiziert und im Regressionsmodell berücksichtigt werden. Eine weitere Erklärung wäre der Verlust an grün-fruchtigen Aromastoffen während Lagerung oder Transport der Olivenölproben. Für die Olivenölproben A1, A3, A13, A40, A89 und A93 wurde eine höhere Fruchtigkeit als die vom Sensorikpanel bestimmte vorhergesagt. Wieso trotz relativ hoher Gehalte an den grün-fruchtigen Aromastoffen nur eine im Vergleich zu anderen Olivenölen mit ähnlichen Gehalten geringe Fruchtigkeit wahrgenommen wurde, ist schwierig eindeutig zu klären. Synergistische Effekte anderer Olivenölinhaltstoffe oder aber eine fehlerhafte sensorische Bewertung sind mögliche Erklärungsansätze.

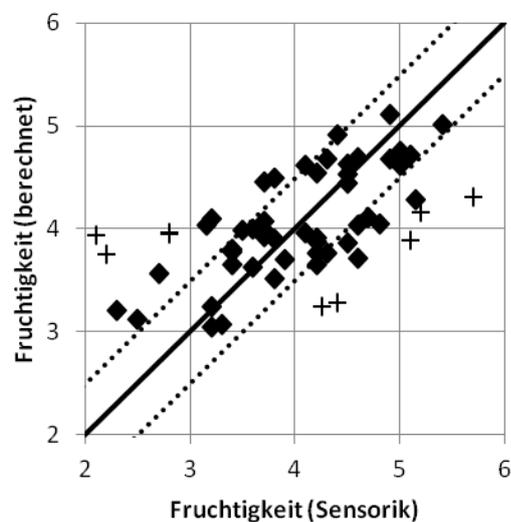


**Abbildung 21: Anteil an der erklärten Varianz durch die Hauptkomponenten**

**Tabelle 7: Regressionskoeffizienten zur instrumentellen Bestimmung der Fruchtigkeit**

Variable	Koeffizient
$b_0^a$	1,36
Z-3-Hexenal	0,40
E-2-Hexenal	-0,01
Z-3-Hexenylacetat	0,15
Z-3-Hexenol	0,06

**a y-Achsenabschnitt**



**Abbildung 22: Ergebnisse der Fruchtigkeitsbestimmung. Die durchgezogene Linie stellt die Ideallinie dar; die gepunkteten Linien stellen die Fehlergrenzen der Sensorik ( $\pm 0,5$ ) dar. Die mit dem Symbol (+) gekennzeichneten Proben wurden bei der Berechnung des Modells nicht berücksichtigt**

Die schwache negative Korrelation des E-2-Hexenals mit der Fruchtigkeit ist zunächst verwunderlich, da diese, abhängig von der Konzentration nach grünem Apfel oder Bittermandel riechende Substanz in den meisten Olivenölen die mengenmäßig bedeutendste Verbindung aus dem Lipoxygenaseweg darstellt. Allerdings wird der Aromastoff in dem von Aparicio et al. entwickeltem statistischem Aromarad dem Sektor „bitter-scharf“ zugeordnet und die Aromastoffe Z-3-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol dem Sektor „grün“ zugeordnet (81). E-2-Hexenal trägt also nicht zu dem fruchtig-grünen Aroma von Olivenöl bei und sorgt im Gegenteil sogar eher dafür,

dass das Aroma der Olivenöle vom Sensorikteam als weniger grün-fruchtig wahrgenommen wird. Auch Guth und Grosch kamen zu dem Ergebnis, dass die grüne Aromanote von Olivenöl hauptsächlich durch das Z-3-Hexenal hervorgerufen wird (75). Durch die Berücksichtigung weiterer wichtiger aromaaktiver Substanzen aus dem Lipoxygenaseweg, wie 1-Penten-3-ol, 1-Penten-3-on oder Hexylacetat (1), könnte das Modell optimiert werden und ggf. so die Vorhersage der Fruchtigkeit für die weit außerhalb des Fehlerbereichs liegenden Olivenölproben verbessert werden.

### **3.6 Modellöle mit definierten Aromafehlern bzw. Fruchtigkeit**

Eines der großen Probleme der sensorischen Qualitätsbewertung von Olivenölen ist das Fehlen von stabilen Referenzölen mit definierten Fehleraromen. Diese Referenzöle könnten zum Trainieren der Panelmitglieder und zur Verbesserung der Vergleichbarkeit von verschiedenen Sensorikpanels eingesetzt werden. Auf Basis der Quantifizierungsergebnisse wurden Modellöle mit Mischungen aus verschiedenen Fehleraromen verursachenden Aromastoffen hergestellt. Diese Modellöle wurden sensorisch untersucht. Tabelle 8 gibt die Zusammensetzung und die sensorische Bewertung der Modellöle wieder. Mit Hilfe einer geringen Anzahl ausgewählter Aromastoffe konnten die Fehleraromen „ranzig“, „modrig-feucht“ und „essigsauerweinartig“ rekonstruiert werden.

**Tabelle 8: Zusammensetzung und sensorische Bewertung der Modellöle**

Nr.	Aromastoff	c [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	OAV <sup>a</sup>	Sensorikergebnis
1	E,E-2,4-Decadienal	450	3	ranzig 2,6
	Hexansäure	370	<1	
	E-2-Nonenal	130	<1	
	Hexanal	1030	3	
2	E,E-2,4-Decadienal	130	<1	ranzig 3,1
	Hexansäure	6390	9	
	E-2-Nonenal	190	<1	
	Hexanal	4990	17	
3	3-Methylbutanol	7590	76	modrig-feucht 3,9
	Essigsäure	1990	16	
	2-Phenylethanol	1550	7	
	Guaiacol	100	6	
4	Ethyl-2-methylbutanoat	120	167	essigsauer-weinartig 1,9
	Ethyl-isobutanoat	60	50	
	Essigsäure	5060	41	
	Buttersäure	540	4	
5	Z-3-Hexenal	3150	1850	Fruchtigkeit 1,8
	E-2-Hexenal	2000	5	
	Z-3-Hexenylacetat	750	4	
	Z-3-Hexenol	5000	5	
6	Z-3-Hexenal	190	110	Fruchtigkeit 2,4
	E-2-Hexenal	10000	24	
	Z-3-Hexenylacetat	115	>1	
	Z-3-Hexenol	890	>1	

**a OAVs berechnet über die in Tabelle 4 aufgeführten Geruchsschwellenwerte**

Das Aroma von Modellöl 1 wird dominiert vom E,E-2,4-Decadienal, während das Aroma von Modellöl 2 von Hexanal und Hexansäure geprägt wird. Beide Modellöle wurden vom Sensorikteam als ranzig bewertet. E,E-2,4-Decadienal führt in geringen Konzentrationen zur Bildung des Fehleraromas „ranzig“ und entsteht bereits zu Beginn der Fettoxidation. Im Gegensatz dazu führen Hexanal und Hexansäure erst in höheren Konzentrationen zu einer wahrnehmbaren Ranzigkeit. Diese beiden Aromastoffe werden erst im fortgeschrittenen Verlauf der Fettoxidation gebildet. Das Modellöl 1 steht folglich für ein frühes Stadium der Fettoxidation und Modellöl 2 für ein Öl im fortgeschrittenen Stadium der Fettoxidation. Diese Modellversuche zeigen, dass für eine

Qualitätsbewertung von Olivenöl die Quantifizierung aller drei Substanzen notwendig ist.

Modellöl 3 wurde als „modrig-feucht“ charakterisiert. Diese Mischung enthält mit 3-Methylbutanol, Guaiacol, Essigsäure und 2-Phenylethanol Substanzen, welche während eines mikrobiellen Verderbs entstehen. Die Aromastoffe Guaiacol und 3-Methylbutanol sind hauptsächlich für den modrigen und schimmeligen Geruchseindruck dieses Modellöls verantwortlich.

Modellöl 4 enthält mit Ethyl-2-methylbutanoat, Ethylisobutanoat, Essigsäure und Buttersäure ebenfalls Substanzen, welche von Mikroorganismen während des Verderbs gebildet werden. Durch den hohen Gehalt an Essigsäure und durch die fruchtigen Ester entsteht in diesem Modellöl der Aromafehler „essigsauer-weinartig“.

Da es sich bei den Modellölen um einfache Mischungen weniger Aromastoffe handelt, lassen sich diese einfach und reproduzierbar herstellen. Allerdings berücksichtigen diese weder die Wechselwirkung verschiedener Fehleraromen untereinander noch den Einfluss der grün-fruchtig riechenden Substanzen aus dem Lipoxygenaseweg. Inwieweit letztere in höheren Konzentrationen vorhandene Fehleraromen überdecken können, müsste durch Mischen von fehlerfreien Olivenölen mit den Modellölen in weiteren Experimenten untersucht werden.

Durch zwei weitere Modellöle sollte überprüft werden, ob das positive grünfruchtige Aroma von Olivenöl durch Rekombination der vier für die Vorhersage der Fruchtigkeit verwendeten Substanzen (Z-3-Hexenal, E-2-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol) nachgestellt werden kann. Die hergestellten Konzentrationen der Aromastoffe und die sensorische Bewertung der Modellöle sind in Tabelle 8 zu finden. Zwar wurde eine leichte Fruchtigkeit in den Modellölen wahrgenommen und das Aromaprofil wurde mit für Olivenöle typischen Attributen wie „reife Früchte“ und „Kräuter“ beschrieben, allerdings hätte die Bewertung der Fruchtigkeit für die Modellöle wesentlich höher ausfallen müssen. Eine Vorhersage der Fruchtigkeit anhand der Konzentrationen der Aromastoffe in den Modellölen über das entwickelte mathematische Modell liefert wesentlich höhere Fruchtigkeitswerte. So wird für das Modellöl Nr. 5 eine Fruchtigkeit von 4,6 (Sensorik: 1,8) und für das Modellöl Nr. 6 eine Fruchtigkeit von 3,2 (Sensorik: 2,4) berechnet. Diese Ergebnisse zeigen, dass das komplexe grün-fruchtige Aroma von Olivenöl nicht durch diese vier Substanzen allein simuliert werden kann. Vielmehr sind

mindestens 7-10 Aromastoffe nötig um das Aroma von Olivenöl authentisch nachzubilden (41). Vor allem das 1-Penten-3-on könnte noch einen entscheidenden Betrag zur Bildung des Olivenölaromas haben.

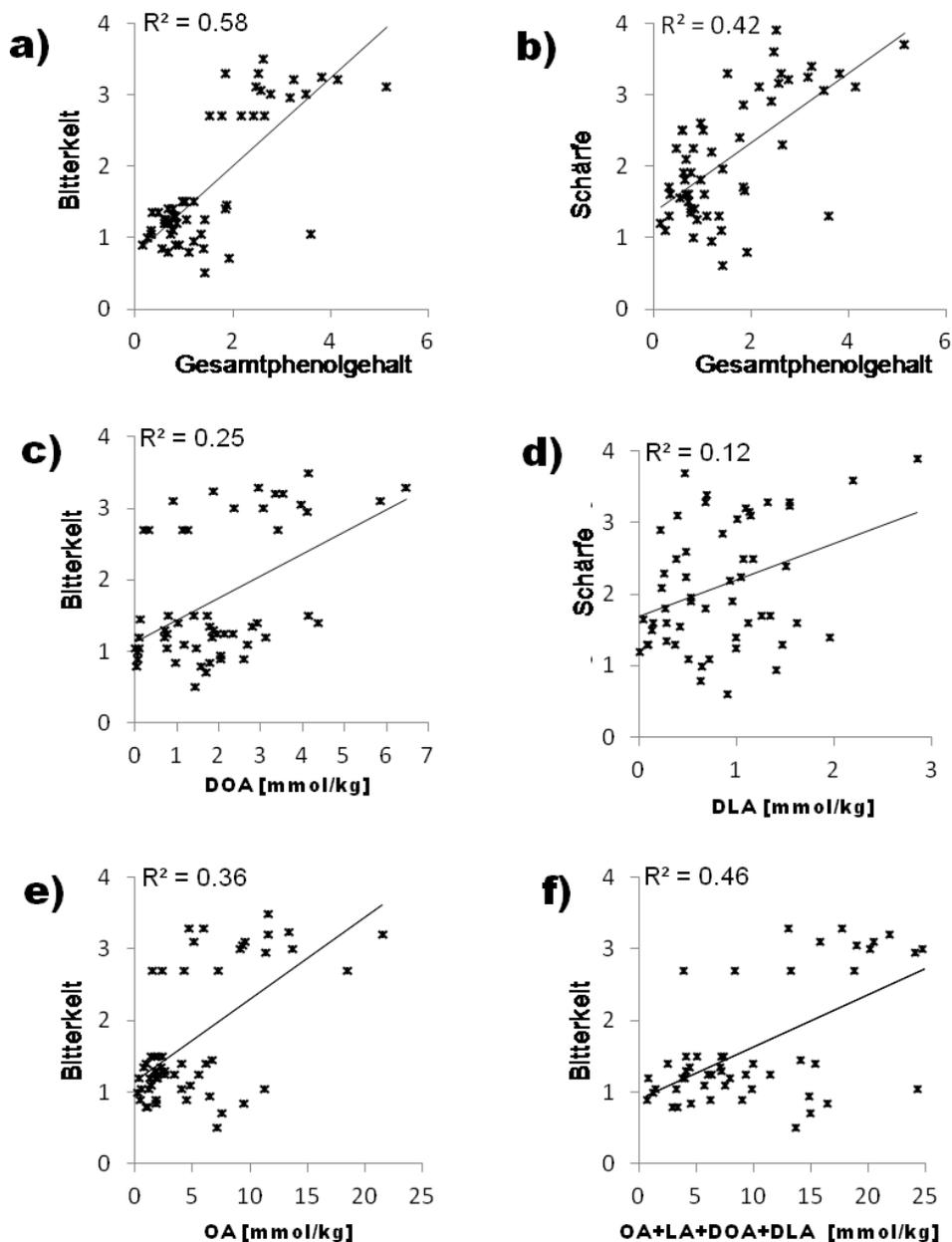
### **3.7 Bestimmung der Bitterkeit/Schärfe**

Die Bitterkeit und die Schärfe eines Olivenöls stellen wichtige Qualitätsparameter dar. Zur instrumentellen Bestimmung der Bitterkeit und Schärfe im Olivenöl wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Der erste beruht auf einer photometrischen Bestimmung der Gesamtphenole und der zweite auf der Quantifizierung ausgewählter hydrophiler Substanzen aus Olivenöl per HPLC-MS. Zur Verfügung stand ein Probenset von 54 Olivenölen (B1-54). Bei diesen Olivenölproben handelt es sich um andere Olivenöle als die 95 Olivenölproben, die zur Bestimmung der Aromastoffe verwendet wurden.

### **3.8 Photometrische Bestimmung**

Die photometrische Methode bietet den Vorteil, dass sie sehr schnell und mit nur sehr geringem instrumentellem Aufwand durchführbar ist. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Bestimmung der Gesamtphenole im Olivenöl handelt es sich um eine modifizierte Bestimmung des  $K_{225}$ -Wertes nach Gutiérrez Rosales et al. (61). Anstatt mittels SPE ( $C_{18}$ ) wurde die Extraktion der hydrophilen Phenole durch eine LLE mit Methanol:Wasser (80:20, v:v) durchgeführt, da die SPE schlechtere Ausbeuten liefert und zudem höhere Materialkosten aufweist (82). Desweiteren wurde die Extinktion des polaren Extraktes nicht bei  $\lambda=225$  nm gemessen, sondern zur selektiven Erfassung der Phenole die von Mateos et al. (53) beschriebene pH-Wert-Abhängigkeit des Extinktionsverhaltens der Phenole bei  $\lambda=274$  nm ausgenutzt. Die ermittelten Gesamtphenolgehalte zeigen nur eine geringe Korrelation ( $R^2=0,58$ ) mit der Bitterkeit bzw. Schärfe. Abbildung 23a-b zeigt die sensorisch ermittelte Bitterkeit bzw. Schärfe gegen den gemessenen Gesamtphenolgehalt aufgetragen. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Gutiérrez Rosales et al. (61), welche eine gute Korrelation

( $R^2=0,84$ ) zwischen dem Gesamtphenolgehalt und der Bitterkeit beschreiben. Mateos et al. (53) berichteten dagegen von einer Sortenabhängigkeit der Korrelation. So zeigten lediglich die Sorten Manzanilla, Picual und Verdial jede für sich alleine betrachtet eine gute Korrelation ( $R^2=0,99$ ;  $R^2=0,94$  bzw.  $R^2=0,98$ ) des Gesamtphenolgehaltes mit der Bitterkeit, wobei sich die Steigungen der Regressionsgeraden stark unterschieden (0,78; 0,94 bzw. 0,46). Für die Sorten Arbequina und Hojiblanca fanden die Autoren Korrelationen von  $R^2=0,53$  bzw.  $R^2=0,60$ .



**Abbildung 23: Lineare Korrelationen von instrumentellen Messgrößen mit der sensorisch bestimmten Bitterkeit bzw. Schärfe. DOA: Decarboxymethyloleuropeinaglycon; DLA Decarboxymethyligstrosidaglycon; OA: Oleuropeinaglycon; LA: Ligstrosidaglycon**

Nicht alle im Olivenöl enthaltenen Phenole leisten denselben bzw. überhaupt einen Beitrag zur Bitterkeit. Damit eine Bestimmung der Bitterkeit über den Gesamtphenolgehalt möglich wäre, müssten die im Olivenöl enthaltenen hydrophilen Phenole immer im gleichen Verhältnis zueinander enthalten sein. Da das Phenolspektrum im Olivenöl allerdings von der Sorte und der Ursprungsregion

abhängig ist, erscheint es leicht nachvollziehbar, dass eine Bestimmung der Bitterkeit von Olivenölen gewonnen aus verschiedenen Olivensorten, welche in unterschiedlichen Regionen gewachsen sind, über den Gesamtphenolgehalt nicht möglich ist.

Betrachtet man die Korrelation des Gesamtphenolgehaltes mit der Bitterkeit für die Olivenölproben aus den drei im Probensatz am meisten vertretenden Regionen (Spanien, Italien und Portugal) jeweils separat, so findet man deutlich bessere Korrelationen ( $R^2=0,76$ ;  $R^2=0,86$  bzw.  $R^2=0,74$ ) und sehr unterschiedliche Steigungen für die jeweilige Region (0,57; 1,13 bzw. 0,73). Die unterschiedlichen Steigungen sind ein klarer Hinweis darauf, dass der Beitrag der einzelnen Phenole zur Bitterkeit stark unterschiedlich ist. So scheinen spanische Olivenöle auf Grund der flachen Steigung der Regressionsgeraden viele phenolische Verbindungen zu enthalten, welche keinen oder nur einen geringen Beitrag zur Bitterkeit haben. Italienische Olivenöle enthalten dagegen anscheinend hauptsächlich Phenole mit bitterem Geschmack, wodurch im Vergleich zu den spanischen Olivenölen eine deutlich größere Steigung erreicht wird als. Daher führt ein hoher Gesamtphenolgehalt in einem spanischen Olivenöl zur gleichen Bitterkeit wie ein mittlerer Gesamtphenolgehalt in einem italienischen Olivenöl. Eine Betrachtung einzelner Sorten ist auf Grund der geringen Probenzahl an Olivenölen, die nur aus einer Sorte gewonnen wurden, nicht möglich.

### **3.9 Selektive Bestimmung hydrophiler Phenole im Olivenöl**

Da die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes nicht zum gewünschten Ziel führte, wurde die Strategie zur Entwicklung einer instrumentellen Methode zur Bestimmung der Bitterkeit auf den Ansatz der selektiven Bestimmung der im Olivenöl vorkommenden Bitterstoffe geändert. Dazu wurde eine HPLC-MS-Methode zur Bestimmung der in der Literatur beschriebenen Bitterstoffe Oleuropeinaglycon (OA), Ligstrosidaglycon (LA), Decarboxymethyl-Oleuropeinaglycon (DOA) und Decarboxymethyl-Ligstrosidaglycon (DLA) entwickelt. In Anlehnung an die in der Literatur beschriebenen Methoden erfolgte die Isolierung der hydrophilen Phenole über eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit einem Gemisch aus Methanol:Wasser (80:20, v:v) und die semiquantitative Bestimmung über eine HPLC-(-)ESI-MS-TOF-Methode

(56, 57). Die semiquantitativen Daten der vier hydrophilen Phenole wurden mit der sensorisch bestimmten Bitterkeit korreliert. Abbildung 23 c-f zeigt die Sensorikdaten gegen die instrumentell ermittelten Daten aufgetragen. Zwar existieren positive Korrelationen zwischen den Gehalten an DOA bzw. OA und der wahrnehmbaren Bitterkeit im Olivenöl, allerdings sind diese wie man an den Korrelationskoeffizienten (DOA:  $R^2=0,25$ ; OA:  $R^2=0,36$ ) sehen kann nicht signifikant. Weder die von Mateos et al. (53) und Siliani et al. (83) ermittelte Korrelation zwischen dem OA-Gehalt und der Bitterkeit, noch die von Gutiérrez Rosales et al. (63) beschriebene Korrelation zwischen dem DOA-Gehalt und der Bitterkeit konnten bestätigt werden. Die Summe aus dem Gehalt der vier hydrophilen Phenole zeigt eine bessere, aber immer noch nicht signifikante Korrelation ( $R^2=0,46$ ) mit der sensorisch ermittelten Bitterkeit. Bezüglich der Schärfe konnte auch keine signifikante Korrelation ( $R^2=0,12$ ) des Gehaltes an DLA, welches von Andrewes et al. (58) als die Schärfe im Olivenöl verursachende Substanz identifiziert wurde, mit dem sensorisch wahrgenommen Scharfgeschmack festgestellt werden.

### **3.10 Identifizierung von Bitter- und Scharfstoffen über eine Profilingmethode**

Da eine Bestimmung der Bitterkeit über die vier in der Literatur beschriebenen Hauptphenole nicht möglich ist, muss von weiteren Verbindungen, welche zur Bitterkeit im Olivenöl beitragen, oder von unterschiedlichen Beiträgen der einzelnen hydrophilen Verbindungen zur Bitterkeit ausgegangen werden. Der Schlüssel zu einem erfolgreichen Modell zur Vorhersage der Bitterkeit und Schärfe von Olivenöl liegt folglich in der Identifizierung sämtlicher bitteren/scharfen Verbindungen im Olivenöl und in der Evaluierung von individuellen Gewichtungsfaktoren, welche die spezifischen Bitterkeit- und Schärfeintensitäten der einzelnen Verbindungen berücksichtigen.

Daher wurde mittels einer HPLC-TOF-MS Profilingmethode nach weiteren potentiellen Bitter- und Scharfstoffen im Olivenöl gesucht. Tabelle 9 zeigt die in der polaren Fraktion von Olivenöl gefundenen Substanzen. Neben den bekannten mengenmäßig am meisten vertretenden Secoiridoid-Derivaten Decarboxymethyl-Ligstrosidaglycon **10**, Decarboxymethyl-Oleuropeinaglycon **11**, Ligstrosidaglycon **15** und Oleuropeinaglycon

**17** wurde auch das Methyl-Oleuropeinaglycon **18** und das Decarboxymethyl-10-hydroxy-Oleuropeinaglycon **12** in den Olivenölproben nachgewiesen. Auffällig ist das Auftreten verschiedener Peaks mit derselben Präzisionsmasse ( $\pm 10$  ppm), welche auf verschiedene Isomere der Verbindungen zurückzuführen sind. Die Entstehung der Isomere und deren Bedeutung für die Olivenölqualität werden weiter unten diskutiert. Mit Hydroxytyrosol **1** und Elenolsäure **5** wurden auch Hydrolyseprodukte der Secoiridoide gefunden. Vertreter anderer Substanzklassen stellen die Flavone Apigenin **7**, Luteolin **8** und Chrysoeriol **9** und das zur Klasse der Lignane gehörende Pinoresinol **13** und Acetoxypinoresinol **19** dar. Desweiteren wurden mit der Azelainsäure **2** und der Myristinsäure **4** zwei Carbonsäuren nachgewiesen. Neben diesen aus der Literatur bekannten hydrophilen Inhaltsstoffen aus Olivenöl wurden weitere Verbindungen in den Olivenölproben ermittelt. Diese wurden mit Hilfe der bestimmten Präzisionsmasse und durch das in MS-MS-Experimenten bestimmte Fragmentierungsmuster identifiziert.

**Tabelle 9: Im Olivenöl gefundene hydrophile Substanzen**

Nr.	Retentions-		<i>m/z</i>		Fehler	Ref.
	zeit	Name	experim.	Formel	[ppm]	
1	3,19	Hydroxytyrosol	153,0556	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	0,8	(28)
2	5,82	Azelainsäure	187,0976	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>	-0,1	(28)
3a	5,55	Elenolaldehyd 1	225,0771	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	-0,7	(56)
3b	6,31	Elenolaldehyd 2	225,0771	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	-0,7	(56)
4	12,34	Myristinsäure	227,2018	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub>	-0,6	(28)
5	6,23	Elenolsäure	241,0723	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	-2,2	(28)
6a	7,07	Elenolsäuremethylester 1	255,0881	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	-2,7	(82)
6b	7,75	Elenolsäuremethylester 2	255,0881	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	-2,7	(82)
7	8,85	Apigenin	269,0460	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	-1,7	(28)
8	7,66	Luteolin	285,0412	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	-2,6	(28)
9	9,11	Chrysoeriol	299,0554	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	2,4	(28)
10	8,06	Decarboxymethyligstrosidaglycon	303,1245	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub>	-2,3	(56)
11	6,91	Decarboxymethyloleuropeinaglycon	319,1193	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub>	-1,8	(56)
12a	4,89	Decarboxymethyl-10-OH-oleuropeinaglycon 1	335,1139	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub>	-0,8	(28)
12b	6,37	Decarboxymethyl-10-OH-oleuropeinaglycon 2	335,1139	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub>	-0,8	(28)
13	7,85	Pinoresinol	357,1333	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub>	3,0	(28)
14	10,25	Dehydroligstrosidaglycon	359,1144	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub>	-2,2	-
15a-i	6,51-10,59	Ligstrosidaglycon 1-9	361,1303	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> O <sub>7</sub>	-2,8	(56)
16	9,14	Dehydrooleuropeinaglycon	375,1097	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub>	-3,1	-
17a-i	5,79-9,52	Oleuropeinaglycon 1-9	377,1254	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>	-3,2	(56)
18a	6,01	Methyloleuropeinaglycon 1	391,1399	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> O <sub>8</sub>	-0,2	(28)
18b	9,11	Methyloleuropeinaglycon 2-8	391,1399	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> O <sub>8</sub>	-0,2	(28)
19	8,06	Acetoxypinoresinol	415,1412	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>8</sub>	-3,3	(28)
20a	7,50	Ligstrosidaglycon + Methanol + Formiat	439,1618	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> O <sub>10</sub>	-1,9	-
20b	7,88	Ligstrosidaglycon + Methanol + Formiat	439,1618	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> O <sub>10</sub>	-1,9	-

Substanz **6** (*m/z* [M-H]<sup>-</sup> 255,0874) wurde von Inarejos-Garcia et al. nachgewiesen, aber nicht identifiziert (82). Es treten zwei verschiedene Isomere **6a** (*t<sub>r</sub>*=7,07 min) und **6b** (*t<sub>r</sub>*=7,07 min) mit derselben Präzisionsmasse auf. Aus der vom Massenspektrometer bestimmten Präzisionsmasse lässt sich über die exakten Atommassen die Summenformel der Verbindung berechnen. Aus der Masse des Ions, *m/z* [M-H]<sup>-</sup> 255,0874, welches durch Verlust eines Protons aus dem ursprünglichen Molekül hervorgegangen ist, ergibt sich die Summenformel C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> (Abweichung -2,7 ppm). Das Fragmentierungsmuster des Isomers **6a** weist große Ähnlichkeit mit dem Fragmentierungsmuster der Secoiridoide Oleuropeinaglycon und Ligstrosidaglycon auf,

so dass es sich bei Verbindung **6a** vermutlich um einen Ester der Elenolsäure handelt. Das MS-MS-Spektrum und ein mögliches Fragmentierungsschema, welches von dem von Fu et al. (84) für das Oleuropeinaglycon beschriebene Fragmentierungsschema abgeleitet wurde, sind in Abbildung 24 dargestellt. Der Verlust von CH<sub>4</sub>O bzw. C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O vom Mutterion *m/z* 255 führt zu den Ionen [M-H-CH<sub>4</sub>O]<sup>-</sup> (*m/z* 223) und [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>-</sup> (*m/z*=185), welche durch Abspalten des jeweils anderen Fragmentes zum Ion [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O-CH<sub>4</sub>O]<sup>-</sup> (*m/z* 153) zerfallen. Das Fragment *m/z* 125 ist das Resultat des Verlustes von CH<sub>3</sub>OCO vom Fragment [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>-</sup>(*m/z* 185). Bei der Verbindung **6a** handelt es sich demnach vermutlich um Elenolsäuremethylester.

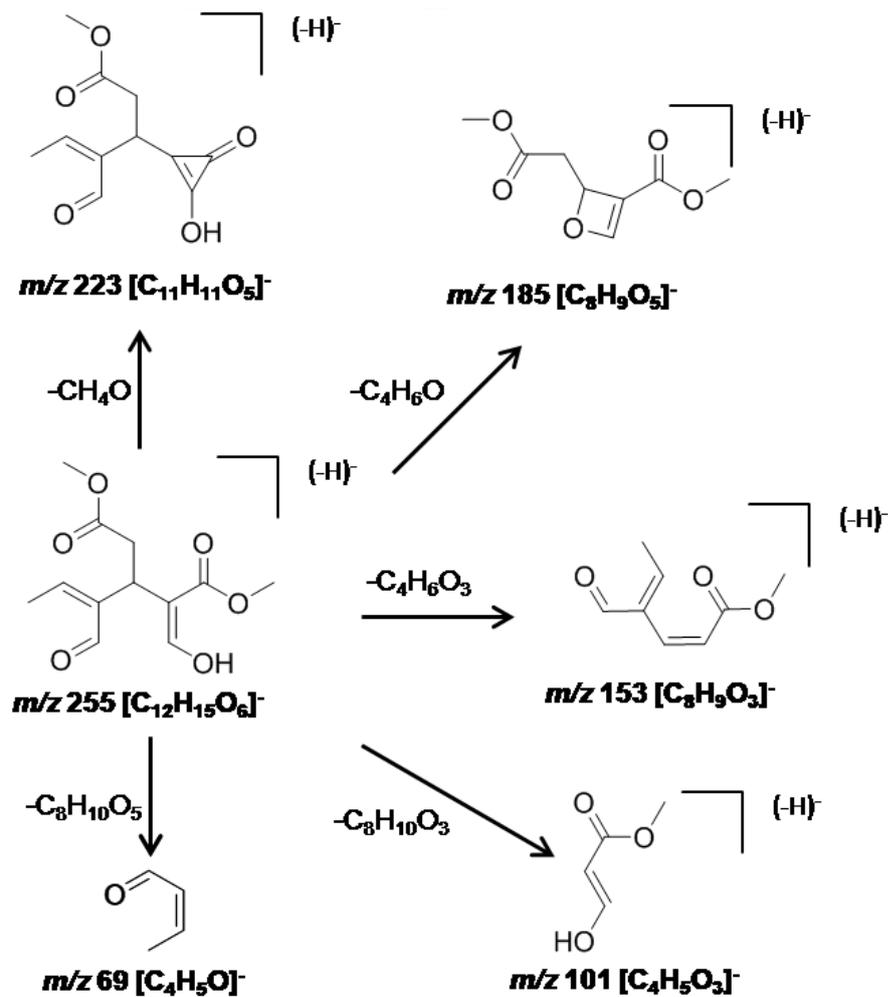
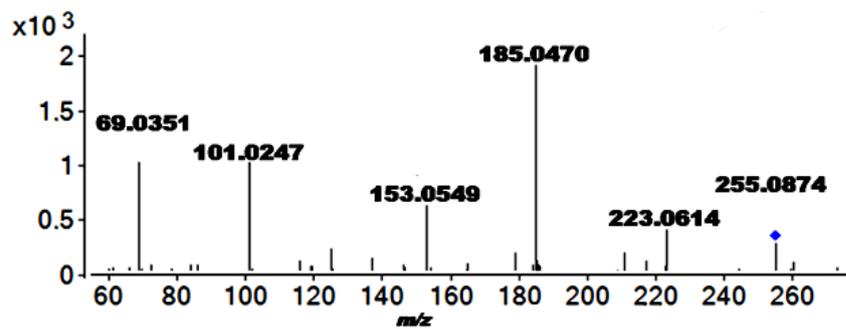


Abbildung 24: MS-MS-Spektrum und mögliches Fragmentierungsschema von Substanz 6a, vorläufig identifiziert als Elenolsäuremethylester (offene Form)

Das Isomer **6b** zeigt ein anderes Fragmentierungsverhalten (cf. Abb. 25). Hier führt der Verlust von  $CH_3OH$  bzw.  $CO_2$  vom Mutterion  $m/z\ 255$  zu den Ionen  $[M-H-CH_3OH]^-$  ( $m/z\ 223$ ) und  $[M-H-CO_2]^-$  ( $m/z\ 211$ ), welche durch Abspalten des jeweils anderen Fragmentes zum Ion  $[M-H-CH_3OH-CO_2]^-$  ( $m/z\ 179$ ) zerfallen. Eine weitere Abspaltung

von CH<sub>4</sub>O führt zum Ion [M-H-CH<sub>4</sub>O-CO<sub>2</sub>-CH<sub>4</sub>O]<sup>-</sup> (*m/z* 147). Trotz der Unterschiede im Fragmentierungsmuster wird davon ausgegangen, dass es sich bei der Verbindung **6b** um ein Isomer des Elenolsäuremethylesters handelt, da bei Wiederholmessungen Verschiebungen der Signalintensitäten vom Peak der Verbindung **6a** zum Peak der Verbindung **6b** und umgekehrt zu beobachten waren. Dies lässt sich nur durch eine Umlagerung vom Isomer **6a** zum Isomer **6b** bzw. umgekehrt erklären. Ausgehend von den beobachteten Fragmentierungsreaktionen handelt es sich beim Isomer **6a** vermutlich um die offene Struktur und beim **6b** um die cyclische Struktur des Elenolsäuremethylesters. Diese Verbindung ist das Aglycon des Dimethyloleosids und gelangt vermutlich durch Hydrolyse des in Oliven oder Olivenblättern vorkommenden Dimethyloleosids während der Ölgewinnung ins Olivenöl.

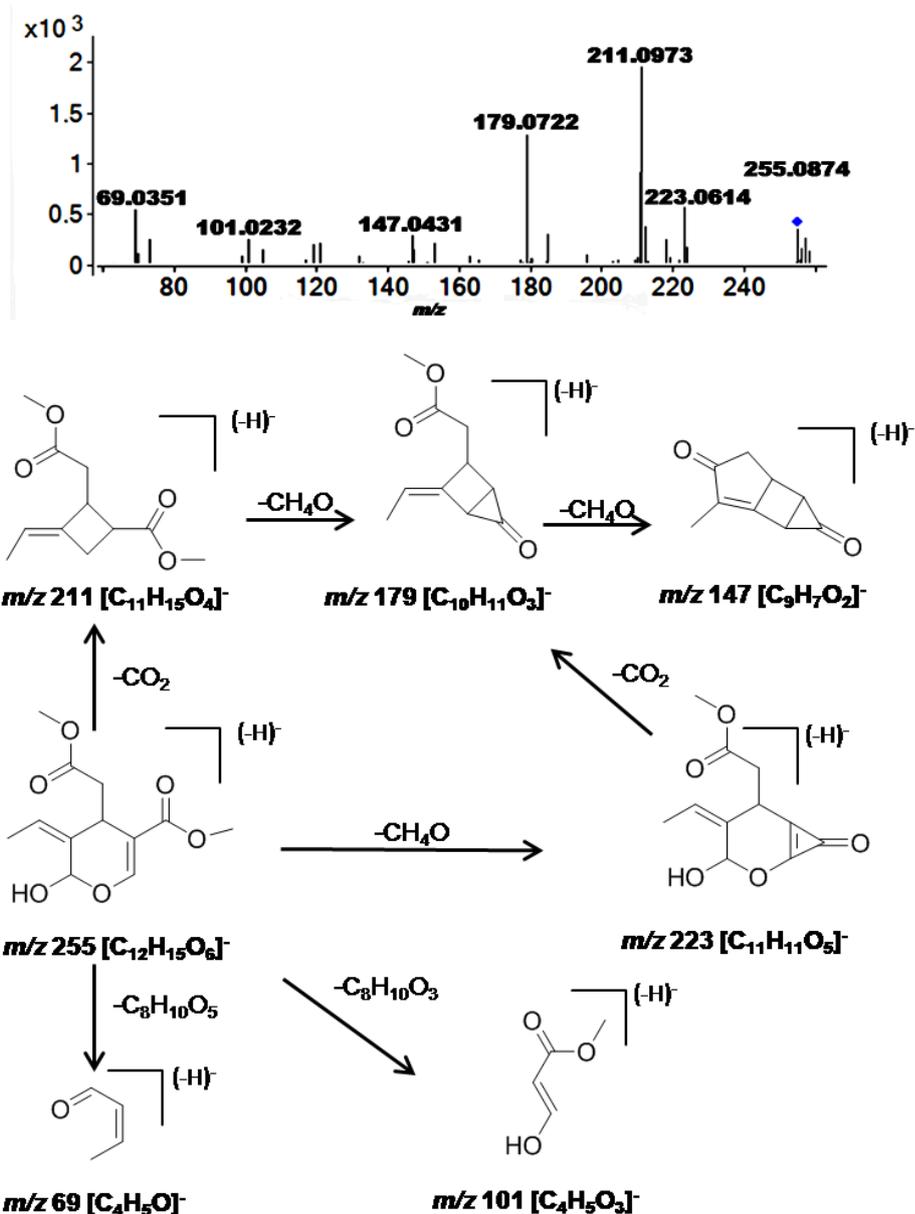


Abbildung 25: MS-MS-Spektrum und mögliches Fragmentierungsschema von Substanz 6b, vorläufig identifiziert als Elenolsäuremethylester (cyclische Form)

Verbindung **3** ( $m/z$  [M-H] 225,0771) wurde von Carrasco-Pancorbo (56) nachgewiesen, aber nicht identifiziert. Zwei verschiedene Isomere **3a** ( $t_r=5,55$  min) und **3b** ( $t_r=6,31$  min) mit derselben Präzisionsmasse wurden analysiert. Die aus der Molekülmasse berechnete Summenformel ist  $C_{11}H_{12}O_5$  (Abweichung -0,7 ppm). Das MS-MS-Spektrum (cf. Abb. 26) des Isomers **3b** weist eine sehr große Ähnlichkeit zum

MS-MS-Spektrum von der Substanz **6b** auf. Der Verlust von CH<sub>3</sub>OH bzw. CO<sub>2</sub> vom Mutterion  $m/z=225$  führt zu den Ionen [M-H-CH<sub>4</sub>O]<sup>-</sup> ( $m/z$  193) und [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> ( $m/z$  181), welche durch Abspalten des jeweils anderen Fragmentes zum Ion [M-H-CH<sub>4</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> ( $m/z$  149) zerfallen. Diese Fragmente entsprechen den jeweiligen Fragmenten der Verbindung **6b** abzüglich einer Differenz von 30 amu. Diese Differenz, welche dem Strukturelement CH<sub>2</sub>O entspricht, kommt vermutlich durch eine Reduktion einer der Carboxymethylgruppen zum Aldehyd zustande. Für eine Aldehydfunktion spricht auch der Verlust von CO, welcher vom Ion [M-H-CH<sub>4</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> ( $m/z$  149) zum Ion [M-H-CH<sub>4</sub>O-CO<sub>2</sub>-CO]<sup>-</sup> ( $m/z$  121) führt. Bei der Verbindung **3a** muss es sich um ein Isomer der Verbindung **3b** handeln, da auch bei diesen Substanzen eine Umlagerung in das jeweils andere Isomer beobachtet wird. Das MS-MS-Spektrum (cf. Abb. 27) von Verbindung **3a** besteht aus lediglich 2 Hauptfragmenten, die quasi aus einer „Halbierung“ des Moleküls hervorgehen. Durch den Verlust von C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> entsteht das Ion [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup> ( $m/z$  123) und durch Abspaltung von C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> das Ion [M-H-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> ( $m/z$  101) jeweils aus dem Mutterion [M-H] ( $m/z$  225). Ausgehend von diesen Beobachtungen und den Überlegungen für Verbindung **6** handelt es sich bei Substanz **3a** um die offene und bei Substanz **3b** um die cyclische Form des Elenolaldehyds (4-Formyl-2-(hydroxymethylen)-3-(2-oxoethyl)-4-hexensäuremethylester).

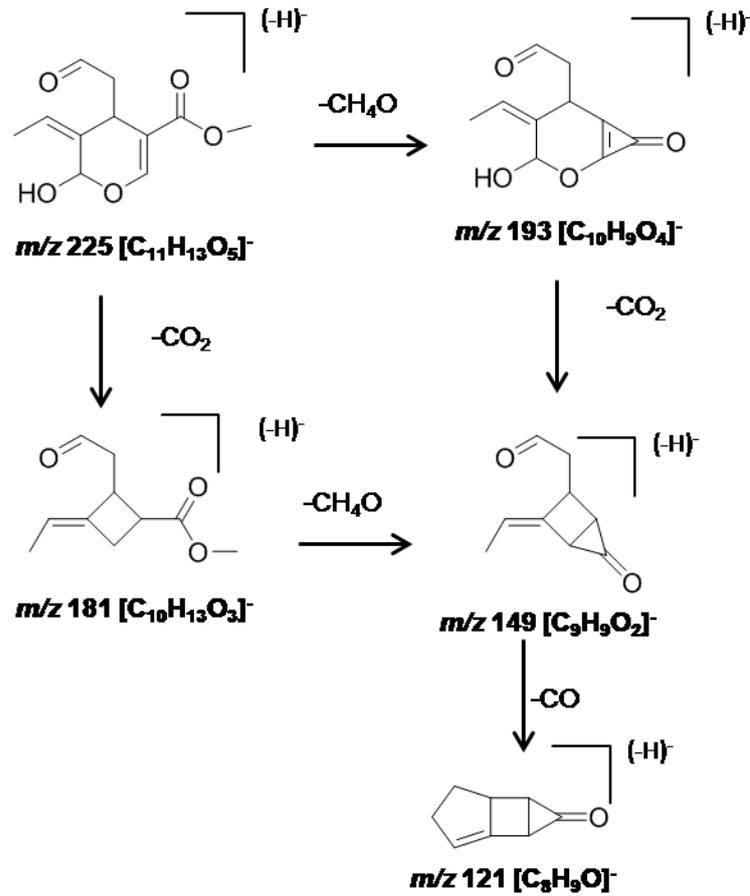
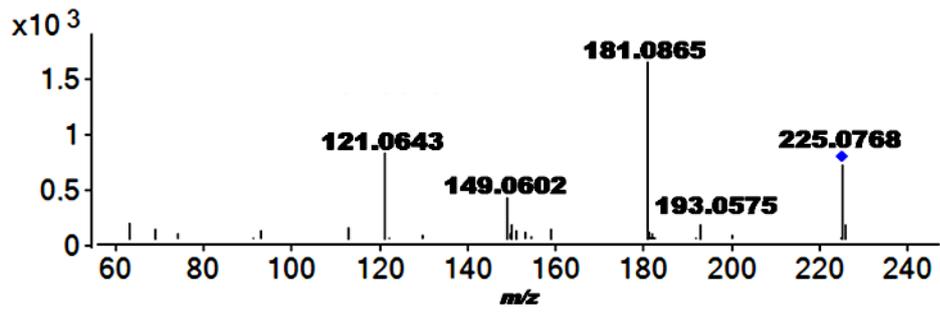


Abbildung 26: MS-MS-Spektrum und mögliches Fragmentierungsschema von Substanz 3b, vorläufig identifiziert als Elenolaldehyd (cyclische Struktur)

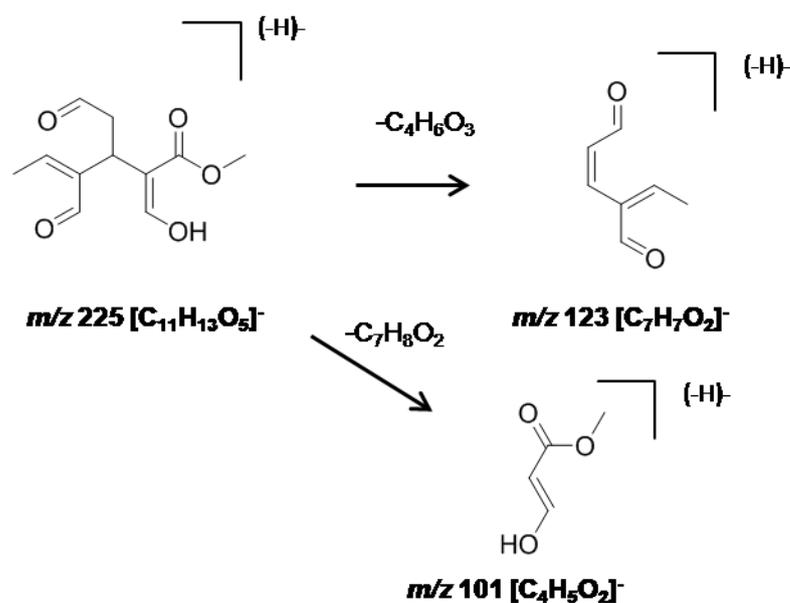
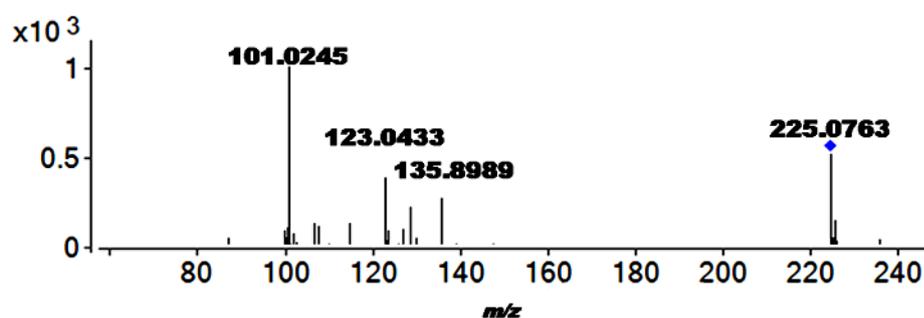


Abbildung 27: MS-MS-Spektrum und mögliches Fragmentierungsschema von Substanz 3a, vorläufig identifiziert als Elenolaldehyd (offene Struktur)

Für Verbindung **16** ( $m/z$   $[M-H]^-$  375,1097) ergibt sich die Summenformel  $C_{19}H_{20}O_8$  (Abweichung -3,1 ppm). Diese enthält zwei Wasserstoffatome weniger als die Summenformel vom Oleuropeinaglycon ( $C_{19}H_{22}O_8$ ). Auch die im MS-MS-Spektrum auftretenden Hauptfragmente ( $m/z$  239, 179 und 137) weisen eine um 2 amu geringere Masse auf, als die entsprechenden Fragmente im MS-MS-Spektrum des Oleuropeinaglycon ( $m/z$  241, 181 und 139). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei Verbindung **16** um ein Dehydroderivat des Oleuropeins handelt. Anhand des MS-MS-Spektrums kann der Verlust der beiden Wasserstoffatome im Elenolsäurerest lokalisiert werden, da die oben genannten Fragmente keinen Hydroxytyrosolrest mehr enthalten. Interessant ist, dass von Verbindung **16** im Gegensatz zum Oleuropeinaglycon mit 9

Isomeren lediglich ein Isomer nachgewiesen werden konnte. Der Verlust von zwei Wasserstoffatomen führt offensichtlich zur Ausbildung einer gegenüber Isomerisierungsreaktionen stabilen Verbindung.

Verbindung **14**  $m/z$  [M-H]<sup>-</sup> 359,1144 hat die Summenformel C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub> (Abweichung - 2.2 ppm). Trotz fehlender MS-MS-Daten wird davon ausgegangen, dass es sich analog zu Verbindung **16** um ein Dehydroderivat vom Ligstrosidaglycon handelt.

**Tabelle 10: Hauptsignale im MS-MS-Spektrum von hydrophilen Substanzen im Olivenöl**

Nr.	Formel	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>	Hauptsignale MS-MS (-)ESI	Ref. <sup>a</sup>
3a	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	225,0771	123,04; 101,02	-
3b	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	225,0771	193,06; 181,09; 149,06; 121,06	-
5	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	241,0718	165,06; 139,00; 127,04; 121,03; 101,03; 95,05	(85)
6a	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	255,0874	223,07; 185,05; 101,02; 69,04	-
6b	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	255,0874	223,07; 211,10; 179,07; 147,04; 101,03; 69,04	-
10	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub>	303,1238	285,12; 183,07; 179,07; 165,06; 59,01	(86)
11	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub>	319,1187	249,08; 195,07; 183,07; 139,04; 95,05; 69,04	(86)
15	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> O <sub>7</sub>	361,1293	291,09; 259,10; 101,03	(28)
16	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub>	375,1097	239,05; 195,07; 179,03; 137,03	-
17	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>	377,1242	307,08; 275,09; 149,02; 95,05	(84)
20	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> O <sub>10</sub>	439,1618	361,13; 291,09; 259,10; 101,03	-

**a MS-MS-Spektren zeigen Übereinstimmung mit den in der jeweiligen Literatur aufgeführten MS-MS-Spektren**

Aus der Präzisionsmasse lässt sich für Substanz **20** ( $m/z$  439,1618) die Summenformel C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>10</sub> (Abweichung -1,9 ppm) bestimmen. Das Fragmentierungsmuster von Substanz **20** ( $m/z$  361; 291; 259; 101) weist mehrere identische Signale mit dem Fragmentierungsmuster vom Ligstrosidaglycon ( $m/z$  361; 291; 259; 101) auf. Zusätzlich haben die beiden Isomere **20a** und **20b** die gleiche Retentionszeit (7,50 min und 7,88 min) wie die Isomere **15a** und **15b** des Ligstrosidaglycon. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei Substanz **20** um ein Addukt aus Methanol (CH<sub>3</sub>OH, 32 amu) und Formiat

(HCOO<sup>-</sup>, 45 amu) handelt, welches während der Ionisierung gebildet wird. Diese Vermutung konnte durch Messungen im positiven Modus bestätigt werden, da hier bei den Retentionszeiten 7,50 min und 7,88 min das Ion mit der Masse  $m/z$  417,1489 detektiert wurde, welches einem Addukt aus Ligstrosidaglycon (362 amu), Methanol (32 amu) und einem Natriumion (23 amu) entspricht. Bemerkenswert ist, dass die Adduktbildung offensichtlich nur bei den beiden Isomeren **15a** und **15b** in großen Maßen stattfindet.

Bei den Secoiridoiden Ligstrosidaglycon **15** und Oleuropeinaglycon **17** wurden neun verschiedene Isomere detektiert. Fu et al. konnten in verschiedenen Olivenölproben für das Oleuropeinaglycon sogar 11 und für das Ligstrosidaglycon 10 verschiedene Isomere nachweisen (28). Die Entstehung der verschiedenen isomeren Formen geht auf Keto-Enol-Umlagerungen und Ringöffnungsreaktionen zurück. Die Struktur der möglichen Isomere und deren Entstehungsreaktionen sind in Abbildung 28 dargestellt (28, 84). Die teils sehr unterschiedlichen Strukturen, offene oder cyclische Struktur, erklären das stark abweichende chromatographische Verhalten der Isomeren und die damit verbundenen unterschiedlichen Retentionszeiten von 6,5 min – 10,5 min für das Ligstrosidaglycon bzw. 5,8 min – 9,5 min für das Oleuropeinaglycon. Da es sich bei den meisten der Reaktionen um Gleichgewichtsreaktionen handelt, deren Lage vermutlich leicht durch Parameter wie pH-Wert, Art des Lösungsmittels, Temperatur und Gesamtkonzentration der jeweiligen Verbindung beeinflusst wird, muss überprüft werden, ob die verschiedenen Isomere bereits im Olivenöl vorliegen oder diese erst während der Extraktion gebildet werden. Dazu wurden drei verschiedene Olivenölproben jeweils dreimal extrahiert und die Verteilung der Isomeren vom Ligstrosidaglycon und Oleuropeinaglycon verglichen. Abbildung 29 zeigt die Massenspuren  $m/z$  361,13 (Ligstrosidaglycon) und  $m/z$  377,13 (Oleuropeinaglycon) für die drei verschiedenen Olivenölproben. Die Verteilung der Isomere unterscheidet sich zwischen den Olivenölproben deutlich. So weist Probe a eine gleichmäßige Verteilung zwischen den Ligstrosidaglycon-Isomeren **a**, **b**, **d**, **h** und **i** auf, während in den Proben b das Isomer **d** dominiert und in Probe c die Isomere **h** und **i**. Die Verteilung der Isomere vom Oleuropeinaglycon unterscheidet sich ebenfalls zwischen den Olivenölproben. Probe a enthält hauptsächlich die Isomere **c**, **d**, **g** und **h**, während in Probe b und c hauptsächlich die Isomere **a**, **b**, **g** vorkommen. Vergleicht man die Isomerenverteilung

verschiedener Extraktionen aus einer Olivenölprobe, so erkennt man nur geringe Unterschiede im Peakmuster.

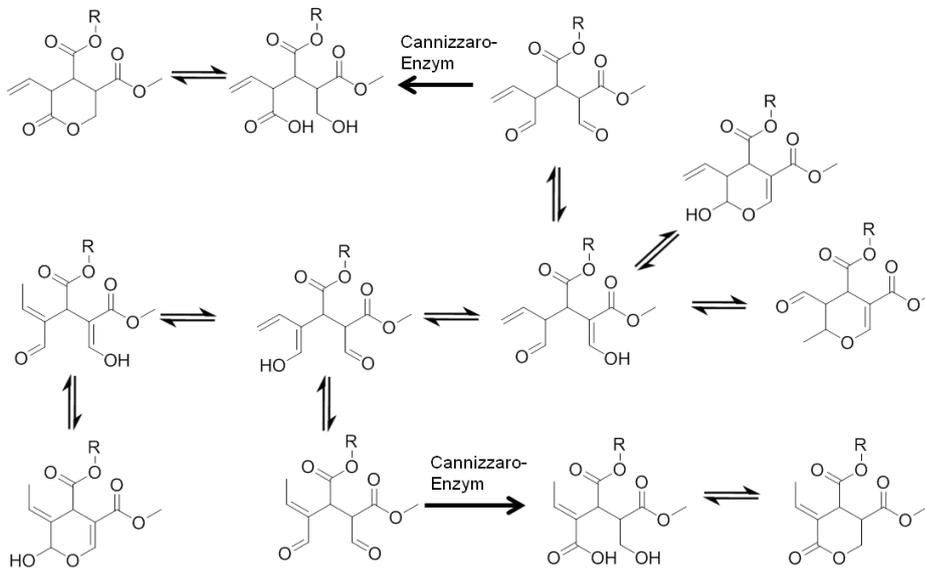


Abbildung 28: Isomerisationsreaktionen vom Ligstrosideglycon (R=Tyrosol) und Oleuropeinaglycon (R=Hydroxytyrosol) publiziert von Fu et al. (28, 84)

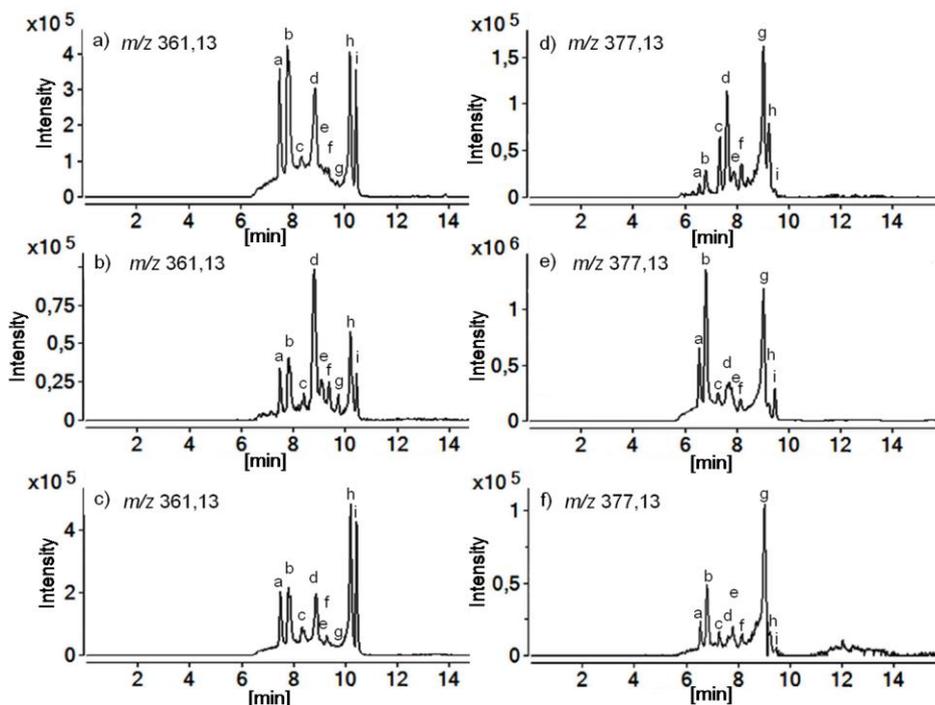
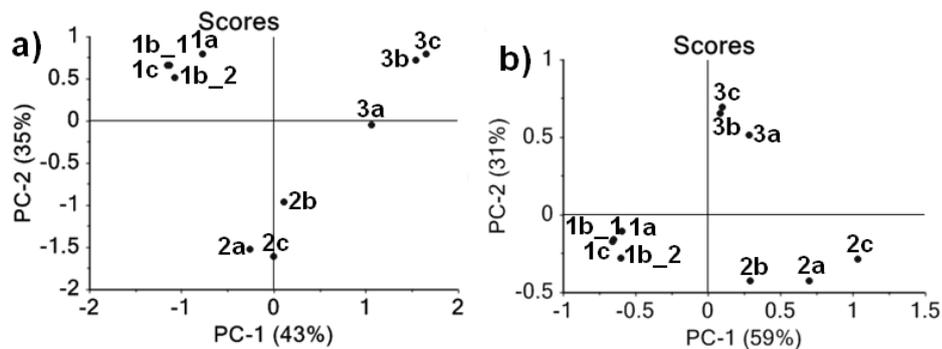


Abbildung 29: Isomerenverteilung vom Ligstrosideglycon ( $m/z$  361,13) und Oleuropeinaglycon ( $m/z$  377,13) in drei verschiedenen Olivenölproben.

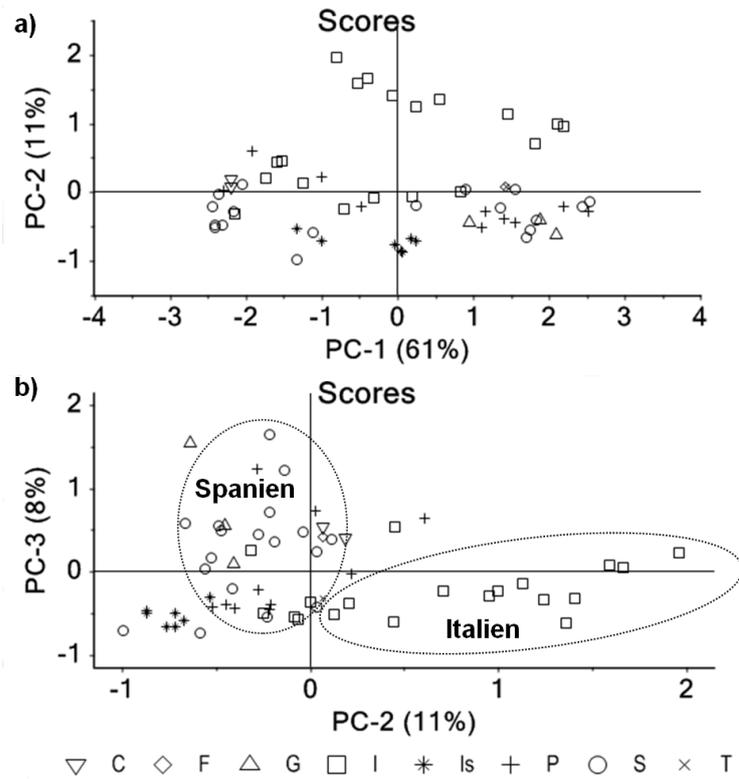
Zur Verdeutlichung, dass die Unterschiede zwischen den Olivenölproben größer sind als die Unterschiede zwischen den Wiederholmessungen, wurde von den beiden Massenspuren  $m/z$  361,13 und  $m/z$  377,13 eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Wie man an den Scores-Plots (Abb. 30) erkennen kann, bilden die Wiederholmessungen der Olivenölproben Cluster, die deutlich voneinander getrennt sind. Eine Umlagerung der Isomere während der Extraktion oder während der chromatographischen Trennung kann somit ausgeschlossen werden und die Unterschiede in der Isomerenverteilung müssen bereits im Olivenöl vorhanden sein.



**Abbildung 30: Scores-Plots a  $m/z$  361 b  $m/z$  377. Dreifachbestimmung von drei verschiedenen Olivenölproben. Probe 1b wurde zweimal aus demselben Vial injiziert.**

Die unterschiedliche Verteilung der Isomere in den Olivenölen geht vermutlich auf unterschiedliche Prozessparameter (z.B. Art der Zerkleinerung, Malaxationszeit und -temperatur) bei der Olivenölgewinnung und/oder eine unterschiedliche Enzymausstattung abhängig von Olivensorte und Anbauregion zurück. Um den Einfluss der Anbauregion auf die Isomerenverteilung zu betrachten, wurde die Varianz innerhalb der Massenspuren  $m/z$  361,13 im Retentionszeitenbereich von 6,3 min bis 10,3 min und  $m/z$  377,13 im Bereich von 5,8 min bis 10,2 min von allen Olivenölproben über eine PCA untersucht. Da sich die Gehalte an Ligstrosidaglycon und Oleuropeinaglycon zwischen den Olivenölproben sehr stark unterscheiden, wurde die jeweils größte Signalhöhe der Massenspuren auf 1 normiert und die restlichen Signale entsprechend angepasst. Abbildung 31a zeigt den Scores-Plot für PC1 und PC2 und Abbildung 31b für PC2 und

PC3. Auf der ersten Hauptkomponente (PC1) erfolgt eine Trennung nach dem Gesamtgehalt der beiden hydrophilen Phenole. Die Olivenölproben mit einem hohen Gesamtgehalt an Phenolen befinden sich im positiven Bereich der X-Achse (PC1) und die Olivenölproben mit niedrigen Gehalten im negativen Bereich. Offensichtlich hat die Konzentration einen Einfluss auf die Isomerenverteilung. Die Loadings für PC1 sind in Abbildung 32a dargestellt. Die Isomere **15a**, **15b** und **15d** zeigen eine starke positive Korrelation mit PC1 und die Isomere **15h** und **15i** eine stark negative Korrelation mit PC1. Eine höhere Konzentration der beiden Secoiridoide führt folglich zu einer Verschiebung zu den Isomeren mit geringeren Retentionszeiten. Bei der Betrachtung von PC2 fällt die Separation von zehn italienischen Olivenölproben (Symbol □) zu den restlichen Olivenölproben auf. Wie man den Loadings (Abb. 32b) für PC2 entnehmen kann, geht diese Abtrennung hauptsächlich auf die Isomere **15d**, **17c** und **17d** zurück. Eine Separation der Olivenölproben nach ihrer Herkunft wird bei der Betrachtung der Scores-Plots von PC2 und PC3 deutlich. Die italienischen Olivenöle zeigen eine positive Korrelation mit PC2 und eine schwach negative Korrelation mit PC3. Die spanischen Olivenöle hingegen weisen eine schwach negative Korrelation mit PC2 und eine stark positive mit PC3 auf. PC3 ist hauptsächlich durch eine stark negative Korrelation mit dem Isomer **15h** und einer positiven Korrelationen der Isomere **15i**, **17a** und **17b** gekennzeichnet (cf. Abb. 32c). Für die portugiesischen Olivenöle, welche die drittgrößte Gruppe innerhalb der untersuchten Olivenölproben darstellen, ergibt sich für PC2 und PC3 eine etwa gleich große Korrelation, wodurch diese Proben im Scores-Plot zwischen den italienischen und spanischen Proben liegen. Die Probenanzahl der anderen Herkunftsregionen ist für eine allgemeine Aussage zu gering, jedoch scheinen diese Olivenöle eher den spanischen Olivenölen ähnlich zu sein als den italienischen. Eine Betrachtung einzelner Olivensorten ist auf Grund der geringen Anzahl von Olivenölen aus derselben Olivensorte nicht möglich. PC2 und PC3 erklären beide nur einen geringen Anteil (11 % und 8 %) der Gesamtvarianz. Der größte Anteil (61 %) an den Unterschieden in der Isomerenverteilung wird durch PC1 erklärt und kommt somit durch Unterschiede im Gesamtgehalt an den Secoiridoiden zustande. Wie die Unterschiede in der Isomerenverteilung zustande kommen und ob eine Unterscheidung von Olivenölen unterschiedlicher Herkunft über das Isomerenmuster möglich ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.



**Abbildung 31: Scores-Plots a PC1 und PC2 b PC2 und PC3. PCA der Massenspuren 361 und 377**  
**S: Spanien; I: Italien; G: Griechenland; C: Kalifornien (USA); T: Türkei; Is: Israel; P: Portugal;**  
**F: Frankreich**

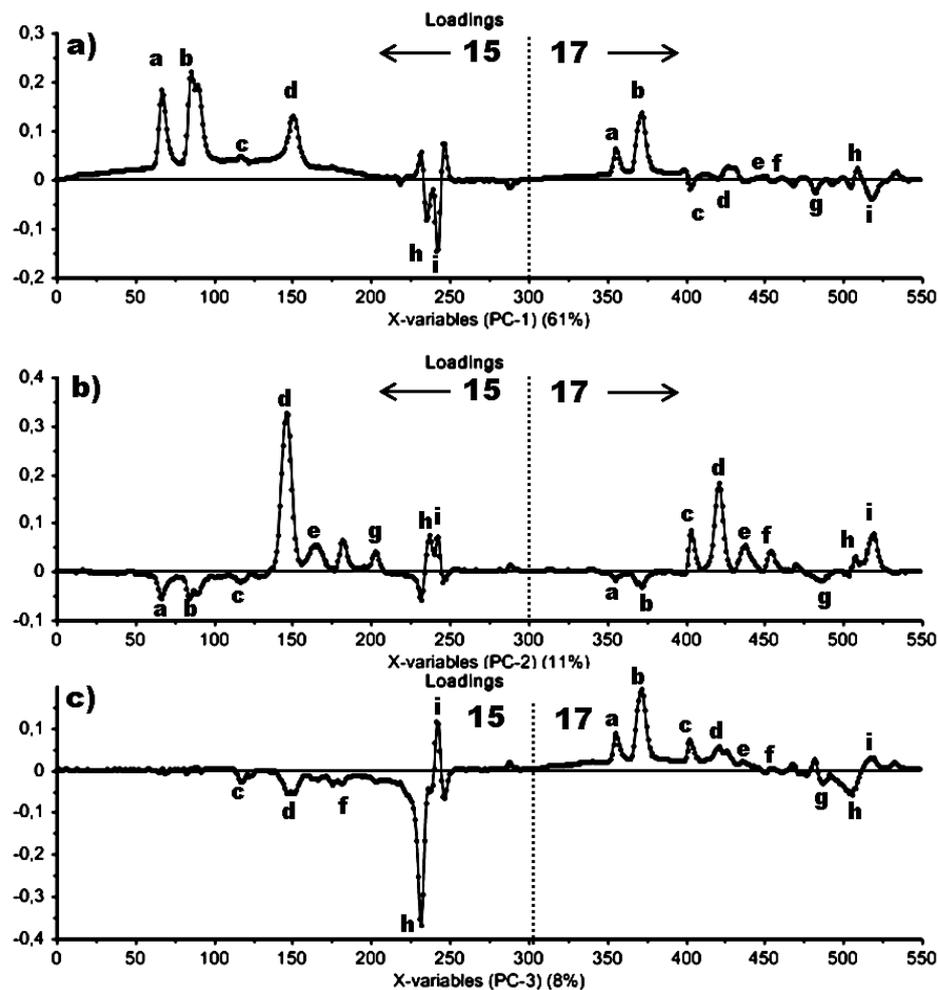


Abbildung 32: Loadings a) PC1 b) PC2 c) PC3.

Unterschiede in der Bitter- bzw. Schärfeintensität zwischen den einzelnen Isomeren konnten über statistische Methoden (PLS-R) nicht festgestellt werden. Daher wurden für die Entwicklung von Regressionsmodellen die Isomere nicht einzeln betrachtet, sondern die Gesamtpeakfläche durch Integration über sämtliche Isomere **15a-i** bzw. **17a-i** bestimmt. Ob die einzelnen Isomere Unterschiede in der Bitterkeit/Schärfe aufweisen, müsste durch sensorische Untersuchung des HPLC-Eluats bestimmt werden. Diese Technik der Kopplung von HPLC-Trennung und geschmacklicher Charakterisierung wird analog zur GC/O mit dem Begriff „LC-Taste“ bezeichnet. Desweiteren müsste durch präparative Trennung der Isomeren und anschließender Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie die in der Literatur (87) beschriebenen isomeren Strukturen den einzelnen Peaks zugeordnet werden. Hierfür würde sich

eventuell die von Christophoridou et al. beschriebene Kopplungstechnik von Flüssigchromatographie mit anschließender Nachsäulen-Festphasenextraktion und Kernspinresonanzspektroskopie (LC-SPE-NMR) anbieten (88). Eine Unterscheidung der Isomere über die MS-MS-Spektren ist nicht möglich, da sämtliche Isomere dasselbe Fragmentierungsmuster aufweisen.

Die in Tabelle 9 aufgelisteten Substanzen wurden über den in bekannter Konzentration zugesetzten internen Standard 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure in den 54 Olivenölproben semiquantitativ bestimmt. Die semiquantitativen Daten sind in Tabelle A2 im Anhang zusammengestellt, beruhen jedoch lediglich auf einer Einfachbestimmung. Allerdings wurde über eine Dreifachbestimmung von drei Olivenölproben der mittlere Variationskoeffizient für sämtliche Massenspuren bestimmt. Die mittleren Variationskoeffizienten betragen maximal 20 %, so dass die Abweichung bedingt durch unterschiedliche Ausbeuten bei der Extraktion, Volumen- oder Injektionsfehler und vor allem durch Integrationsfehler im Vergleich zu den Gehaltsunterschieden zwischen den Olivenölproben vernachlässigt werden kann.

Ein Vergleich der Gehalte der verschiedenen hydrophilen Substanzen untereinander ist nur sehr bedingt möglich, da bei der Bestimmung der Gehalte weder die Wiederfindungsraten der Flüssig-Flüssig-Extraktion noch der Responsefaktor der Substanzen berücksichtigt wurde. Auf Grund der unterschiedlichen Polaritäten und Molekulargewichte der Substanzen können sich die Wiederfindungsraten stark unterscheiden. Auch der Responsefaktor sollte für die Substanzen auf Grund der unterschiedlichen Ionisierbarkeiten stark unterschiedlich sein. Dennoch lässt sich sagen, dass das Oleuropeinaglycon **17** und das Ligstrosidaglycon **15** in allen Ölen die mengenmäßig am stärksten vertretenden hydrophilen Substanzen darstellen, während Verbindungen wie Elenolsäuremethylester und Elenolaldehyd eher Minorcomponenten darstellen.

Um die Bedeutung der einzelnen Verbindungen für die Bitterkeit und Schärfe zu bestimmen, wurden die Analysendaten mit den vom Sensorikteam ermittelten Intensitäten für die Bitterkeit und Schärfe der verschiedenen Olivenölproben über eine Partial Least Square Regression (PLS-R) korreliert. Die Rohdaten wurden vor der Berechnung mittenzentriert und durch Division durch die Standardabweichung skaliert,

damit die Varianz innerhalb der Variablen von der Größenordnung unabhängig wird (68). Abbildung 33 zeigt den Korrelation-Loadings-Plot des berechneten PLS-R-Modells für die Korrelation mit der Bitterkeit. Dargestellt ist die Korrelation der einzelnen Variablen mit den ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2). Die beiden Kreise stellen die relative erklärte Varianz durch die Variablen dar. Der innere Kreis entspricht dabei 50 % und der äußere 100 % erklärte Varianz. Variablen, welche im inneren Kreis nahe dem Koordinatenursprung liegen, tragen nicht sehr viel zu der Gesamtvarianz bei und weisen auch keine ausgeprägte Korrelation mit den Hauptkomponenten auf. Variablen zwischen den beiden Kreisen tragen dagegen viel zur Gesamtvarianz bei und sind auch stark mit den dargestellten Hauptkomponenten korreliert. Wie man sieht, ist die Bitterkeit stark positiv mit der ersten Hauptkomponente (PC 1)  $r_{\text{Bitterkeit, PC1}} = 0,793$  und schwach positiv mit der zweiten Hauptkomponente (PC 2)  $r_{\text{Bitterkeit, PC2}} = 0,328$  korreliert. Insgesamt erklären die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC 2) 74 % ( $r^2 = r^2_{\text{Bitterkeit, PC1}} + r^2_{\text{Bitterkeit, PC2}}$ ) der Gesamtvarianz in den Originaldaten der Bitterkeit. Variablen, die ebenfalls eine positive Korrelation mit diesen beiden Hauptkomponenten zeigen, korrelieren demnach auch positiv mit der Bitterkeit und sind somit interessant für eine Bestimmung der Bitterkeit. Tabelle 11 zeigt die Korrelationskoeffizienten der Variablen für die ersten beiden Hauptkomponenten. Die Substanzen **3b**, **5**, **6a**, **6b**, **10**, **11**, **12a**, **14**, **15a-i**, **16**, **17a-i**, **20a** und **20b** zeigen eine starke Korrelation mit der Bitterkeit, während die Verbindungen **1**, **4**, **9**, **13**, **18a** und **19** eine negative Korrelation mit der Bitterkeit aufweisen. Die Substanzen **2**, **3a**, **7**, **8**, **12b** und **18b** sind nur schwach positiv mit der Bitterkeit von Olivenöl korreliert.

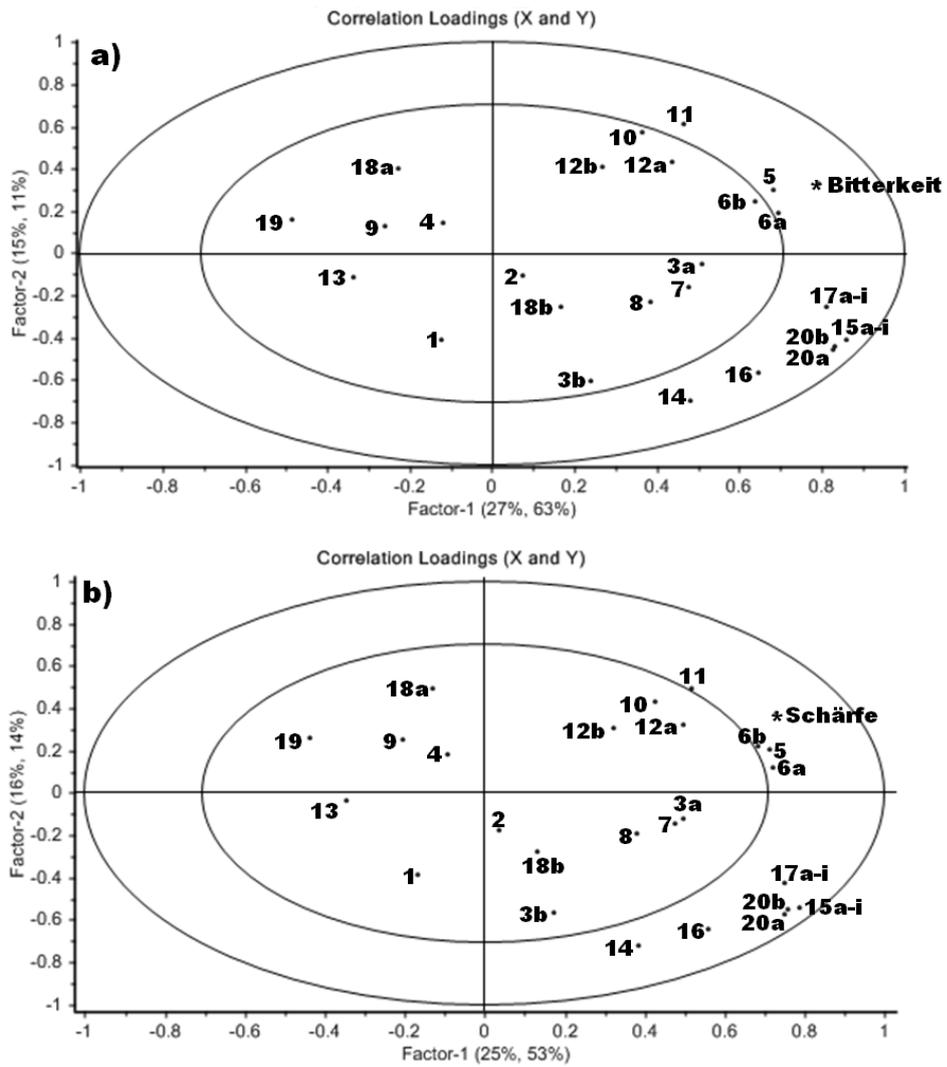


Abbildung 33: Korrelations-Loadings-Plot. PLS-R: Zielgröße a) Bitterkeit b) Schärfe. Variablen zwischen dem inneren und dem äußeren Kreis zeigen eine starke Korrelation mit der Zielgröße.

**Tabelle 11: Korrelationskoeffizienten für PC1 und PC2 aus PLS-R mit Zielgröße Bitterkeit**

Variable	PC 1	PC2	Variable	PC 1	PC2
Bitterkeit	0,793	0,328	11	0,467	0,609
1	-0,124	-0,409	12a	0,439	0,432
2	0,076	-0,105	12b	0,269	0,409
3a	0,508	-0,054	13	-0,337	-0,113
3b	0,238	-0,606	14	0,484	-0,696
4	-0,118	0,142	15a-i	0,862	-0,407
5	0,684	0,304	16	0,645	-0,569
6a	0,695	0,189	17a-i	0,812	-0,257
6b	0,639	0,249	18a	-0,228	0,405
7	0,478	-0,156	18b	0,169	-0,252
8	0,386	-0,230	19	-0,486	0,159
9	-0,259	0,127	20a	0,827	-0,456
10	0,364	0,574	20b	0,832	-0,442

**Tabelle 12: Korrelationskoeffizienten für PC1 und PC2 aus PLS-R mit Zielgröße Schärfe**

Variable	PC 1	PC2	Variable	PC 1	PC2
Schärfe	0,730	0,380	11	0,518	0,494
1	-0,166	-0,388	12a	0,496	0,327
2	0,034	-0,180	12b	0,324	0,311
3a	0,496	-0,118	13	-0,347	-0,038
3b	0,175	-0,565	14	0,386	-0,724
4	-0,093	0,181	15a-i	0,786	-0,545
5	0,714	0,209	16	0,559	-0,642
6a	0,723	0,124	17a-i	0,750	-0,425
6b	0,682	0,219	18a	-0,129	0,495
7	0,474	-0,146	18b	0,133	-0,280
8	0,381	-0,188	19	-0,437	0,260
9	-0,205	0,249	20a	0,750	-0,571
10	0,426	0,432	20b	0,759	-0,552

Für die Korrelation der semiquantitativen Analysendaten mit der Schärfe ergeben sich ähnliche Korrelationskoeffizienten. Die Substanzen **3b, 5, 6a, 6b, 10, 11, 12a, 14, 15a-i, 16, 17a-i, 20a** und **20b** zeigen auch eine starke Korrelation mit der Schärfe (cf. Abb. 33 b und Tabelle 12 ).

Da das Regressionsmodell zur Bestimmung der Bitterkeit bzw. Schärfe auf den Gehalten von Verbindungen basieren soll, welche tatsächlich für die wahrgenommenen sensorischen Eindrücke verantwortlich sein können, wurde für die Entwicklung weiterer Regressionsmodelle nur auf die Variablen zurückgegriffen, welche eine positive Korrelation mit der Bitterkeit bzw. Schärfe zeigen. Zwar könnte die negative Korrelation einiger Substanzen so interpretiert werden, dass deren Einfluss auf die Bitterkeit bzw. Schärfe auf einer Abschwächung der sensorischen Wahrnehmung durch beispielsweise eine Blockierung der Rezeptoren beruht. Allerdings ist eine solche Wechselwirkung äußerst unwahrscheinlich. Die gegenläufige Korrelation der Secoiridoide und der anderen Substanzklassen wie zum Beispiel der Flavanone oder der Lignane beruht vermutlich viel mehr auf unterschiedlich stark exprimierten Biosynthesewegen bedingt durch eine sortenabhängige und vom Reifegrad abhängige Enzymausstattung der Oliven.

Daher wurden für weitere Modelle nur die Variablen **3b, 5, 6a, 6b, 10, 11, 12a, 14, 15a-i, 16, 17a-i, 20a** und **20b** berücksichtigt. Die Isomere **6a** und **6b** sowie die Isomere des Ligstrosids **15a-i** und dessen Addukte **20a** und **20b** zeigen jeweils sehr ähnliche Korrelationen auf, so dass von einem gleichen Informationsgehalt ausgegangen werden kann. Zur Reduktion nicht relevanter Varianz wurde daher jeweils die Summe aus diesen Variablen gebildet. Die Optimierung der berechneten Regressionsmodelle wurde durch Minimierung des Validierfehlers erreicht. Die Validierung der Regressionsmodelle erfolgte durch eine Kreuzvalidierung (66 % der Proben dienten jeweils der Kalibration und 33 % für die Validierung). Die besten Ergebnisse lieferten Modelle basierend auf den Variablen **5,  $\Sigma(6a, 6b)$ , 10, 11,  $\Sigma(15a-i, 20a, 20b)$ , 17a-i**. Die optimale Anzahl an Hauptkomponenten wurde über den erklärten Anteil der Gesamtvarianz in der Kreuzvalidierung auf zwei Hauptkomponenten bestimmt. Von den beiden Hauptkomponenten erklärt PC 1 82 % der Gesamtvarianz, während PC 2 nur noch weitere 2 % Erklärungsanteil besteuert (cf. Abb. 34). Ab PC 3 sinkt der erklärte Anteil an der Gesamtvarianz. Dies ist bedingt durch unerwünschte Einbeziehung von für das Regressionsproblem irrelevanter Information, das sogenannte Rauschen. In Abbildung 35 sind die mit Hilfe des besten PLS-R Modells berechneten Werte für die Bitterkeit gegen die vom Sensorikteam bestimmte Bitterkeit aufgetragen. Wie man erkennen kann, liegen die für die meisten Oilvenölproben vorhergesagten

Intensitäten für die Bitterkeit innerhalb der Fehlergrenzen der sensorischen Bestimmung von  $\pm 0,5$  (gestrichelte Linien).

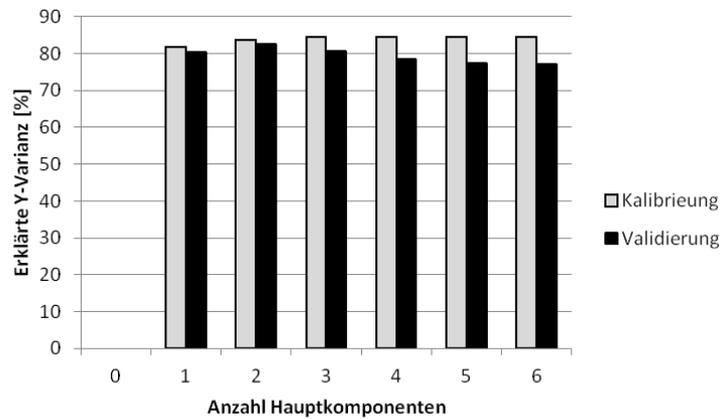


Abbildung 34: Anteil an erklärter Varianz durch die Hauptkomponenten.

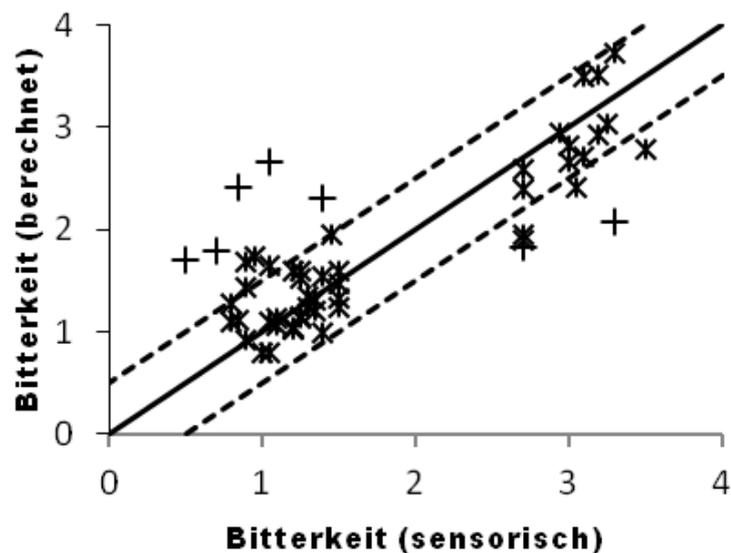


Abbildung 35: Ergebnisse der Kreuzvalidierung (66% der Proben zur Kalibrierung und 33% zur Validierung). Die durchgezogene Linie stellt die Ideallinie dar und die gestrichelten Linien die Fehlergrenzen der Sensorik ( $\pm 0,5$ ). Die mit dem Symbol (+) gekennzeichneten Proben wurden bei der Berechnung des Modells nicht berücksichtigt.

Sieben Olivenölproben (Nr. B14, B17, B25, B32, B37, B39, B47) wurden bei der Erstellung des Modell nicht berücksichtigt, da die für diese Olivenölproben vorhergesagten Werte für die Bitterkeit stets wesentlich stärker abwichen als die für die restlichen Proben. Die Bitterkeit wurde für diese Proben mit dem fertigen Modell vorhergesagt und diese gegen die sensorisch bestimmten Werte ins Diagramm eingetragen. Ein Kreuz (+) symbolisiert diese Proben. Die berechneten Bitterkeitsintensitäten für fünf dieser Proben liegen deutlich (ca. 1-1,5 Einheiten) über den sensorisch bestimmten Werten. Die Gehalte an den hydrophilen Substanzen hätten also zu einer verstärkt wahrnehmbaren Bitterkeit in der Sensorik führen müssen. Weshalb diese so nicht wahrgenommen wurde, ist schwer zu sagen. Allerdings ist auffällig, dass bei diesen Olivenölen (B14, B25, B32, B37, B47) das Aroma als fruchtig-reif und mit der Assoziation von reifen Früchten (reifer Apfel, süß, Cassis) beschrieben wurde. Diese Aromaeindrücke könnten die Bitterkeit im Olivenöl zum Teil überdeckt haben. Vier dieser fünf Öle weisen einen Aromafehler auf, was ein weiterer Hinweis auf eine Beeinflussung der Panelmitglieder bei der Bestimmung der Bitterkeit und somit für eine fehlerhafte sensorische Bewertung sein könnte. Anders verhält es sich bei den Olivenölproben B17 und B39, bei welchen eine geringere Bitterkeit vorhergesagt wurde. Deren Aroma wurde als grün mit Assoziationen von grünen Früchten (grüner Apfel, grüne Banane, frisch geschnittenes Gras) beschrieben. Entweder weisen die das grüne Aroma hervorrufenden Aromastoffe selber einen bitteren Geschmack auf oder durch deren Anwesenheit wird die Wahrnehmung der Bitterkeit während der Verkostung verstärkt. Beide Phänomene müssten durch Untersuchung weiterer Olivenöle, welche ebenfalls diese Aromamerkmale aufweisen, näher untersucht und die Ergebnisse in weiteren Regressionsmodellen berücksichtigt werden.

**Tabelle 13: Regressionskoeffizienten PLS-R**

Variable	Regressionskoeffizient	
	gewichtet <sup>a</sup>	ungewichtet
$b_0^b$	0,63	0,63
17a-i	0,22	0,05
10	0,05	0,08
11	0,11	0,08
5	0,15	0,08
$\Sigma(6a,6b)$	0,31	4,55
$\Sigma(15a-i, 20a, 20b)$	0,22	0,06

**a Gewichtung erfolgte durch Division mit den Standardabweichungen der Variablen;  
b y-Achsenabschnitt**

Die Regressionskoeffizienten des PLS-R Modells sind in Tabelle 13 aufgelistet. Wie man an den gewichteten Regressionskoeffizienten erkennen kann, stellen die Isomere von Elenolsäuremethylester **6**, Oleuropeinaglycon **17** und Ligstrosidaglycon **15** die wichtigsten Variablen bei der Bestimmung der Bitterkeit dar. Allerdings ist fraglich, ob der tatsächliche Beitrag des Elenolsäuremethylesters zur Bitterkeit wirklich so groß ist, da die ermittelten Gehalte (Median 0,05 mmol/kg) im Vergleich zum Oleuropeinaglycon (Median 3,7 mmol/kg) und dem Ligstrosidaglycon (Median 2,0 mmol/kg) wesentlich geringer sind und auf Grund der ähnlichen Struktur nicht von einem wesentlich intensiveren Bittergeschmack auszugehen ist. Andererseits handelt es sich nur um semiquantitative Daten, bei welchen der Response der einzelnen Substanzen nicht berücksichtigt wurde. Auf Grund der phenolischen Struktur kann eventuell die Ionisierung im negativen Modus beim Oleuropeinaglycon und beim Ligstrosidaglycon wesentlich effektiver ablaufen. Wie groß der tatsächliche Beitrag zur Bitterkeit ist, müsste auch bei der Elenolsäure überprüft werden. Mateos et al. bestimmten die Bitterkeit verschiedener hydrophiler Substanzen im Olivenöl. Elenolsäure wies in einer Konzentration von ca. 0,25 mmol/L keinen bitteren Geschmack auf (71). Das Oleuropeinaglycon verursachte dagegen bereits in Konzentrationen von 0,05 mmol einen intensiven bitteren Geschmack. Allerdings wurde die Enolsäure in dieser Studie durch saure Hydrolyse mit 1 N Schwefelsäure bei 55 °C aus Oleuropein gewonnen, so dass eine Umlagerung in ein nicht bitteres Isomer

nicht ausgeschlossen werden kann. Desweiteren wurden in dieser Arbeit weitaus höhere Konzentrationen an Elenolsäure (Median 2,2 mmol/kg) als die untersuchte Konzentration von 0,25 mmol/L in den Olivenölproben gefunden, wobei auch hier wieder der semiquantitative Charakter der Analysendaten nicht außer Acht gelassen werden darf. In weiterführenden Studien sollten daher die exakten Gehalte, z.B. über eine Bestimmung mit stabilsotopenmarkierten Standards, der ausgewählten hydrophilen Substanzen im Olivenöl bestimmt werden. Über die ebenfalls ermittelten Geschmacksschwellenwerte im Öl könnte dann der Beitrag der einzelnen Verbindungen auf die Gesamtbitterkeit bestimmt werden.

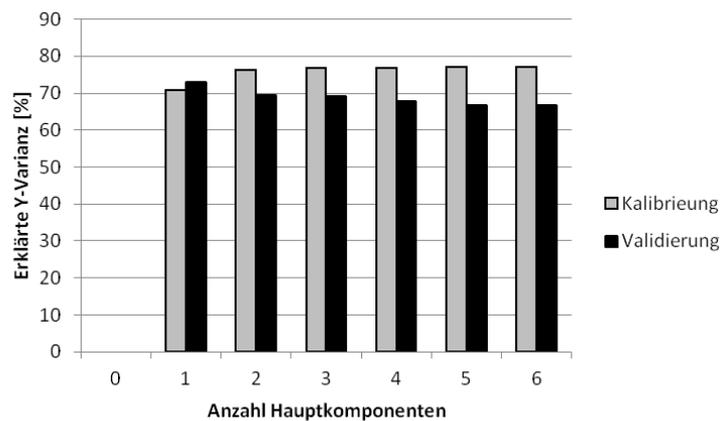
**Tabelle 14: Regressionskoeffizienten PLS-R**

Variable	<u>Regressionskoeffizient</u>	
	gewichtet <sup>a</sup>	ungewichtet
$b_0^b$	1,05	1,05
17a-i	0,16	0,03
10	0,11	0,17
11	0,15	0,10
5	0,19	0,10
$\Sigma(6a,6b)$	0,22	3,23
$\Sigma(15a-i, 20a, 20b)$	0,16	0,04

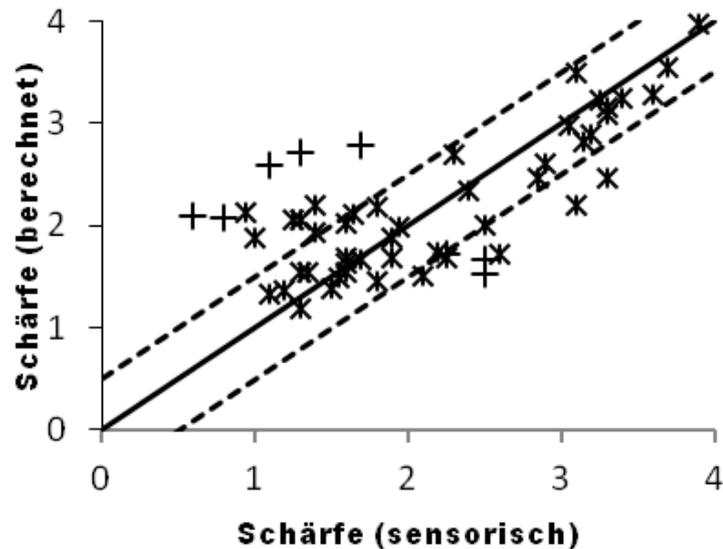
**a Gewichtung erfolgte durch Division mit den Standardabweichungen der Variablen;  
b y-Achsenabschnitt**

Für die instrumentelle Bestimmung der Schärfe erzielten Modelle auf Basis derselben Variablen wie bei der Analyse der Bitterkeit die besten Ergebnisse. Auch der Einfluss der einzelnen Variablen ist sehr ähnlich, wie die Regressionskoeffizienten zeigen (vgl. Tabelle 14). Allerdings hält lediglich die erste Hauptkomponente einer Validierung stand (Abb. 36) und der erklärte Anteil an der Gesamtvarianz durch die Hauptkomponenten ist geringer als bei der Bitterkeit. Die mit dem Modell erzielten Ergebnisse weisen größere Abweichungen auf als die Ergebnisse von der Bitterkeitsbestimmung. Zwar lässt sich für die meisten Olivenölproben die Schärfe innerhalb der Fehlergrenzen der Sensorik ( $\pm 0,5$ ) vorhersagen, allerdings sind die Abweichungen im Vergleich zu Bitterkeit höher. Bei der Berechnung des Modells

wurden insgesamt acht Olivenölproben nicht berücksichtigt, da deren vorhergesagte Intensitäten der Schärfe stets eine große Abweichung zu den sensorisch bestimmten Intensitäten zeigten. Bei diesen Olivenölproben handelt es sich größtenteils um die ebenfalls bei der Bestimmung der Bitterkeit nicht berücksichtigten Olivenölproben B14, B25, B32, B37 und B47 und als Gründe für die Abweichungen können dieselben bereits beschriebenen angenommen werden wie bei der Bitterkeit. Desweiteren wurden die Olivenproben B48, B53 und B54 bei der Berechnung des Regressionsmodells nicht berücksichtigt. Diese Olivenölproben weisen eine wesentlich höhere sensorische Bewertung für die Schärfe auf als für die Bitterkeit. Dies führt wie im Folgendem beschrieben dazu, dass die Intensität der Schärfe für diese Olivenölproben fehlerhaft vorhergesagt wird.



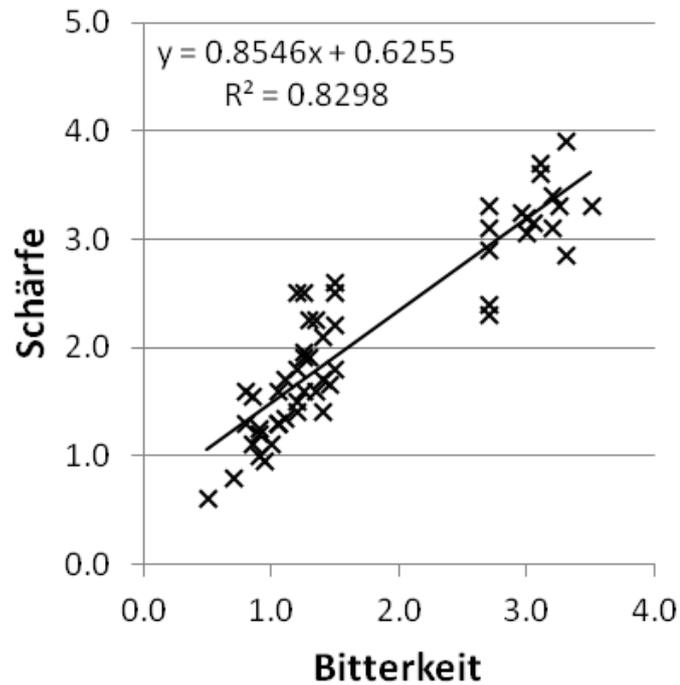
**Abbildung 36: Anteil an erklärter Varianz durch die Hauptkomponenten.**



**Abbildung 37: Ergebnisse der Kreuzvalidierung (66% der Proben zur Kalibrierung und 33% zur Validierung). Die durchgezogene Linie stellt die Ideallinie dar und die gestrichelten Linien die Fehlergrenzen der Sensorik ( $\pm 0,5$ ). Die mit dem Symbol (+) gekennzeichneten Proben wurden bei der Berechnung des Regressionsmodells nicht berücksichtigt.**

Die große Ähnlichkeit der Modelle lässt sich über die hohe Kovarianz der Sensorikergebnisse für die Bitterkeit und die Schärfe erklären. In Abbildung 38 ist die sensorisch bestimmte Schärfe gegen die Bitterkeit aufgetragen. Es ist ein signifikanter linearer Zusammenhang ( $R^2=0,83$ ) zwischen der Schärfe und der Bitterkeit zu erkennen. Diese Kovarianz kommt daher zustande, dass die Secoiridoide und deren Derivate beide sensorischen Wahrnehmungen, Schärfe und Bitterkeit, hervorrufen (61). Allerdings weisen mehrere Olivenölproben, unter anderem die Olivenölproben B48, B53 und B54, deutliche Unterschiede in der Bitterkeit und Schärfe auf. Die Vorhersage der Schärfintensität für diese Olivenölproben weicht stark von den Ergebnissen aus der sensorischen Bewertung ab, da in dem berechneten Modell nur Variablen berücksichtigt wurden, welche auch zur Bitterkeit beitragen. Daher funktioniert das Vorhersagemodell nur für Olivenölproben, deren Verhältnis von Schärfe zur Bitterkeit den oben beschriebenen Zusammenhang erfüllen. Dies und die Tatsache, dass die Validierung des Modells nur für die erste Hauptkomponente hinreichende Ergebnisse liefert und nur ein erklärter Anteil von 73 % an der Gesamtvarianz erreicht wird, sind ein Hinweis auf eine

oder mehrere bisher nicht miterfasste, ein Schärfegefühl verursachende, Substanzen im Olivenöl. Das Ziel zukünftiger Untersuchungen sollte die Isolierung und Identifizierung dieser Substanz bzw. Substanzen sein. Die Suche sollte dabei ggf. auf unpolare Fraktionen aus dem Olivenöl ausgeweitet werden.



**Abbildung 38: Korrelation zwischen der sensorisch bestimmten Schärfe und der sensorisch bestimmten Bitterkeit**

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden instrumentelle Methoden zur Qualitätsbewertung von Olivenölen entwickelt. Die entwickelten Methoden stellen eine Alternative zur bisher angewandten sensorischen Beurteilung der Olivenölqualität dar. Sie bieten gegenüber der Sensorik den Vorteil, dass sie schnell und ohne großen Personalaufwand durchgeführt werden können. Desweiteren eignen sich die instrumentellen Methoden für den Routineeinsatz und könnten gegebenenfalls auch in der on-line/at-line Prozessanalytik eingesetzt werden.

Die Qualität von Olivenöl zeichnet sich durch ein ausgeprägtes grün-fruchtiges Aroma und die Abwesenheit von Aromafehlern aus. Zusätzlich weisen qualitativ hochwertige Öle eine deutlich wahrnehmbare Bitterkeit und Schärfe auf. Das grün-fruchtige Aroma und mögliche Aromafehler gehen auf flüchtige Verbindungen im Olivenöl zurück, welche über den Lipoxygenaseweg während der Zerkleinerung der Olivenfrüchte bei der Herstellung oder durch Fermentationsprozesse bzw. Oxidationsreaktionen gebildet werden. Die Bitterkeit und Schärfe wird durch nichtflüchtige hydrophile Substanzen verursacht. Auf Grund der stark unterschiedlichen Eigenschaften bezüglich Polarität und Flüchtigkeit der Analyten wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung der Aromastoffe und Bitter- bzw. Scharfstoffe entwickelt.

Die Aromastoffe wurden über die Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion (GC-MS) bestimmt. Dazu wurden zunächst die geruchsaktiven Verbindungen in verschiedenen Olivenölproben mittels Gaschromatographie mit olfaktometrischer Detektion (GC-O) analysiert und über die jeweiligen Massenspektren und Retentionsindices identifiziert. Gefunden wurden 21 verschiedene geruchsaktive Verbindungen: die Ester Ethyl-isobutanoat, Ethyl-2-methylbutanoat, Ethyl-3-methylbutanoat, 3-Methylbutylacetat, Z-3-Hexenylacetat und Methylsalicylat; die Aldehyde Hexanal, Z-3-Hexenal, E-2-Hexenal, Nonanal, E-2-Nonenal und E,E-2,4-Decadienal; die Alkohole 3-Methylbutan-1-ol, Z-3-Hexenol, E-2-Hexenol und 2-Phenylethanol; die Carbonsäuren Essigsäure, Buttersäure und Hexansäure; das Phenol Guaiacol und das Alken 6,10-Dimethyl-1-undecen. Die Quantifizierung dieser Verbindungen in 95 verschiedenen Olivenölproben, deren vollständige sensorische Beurteilung vorlag, erfolgte mittels Festphasenextraktion aus dem Gasraum über dem

Olivenöl (HS-SPME) unter Einsatz von mit Stabilisotopen markierten Standards. Die stabilisotopenmarkierten Standards wurden im Zuge dieser Arbeit synthetisiert. Zusätzlich zu den 21 geruchsaktiven Verbindungen wurden die leichtflüchtigen Verbindungen Aceton, Ethylacetat und Ethanol quantitativ bestimmt. Da sich diese auf Grund ihrer hohen Flüchtigkeit nicht per SPME anreichern lassen, erfolgte die Bestimmung über eine dynamische Headspace-Methode. Zur Ermittlung, welche der 24 Substanzen für eine Qualitätsbestimmung von Olivenöl geeignet sind, wurden die Gehalte mit den Ergebnissen der Sensorik korreliert. Die Korrelation erfolgte über eine Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA), wobei die Olivenölproben, je nachdem, ob in der sensorischen Beurteilung Aromafehler festgestellt wurden oder nicht, in die Gruppen „nicht Nativ extra“ und „Nativ extra“ eingeteilt. Olivenöle der Gruppe „Nativ extra“ wiesen höhere Gehalte an den aus dem Lipoxygenaseweg stammenden Substanzen Z-3-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol auf, während die Öle mit Aromafehler Substanzen aus Fermentationsprozessen (Ethanol, Ethylacetat, Essigsäure, Ethyl-2-Methyl-butanoat, 3-Methylbutanol und Guaiacol) bzw. aus Fettoxydationsreaktionen (Hexanal, E-2-Hexenal, Hexansäure und E,E-2,4-Decadienal) aufwiesen. Zur Verbesserung des Klassifizierungsmodells wurden aus den Quantifizierungsdaten die Odour Activity Values (OAVs) der 24 Analyten berechnet. Für jeden Aromastoff wurden zudem individuelle Aktivierungsfunktionen entwickelt, mit deren Hilfe die OAVs in einen Wertebereich von 0 bis 1 transformiert werden konnten. Durch diese Rechenoperationen werden nur Aromastoffe für die Klassifizierung berücksichtigt, welche auf Grund ihres Geruchsschwellenwertes auch einen tatsächlichen Einfluss auf das Olivenölaroma haben. Mit Hilfe dieser Daten konnte ein PLS-DA Modell entwickelt werden, welches 88% (Ergebnis der Kreuzvalidierung) der 95 Olivenölproben richtig klassifizieren kann. Als wichtigste Variablen stellten sich einerseits die Summe der grün-fruchtig riechenden Verbindungen Z-3-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol sowie die für verschiedene Aromafehler verantwortlichen Verbindungen Ethyl-isobutanoat, Ethyl-2-Methylbutanoat, Hexanal, 3-Methylbutanol, Essigsäure, Buttersäure, E,E-2,4-Decadienal, Hexansäure, Guaiacol und 2-Phenylethanol heraus. In weiteren Untersuchungen müsste das Klassifizierungsmodell validiert werden und nach

gegebenenfalls existierenden weiteren Aromafehler verursachenden Substanzen gesucht werden.

Neben der Erstellung eines Modells, über das sich Olivenölen der besten Handelskategorie „Nativ extra“ von Olivenölen schlechterer Qualität unterscheiden lassen, wurde auch ein Regressionsmodell zur Bestimmung der Fruchtigkeit von Olivenölen der Kategorie „Nativ extra“ erstellt. Dieses Regressionsmodell basiert auf den Konzentrationen der grün-fruchtigen Hauptaromastoffe aus dem Lipoxygenaseweg: Z-3-Hexenal, E-2-Hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol. Zur Berücksichtigung der unterschiedlichen Geruchsintensitäten der verschiedenen Aromastoffe wurden die OAVs berechnet und aus diesen der natürliche Logarithmus ( $\ln(\text{OAV})$ ) gebildet. Mit Hilfe der PLS-R konnte ein Regressionsmodell aufgestellt werden, welches die Fruchtigkeit innerhalb der Fehlergrenzen der Sensorik ( $\pm 0,5$ ) vorhersagen kann. Als wichtigste Variable stellte sich das Z-3-Hexenal heraus, welches auf Grund seines geringen Geruchsschwellenwertes und sein intensives Aroma, das an frisches geschnittenes Gras erinnert, maßgeblich am grünen Aroma von Olivenöl beteiligt ist. In weiterführenden Studien sollte der Einfluss von weiteren Aromastoffen aus dem Lipoxygenaseweg wie beispielsweise das 1-Penten-3-on untersucht werden und diese zur Verbesserung des Modells ggf. mit in die Regression einbezogen werden.

Eines der großen Probleme der sensorischen Beurteilung der Olivenölqualität ist das Fehlen von Referenzölen mit definierten Aromaeigenschaften wie bestimmten Fehleraromen oder einer definierten Intensität der Fruchtigkeit. Daher wurden auf Basis der Quantifizierungsdaten Aromastoffmischungen in raffiniertem Rapsöl hergestellt, welche die drei Aromafehler „ranzig“, „modrig-feucht“ und „essigsauer-weinartig“ sowie zwei fehlerfreie Olivenöle mit ausgeprägter Fruchtigkeit simulieren sollten. Die sensorische Prüfung dieser Modellöle ergab, dass der Aromafehler „ranzig“ sowohl über eine Mischung, deren Aroma hauptsächlich vom E,E-2,4-Decadienal bestimmt wird, als auch von einer Mischung, die von den Aromastoffen Hexenal und Hexansäure dominiert wird, simuliert werden kann. Der Aromafehler „modrig-feucht“ konnte im Rapsöl durch eine Mischung, deren Geruchseindruck hauptsächlich durch die Aromastoffe Guaiacol und 3-Methylbutan-1-ol charakterisiert wird, hervorgerufen werden. Durch eine Mischung aus Essigsäure und den Estern Ethyl-isobutanoat und Ethyl-2-methylbutanoat konnte der Aromafehler „essigsauer-weinartig“ simuliert

werden. Mischungen von E-2-Hexenal, Z-3-hexenal, Z-3-Hexenylacetat und Z-3-Hexenol wiesen zwar ein grün-fruchtiges Aroma auf, allerdings wurde dies in der Sensorik nicht als gleichermaßen intensiv und komplex wahrgenommen, wie es bei Olivenölen mit ähnlichen Konzentrationen der Fall war. Offensichtlich wurden in den Mischungen für das Olivenölaroma wichtige Aromastoffe nicht berücksichtigt. Über weitere Untersuchungen könnte der Einfluss von weiteren Aromastoffen, an erster Stelle ist hier wieder das 1-Penten-3-on zu nennen, auf das Aroma der Mischungen festgestellt werden. Desweiteren wurde bei den Fehlparomen bisher nicht die Wechselwirkung von verschiedenen Fehlparomen in einer Mischung und der Einfluss der grün-fruchtigen Aromastoffe aus dem Lipoxygenaseweg auf die Wahrnehmung der Aromafehler untersucht.

Um eine instrumentelle Methode zur Bestimmung der Bitterkeit und Schärfe von Olivenöl zu entwickeln, wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Die erste basiert auf der Bestimmung aller im Olivenöl enthaltenen Phenole über einen Summenparameter. Die zweite auf der selektiven Bestimmung von ausgewählten hydrophilen Substanzen aus Olivenöl, die eine Korrelation mit der Bitterkeit und der Schärfe zeigen.

Als Methode zur Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes wurde eine modifizierte Variante der weitverbreiteten Methode der Bestimmung des  $K_{225}$ -Wertes verwendet. Die eingesetzte Methode zeichnet sich durch eine höhere Selektivität gegenüber phenolischen Strukturen aus. Untersucht wurden 54 Olivenöle aus verschiedenen Anbaugebieten. Allerdings konnte keine hinreichend gute Korrelation zwischen dem Gesamtphenolgehalt und sensorisch bestimmter Bitterkeit und Schärfe festgestellt werden. Eine einzelne Betrachtung der Olivenölproben nach ihrer Herkunft ergab bessere Korrelationen und sehr unterschiedliche Steigungen der Regressionsgeraden. Dies ist auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Phenole in den Olivenölen unterschiedlicher Sorten und Herkunft zurückzuführen. Da bei der Bestimmung der Gesamtphenole auch nicht bittere bzw. scharfe Phenole mit erfasst werden, ist eine erfolgreiche Korrelation des Gesamtphenolgehaltes mit der Bitterkeit/Schärfe an ein konstantes Verhältnis von bitteren/scharfen Phenolen zu den nicht bitteren/scharfen phenolischen Bestandteilen geknüpft. Dies ist bei der Betrachtung von Olivenölen aus

verschiedenen Olivensorten und unterschiedlicher Herkunft nicht gegeben. Um eine instrumentelle Bestimmung der Bitterkeit und Schärfe im Olivenöl realisieren zu können, wurden daher die aus der Literatur bekannten Bitter- bzw. Scharfstoffe im Olivenöl - Oleuropeinaglycon, Ligstrosidaglycon, Decarboxymethyl-Oleuropeinaglycon und Decarboxymethyl-Ligstrosidaglycon - mittels einer HPLC-MS Methode semiquantitativ bestimmt. Es konnte keine hinreichend gute Korrelation zwischen den einzelnen Gehalten bzw. der Summe dieser hydrophilen Phenole und der Bitterkeit bzw. der Schärfe gefunden werden. Im Olivenöl müssen folglich weitere bittere/scharfe Verbindungen vorhanden sein und/oder der Einfluss der einzelnen Phenole auf die Bitterkeit/Schärfe ist auf Grund von unterschiedlichen Wahrnehmungsschwellen nicht identisch. Eine erfolgreiche Vorhersage der Bitterkeit/Schärfe kann nur über die Berücksichtigung sämtlicher Bitter- bzw. Scharfstoffe unter Einbeziehung individueller Gewichtungsfaktoren erfolgen. Zur Identifizierung der für die Bitterkeit/Schärfe wichtigen Substanzen wurde eine HPLC-MS Profiling-Methode entwickelt und die gefundenen Substanzen über eine PLS-R mit der Bitterkeit/Schärfe korreliert. Von den 24 gefundenen Verbindungen zeigten sechs Verbindungen eine starke Korrelation mit der Bitterkeit/Schärfe. Unter den sechs Verbindungen waren neben den bekannten Verbindungen Oleuropeinaglycon, Ligstrosidaglycon, Decarboxymethyl-Oleuropeinaglycon und Decarboxymethyl-Ligstrosidaglycon die Elenolsäure und der Elenolsäuremethylester vertreten. Letzterer wurde zum ersten Mal in Olivenöl nachgewiesen. Mit Hilfe der Konzentrationen dieser sechs Verbindungen konnte ein PLS-R Modell berechnet werden, welches die Bitterkeit und Schärfe für die meisten Olivenölproben innerhalb der Fehlergrenzen der Sensorik ( $\pm 0,5$ ) vorhersagen kann. Als wichtigste Variablen stellten sich die Secoiridoide Oleuropeinaglycon und Ligstrosidaglycon sowie der Elenolsäuremethylester heraus. Allerdings wurden die Substanzen nicht auf einen bitteren und/oder scharfen Geschmack untersucht und vor allem bei der Schärfe scheint es noch weitere Substanzen zu geben, die diese sensorische Wahrnehmung verursachen. Nach solchen Substanzen müsste in eventuell weniger polaren Fraktionen vom Olivenöl gesucht werden. In weiteren Untersuchungen sollten die exakten Konzentrationen der hydrophilen Substanzen bestimmt werden und über die Geschmacksschwellenwerte der tatsächliche Beitrag dieser Substanzen zur Bitterkeit/Schärfe ermittelt werden. Auch deuten die Ergebnisse auf einen Einfluss von

gegebenenfalls vorhandenen Aromafehlern und anderen Aromastoffen auf die Wahrnehmung der Bitterkeit/Schärfe hin. Dies liefert Ansatzpunkte für weiterführende Studien, in denen Olivenöle unterschiedlicher Qualität mit den Bitter- bzw. Scharfstoffen aufgestockt und dann sensorisch untersucht werden könnten.

## **5 Experimenteller Teil**

### **5.1 Sensorische Beurteilung**

Alle Öle wurden im Rahmen des International Olive Oil Award - Zurich (IOOA) 2008-2011 auf Basis der Vorgaben für die Objektive Beurteilung von Olivenöl des IOC (COI/T.20/Doc.No.15/Rev.3 2010) und der gültigen EG-Verordnung (Verordnung (EG) Nr. 796/2002 vom 06. Mai 2002 resp. 640/2008 vom 04. August 2008, Anhang VII), einem Panel-Test (Blinddegustation) durch das Schweizer Olivenöl Panel (Swiss Olive Oil Panel (SOP)) unterzogen. Verwendet wurde der im Anhang (Abb. A1) dargestellte erweiterte Prüfbogen. Die Anzahl der Prüfpersonen betrug bei allen sensorischen Prüfungen mindestens acht oder mehr. Die Ergebnisse für die Olivenölproben A1-95 befinden sich im Anhang in Tabelle A1 und die Ergebnisse für die Olivenölproben B1-54 in Tabelle A3. Bei den Werten handelt es sich jeweils um den aus den Angaben sämtlicher Panelmitglieder gebildeten Median. Der robuste Variationskoeffizient war in allen Fällen  $\leq 20\%$ .

### **5.2 Bestimmung der Aromastoffe**

#### **Olivenölproben**

Als Probenmaterial standen 95 Olivenölproben (Nr. A1-95) zur Verfügung. Die sensorischen Beurteilungen sowie die Herkunftsländer sind in Tabelle A1 aufgelistet.

## Chemikalien

Die folgenden Substanzen wurden kommerziell erstanden: **1-5, 7-8, 9-18, 20-24** (Aromastoffe aus Tabelle 1) (Aldrich, Steinheim, Germany); [<sup>13</sup>C]<sub>2</sub>-Essigsäure, [<sup>13</sup>C]<sub>2</sub>-Ethylacetat, [<sup>13</sup>C]<sub>2</sub>-Aceton und [<sup>2</sup>H]<sub>3</sub>-Ethanol; [<sup>2</sup>H]<sub>6</sub>-Dimethylsulfat, Lithiumaluminiumdeuterid, Natriumhydrid, 2-Hexin-1-ol, 3-Hexin-1-ol, 2-Octin-1-ol, 2-Nonin-1-ol, 3,7-Dimethyl-1-octanol, Salicylsäure, 2-Methylbuttersäure, 3-Methylbuttersäure, iso-Buttersäure, Catechol, Ethyloctanoat, Ethylbutanoat, 3,7-Dimethyl-1-octen, (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran, [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-Dichlormethan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), Deuteriumgas 2.7 (Air Liquide, Krefeld, Germany), Dilithiumtetrachlorocuprate 0,1 M Lösung in THF, Allylmagnesiumbromid 1 M Lösung in Diethylether (Acros Organics, Geel, Belgium). Silica gel 60 (Merck) wurde nach Esterbauer (89) mit HCl gewaschen und auf einen Wassergehalt von 1,5 Massen% getrocknet.

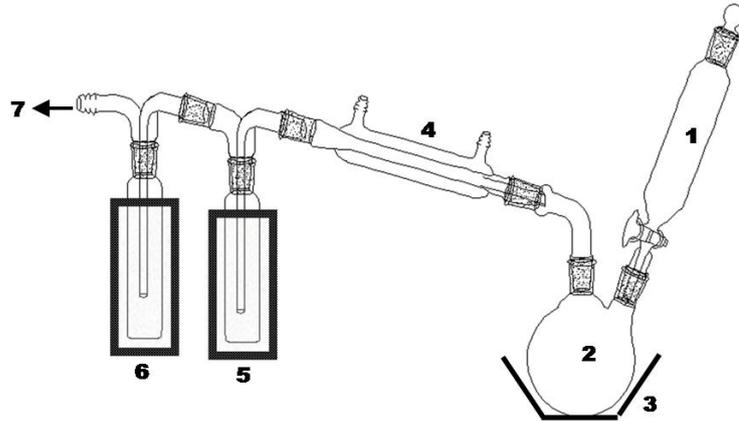
## SPME-Faser

SPME-Fasern (Länge 1 cm) beschichtet mit einer 50/30 µm Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen/Carboxen-Phase (Supelco Ltd., Bellefonte, PA) wurde verwendet. Vor der Nutzung wurde die Faser für 2 Stunden bei 260 °C im Heliumstrom konditioniert.

## Hochvakuum-Destillation

Die flüchtigen Verbindungen aus dem Olivenöl wurden mittels Hochvakuumdestillation isoliert (41, 75). Die Hochvakuumdestillation erfolgte mittels der von Guth und Grosch beschriebenen Apparatur (90). 500 g Olivenöl werden mit Diethylether verdünnt (1:1; v:v) und das Lösungsmittel wird im Hochvakuum (ca.  $1 \times 10^{-3}$  mbar) zusammen mit den

flüchtigen Verbindungen abdestilliert (Sumpf 40 °C). Das Destillat wird an einer Vigreux-Kolonne (50 x 1 cm) gefolgt von einer Mikrodestillation auf 200 µl aufkonzentriert. Der so erhaltene Aromaextrakt wird direkt für die Identifizierung mittels GC-O eingesetzt.



**Abbildung 39: Schematischer Aufbau der Vakuumdestillationsapparatur**

**1 Tropftrichter; 2 Rundkolben (500 ml); 3 Heizbad (40 °C); 4 Destillationsbrücke (60 °C); 5 und 6 Kühlfallen (LN<sub>2</sub> –196 °C); 7 Vakuumpumpe (ca. 1x10<sup>-3</sup> mbar) (90).**

### **Hochauflösende Gaschromatographie mit olfaktometrischer Detektion (HRGC-O)**

Die geruchsaktiven Verbindungen aus dem Aromaextrakt wurden mittels Gaschromatographie mit olfaktometrischer Detektion (GC-O) identifiziert. Dazu wurde 1 µl des Aromaextraktes in einen Trace Ultra GC (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) ausgestattet mit Phaser Sniffingport (ATAS GL International BV, Eindhoven, Niederlande) und FID injiziert. Als Trennsäule diente eine DB-FFAP (30 m x 0,32 mm, 5 µm Filmdicke). Als Trägergas wurde Helium bei einem Fluss von 1,3 ml/min verwendet.

Temperaturprogramm: 35 °C/2 min/40°C\*min<sup>-1</sup>/60°C/ 1 min/ 8 °C\*min<sup>-1</sup>/250 °C/10min

Injektor- und Detektortemperatur: 240 °C

## Identifizierung von 6,10-Dimethyl-1-undecen

Für die Identifizierung des unbekanntes Peaks Nr. 9 wurde das Vakuumdestillat von 1 kg Olivenöl mittels Säulenchromatographie an Kieselgel fraktioniert.

Das auf 500 µl aufkonzentrierte Vakuumdestillat wird auf eine wassergekühlte, mit Kieselgel gefüllte Glassäule (300x20 mm) aufgegeben. Die Elution erfolgt mit jeweils 100 ml eines Gemisches aus Pentan und Diethylether, wobei der Diethyletheranteil in 5 % Schritten von 0 % auf 50 % erhöht wird.

Die unbekannte Substanz befand sich in der ersten Fraktion (100 % Pentan). Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels präparativer Gaschromatographie. Verwendet wurde ein Carlo Erba Gaschromatograph (Typ GC8000<sup>Top</sup>, ThermoQuest, Rodano, Italien) ausgestattet mit einer gepackten Säule (3 m, 1/8 inch, Trennschicht:FFAP) und einer Kühlfalle am Säulenende.

Injektortemperatur: 240 °C

Injektionsmodus: Splitless; Splitventil wird nach 2 min geöffnet (Split: 1:20)

Säulenfluss: 20 ml/min He

Temperaturprogramm: 50 °C/12 °C\*min<sup>-1</sup>/220°C/10min

20 µl der auf 200 µl aufkonzentrierten unpolaren Fraktion wurden injiziert und der Peak, welcher zwischen Dodecan und Tridecan eluierte ( $RI_{FFAP}$  der unbekanntes Substanz 1246), wurde mit Hilfe der Kühlfalle aufgefangen. Der Vorgang wurde zehnmal wiederholt und die Kühlfalle danach mit 200 µl Dichlormethan-d<sub>2</sub> gespült. Diese Lösung wurde zur massenspektroskopischen (EI und CI) sowie <sup>1</sup>H-NMR- (400 MHz) Charakterisierung eingesetzt.

## Head-Space Solid Phase Microextraction (HS-SPME)

1,3 g Ölprobe wurden in ein 125 ml Headspace-Vial eingewogen und dieses mit einem Silikonseptum gasdicht verschlossen. Die Probe wurde mit 1 µl Standardlösung versetzt und die flüchtigen Verbindungen durch Einbringen der SPME-Faser (DMPS/DVB/Carboxen) in den Gasraum über dem Öl für 30 min bei 40 °C unter Rühren angereichert. Die Desorption der Analyten erfolgte in einem Optic 3 PTV-Injektor (ATAS GL International BV, Eindhoven, Niederlande). Die Injektortemperatur betrug zu Beginn 35 °C und wurde mit 20 °C/s auf 240 °C aufgeheizt und diese Temperatur für 12 min gehalten. Das Split-Ventil wurde nach 2 min geöffnet (10 ml/min). Zur Rekonditionierung der SPME-Faser wurde die Faser für 12 min im heißen Injektor belassen.

## Quantifizierung der Aromastoffe

Die Quantifizierung der Aromastoffe erfolgte nach Anreicherung aus dem Gasraum an einer SPME-Faser mittels Gaschromatographie (GC) mit massenselektiver Detektion (MS). Das GC-MS-System bestand aus einem Trace Ultra GC mit einem DSQII Massenspektrometer (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland). Die gaschromatographische Trennung der Analyten erfolgte auf einer IMOPEG-FFAP (CS-Chromatographie, Langerwehe, Deutschland) (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke) unter Verwendung des folgenden Temperaturprogramms: 35 °C/2 min/40°C\*min<sup>-1</sup>/60°C/1 min/8 °C\*min<sup>-1</sup>/240 °C/ 10 min. Die Detektion wurde mit Hilfe des Massenspektrometers durchgeführt und die Ionisierung erfolgte mit Methan als Reaktandgas (2 ml/min) im Chemical Ionisation (CI) Modus. Abweichend davon wurden die Substanzen [6], [9], [19] und [20] nach Trennung auf einer OV-1701 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke) im Electron Impact (EI) Modus bestimmt. Quantifizierung erfolgte durch Integration der in Tabelle 15 aufgelisteten

Massenspuren. Die Aromastoffkonzentrationen berechnen sich aus den Flächenverhältnissen der unmarkierten (F(H)) und der markierten (F(D)) Substanz unter Berücksichtigung der Standardkonzentration  $c(D)$ , des Korrekturfaktors (f) (Tabelle 15) und der Öleinwaage (m) gemäß:

$$c = \frac{F(H) \times c(D)}{F(D) \times m} \times f$$

Der Korrekturfaktor (f) wurde durch Injektion von verschiedenen Mischungen von markierten und unmarkierten Standards (1:5 bis 5:1) bestimmt. Die Flächenverhältnisse der jeweiligen Massenspuren wurden gegen die bekannten Konzentrationsverhältnisse aufgetragen. Die Steigungen der sich dadurch ergebenden Regressionsgeraden stellen die Korrekturfaktoren dar.

**Tabelle 15: Zur Quantifizierung herangezogene Massenspuren**

Nr.	Substanz	m/z	Deuterierte		Korrektur-	
			Substanz	m/z	faktor	R <sup>2</sup>
1	Ethyl-isobutanoat <sup>a</sup>	117	1-d	120	1,12	0,996
2	Ethyl-2-methylbutanoat <sup>a</sup>	131	2-d	134	0,75	0,996
3	Ethyl-3-methylbutanoat <sup>a</sup>	131	3-d	134	0,75	0,996
4	Hexanal <sup>a</sup>	101	4-d	105	1,52	0,999
5	3-Methylbutylacetat <sup>a</sup>	71	5-d	73	1,13	0,992
6	Z-3-Hexenal <sup>b</sup>	83	6-d	85	1,03	0,998
7	3-Methylbutanol <sup>a</sup>	71	7-d	73	0,90	0,995
8	E-2-Hexenal <sup>a</sup>	99	8-d	101	1,09	0,998
9	6,10-dimethyl-1-undecen <sup>b</sup>	97	9-d	99	0,86	0,996
10	Z-3-Hexenylacetat <sup>a</sup>	82	10-d	84	1,32	0,997
11	Z-3-Hexenol <sup>a</sup>	82	11-d	84	1,68	0,996
12	Nonanal <sup>a</sup>	143	12-d	147	1,78	0,999
13	E-2-Hexenol <sup>a</sup>	82	13-d	84	1,25	0,999
14	Essigsäure <sup>a</sup>	61	14-d	63	0,82	0,995
15	E-2-Nonenal <sup>a</sup>	141	15-d	143	1,10	0,997
16	Buttersäure <sup>a</sup>	89	16-d	91	2,80	0,995
17	E,E-2,4-Decadienal <sup>a</sup>	153	17-d	155	1,26	0,999
18	Hexansäure <sup>a</sup>	117	18-d	121	4,12 <sup>c</sup>	0,997
19	Methylsalicylat <sup>b</sup>	152	19-d	155	1,31	0,999
20	Guaiacol <sup>b</sup>	124	20-d	127	1,14	0,999
21	2-Phenylethanol <sup>a</sup>	105	21-d	107	1,00	0,998
22	Aceton <sup>b</sup>	58	22-d	60	1,00 <sup>d</sup>	-
23	Ethylacetat <sup>b</sup>	88	23-d	90	1,00 <sup>d</sup>	-
24	Ethanol <sup>b</sup>	46	24-d	49	1,00 <sup>d</sup>	-

**a Bestimmung über CI-MS; b Bestimmung über EI-MS; c der hohe Korrekturfaktor kommt durch einen schwankenden Deuterierungsgrad von 2-4 zustande; d theoretischer Wert**

## **Synthese der stabilisotopenmarkierten Standards**

Die mit Stabilisotopen markierten Standards wurden durch Integration von 2-4 Deuteriumatomen in die Analytmoleküle gemäß den folgenden Vorschriften synthetisiert. Die Markungspositionen wurden so gewählt, dass kein unerwünschter Austausch von Deuterium gegen Wasserstoff während der Probenvorbereitung oder Analyse möglich ist (cf. Abbildung 40). Die Identifizierung der Syntheseprodukte erfolgte per GC-MS und über die Retentionsindices (RI) auf zwei verschiedenen Säulen (FFAP und OV-1701). Eine Bestimmung der genauen Ausbeuten erfolgte nicht. Die geschätzten Ausbeuten lagen in allen Fällen zwischen 50-90 %. Die markierten Standards wurden jeweils in 5 ml Pentan gelöst und bei – 20 °C gelagert.

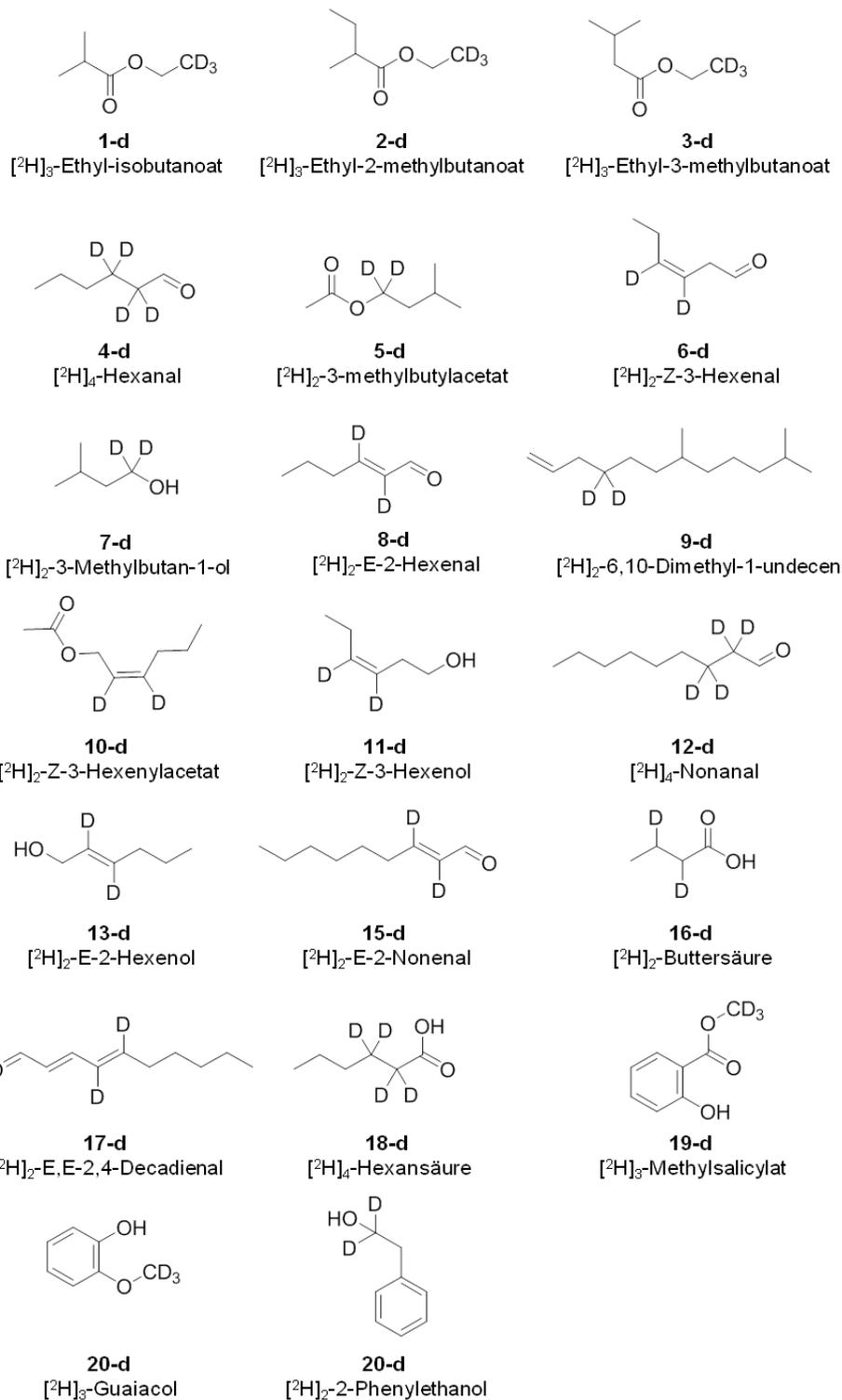


Abbildung 40: Strukturformeln der synthetisierten deuteriummarkierten Standards

### **[<sup>2</sup>H]<sub>3</sub>-Ethylisobutanoat d-[1], [<sup>2</sup>H]<sub>3</sub>-Ethyl-2-methylbutanoat d-[2] und [<sup>2</sup>H]<sub>3</sub>-Ethyl-3-methylbutanoat d-[3]**

Die Carbonsäuren werden mit [<sup>2</sup>H]<sub>3</sub>-Ethanol säurekatalysiert verestert (75).

100 mg der jeweiligen Carbonsäure werden in 500 µl [<sup>2</sup>H]<sub>3</sub>-Ethanol gelöst und mit einem Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung mit 5 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung alkalisiert und mit dreimal 5 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen werden mit 5 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und nach dem Abdestillieren des Ethers wird der Rückstand in 5 ml Pentan aufgenommen.

### **[<sup>2</sup>H]<sub>3</sub>-Methylsalicylsäure d-[20]**

Salicylsäure wird wie für die Ethylester beschrieben mit [<sup>2</sup>H]<sub>3</sub>-Methanol säurekatalysiert verestert.

### **[<sup>2</sup>H]<sub>4</sub>-Hexanal d-[4] und [<sup>2</sup>H]<sub>4</sub>-Nonanal d-[12]**

2-Hexin-1-ol bzw. 2-Nonin-1-ol wird nach vollständiger Deuterierung zum [<sup>2</sup>H]<sub>4</sub>-Hexanal bzw. [<sup>2</sup>H]<sub>4</sub>-Nonanal oxidiert(91).

500 mg 2-Hexin-1-ol (5 mmol) bzw. 700 mg 2-Nonin-1-ol (5 mmol) werden in 15 ml Methanol-d<sub>1</sub> gelöst und nach der Zugabe von Platin(IV)oxid 90 min unter einer Deuteriumgasatmosphäre gerührt. Anschließend wird der Katalysator abfiltriert, die

Lösung mit 50 ml Wasser versetzt und mit Diethylether (3x30 ml) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, mit 40 ml 0,1 M HCl und 40 ml 0,5 M NaHCO<sub>3</sub> gewaschen und das Lösungsmittel über eine Vigreux-Kolonnen abdestilliert. Der Rückstand wird in 5 ml Dichlormethan gelöst und zu einer Suspension von Chrom(VI)oxid (1,8 g, 18 mmol) und Pyridin (2,8 g, 37 mmol) in 30 ml Dichlormethan gegeben. Nach 15 min wird die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Diethylether gestoppt und vom unlöslichen Rückstand abdekantiert. Der Rückstand wird zweimal mit 15 ml Diethylether gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über eine Kieselgelsäule gereinigt. Das Eluat wird durch zweimaliges Ausschütteln mit 1 M HCl vom Pyridin befreit und nach dem Trocknen über Natriumsulfat aufkonzentriert.

**[<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>- Z-3-Hexenal d-[6], [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>- E-2-Hexenal d-[8], [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>- E-2-Octenal und [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>- E-2-Nonenal d-[15]**

Die jeweiligen markierten ungesättigten Alkohole werden selektiv zu den markierten ungesättigten Aldehyden oxidiert.

Die Oxidation erfolgt mit Pyridiniumchromat, wie für [<sup>2</sup>H]<sub>4</sub>-Hexanal beschrieben.

**[<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-Z-3-Hexenylacetat d-[10] und [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-3-Methylbutylacetat d-[5]**

[<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>- Z-3-Hexen-1-ol bzw. [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-3-Methylbutan-1-ol wird sauer katalysiert mit Essigsäure verestert(75).

500 mg [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-Z-3-Hexenol (5 mmol) bzw. 450 mg [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-3-Methylbutan-1-ol werden in 10 ml konz. Essigsäure gelöst und mit 3 Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt. Man

lässt über Nacht rühren und versetzt dann mit 40 ml Wasser. Die Lösung wird mit Diethylether extrahiert (3x30ml) und die vereinigten organischen Phasen mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0,5 M, 2x40 ml) gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird die Lösung aufkonzentriert.

### **[<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>- Z-3-Hexen-1-ol d-[11]**

3-Hexin-1-ol wird durch katalytische Deuterierung ins [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-Z-3-Hexenol überführt (91).

Eine Lösung aus Nickel(II)acetat (442 mg; 2,5 mmol) in 10 ml Methanol wird 15 min mit Deuterium gesättigt. Nacheinander werden Natriumbordeuterid (mmol) in 1 ml Methanol gelöst, 100 µl Diethylamin und 3-Hexin-1-ol (5 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch spült man ein weiteres Mal mit Deuteriumgas und lässt dann für 55 min bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 30 ml Wasser gestoppt und nach Filtrierung das Produkt mit Pentan extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und über eine Vigreux-Kolonnen aufkonzentriert.

### **[<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-E-2-Hexenol d-[13], [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-E-2-Octenol und [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-E-2-Nonenol**

Das jeweilige Alkinol wird mit LiAlD<sub>4</sub> zum deuterierten Alkenol reduziert.

10 mmol Alkinol werden in 50 ml wasserfreiem THF gelöst und portionsweise mit 420 mg (10 mmol) LiAlD<sub>4</sub> versetzt. Nach Beendigung der Zugabe wird für 60 min unter Rückfluss erhitzt. Danach die eisgekühlte Lösung mit 50 ml Wasser versetzen und nach

dem Abtrennen der organischen Phase die wässrige Phase mit Diethylether (2x30ml) extrahieren. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird die Lösung durch Destillation über eine Vigreux-Kolonne aufkonzentriert.

### **[<sup>2</sup>H]<sub>4</sub>-Hexansäure d-[18] und [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-Buttersäure d-[16]**

[<sup>2</sup>H]<sub>4</sub>-Hexanol bzw. [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-Butanol wird mit Kaliumpermanganat unter Phasentransferkatalyse zur [<sup>2</sup>H]<sub>4</sub>-Hexansäure bzw. [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-Buttersäure oxidiert (92).

Ein Gemisch aus 500 mg [<sup>2</sup>H]<sub>4</sub>-Hexanal (5 mmol) bzw. 380 mg [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-Butanol (5 mmol), 10 ml Dichlormethan, 15 ml Wasser und 0,2 ml Aliquat 336 wird portionsweise unter kräftigem Rühren mit 1,6 g Kaliumpermanganat (10 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird durch Kühlung mit Eiswasser unter 15 °C gehalten und für 3 Stunden gerührt. Der entstandene Braunstein wird mit wässriger Hydrogensulfidlösung aufgelöst. Anschließend wird mit 0,5 M Schwefelsäure angesäuert und die organische Schicht abgetrennt. Die wässrige Phase wird zweimal mit 15 ml Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet.

### **[<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-2-Phenylethanol d-[21] und [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-3-Methylbutanol d-[7]**

Durch Reduktion mit LiAlD<sub>4</sub> wird Phenyllessigsäure bzw. 3-Methylbuttersäure in [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-2-Phenylethanol bzw. [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-3-Methylbutanol überführt (93).

680 mg (5 mmol) Phenyllessigsäure bzw. 510 mg 3-Methylbuttersäure (5 mmol) werden mit 420 mg (10 mmol) LiAlD<sub>4</sub> in 15 ml trockenem Diethylether bei Raumtemperatur

umgesetzt. Nach 30 min wird der Überschuss an  $\text{LiAlD}_4$  durch Zusatz von 15 ml 1 N HCl hydrolysiert und nach Abtrennung der etherischen Phase der Rückstand zweimal mit 15 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 15 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung gewaschen und die Lösung durch Destillation über eine Vigreux-Kolonnen aufkonzentriert.

### **$[\text{}^2\text{H}]_2$ -E,E-2,4-Decadienal d-[17]**

Über eine modifizierte Methode von Lin et al. (94) gelangt man ausgehend vom  $[\text{}^2\text{H}]$ -E-2-Octenal zum  $[\text{}^2\text{H}]_2$ -E,E-2,4-Decadienal.

500 mg (3,8 mmol)  $[\text{}^2\text{H}]_2$ -2-Octenal werden in 50 ml Methanol mit 1,3 g (3,8 mmol) (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran durch Rühren über eine Stunde bei Raumtemperatur zum  $[\text{}^2\text{H}]_2$ -Methyl-2,4-decadienoat umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Methanol am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand in 5 ml Pentan aufgenommen. Das Rohprodukt wird über eine Kieselgelsäule (20x300 mm) aufgereinigt (Elutionsmittel Pentan:Diethylether (95:5, v:v)).

$[\text{}^2\text{H}]_2$ -Methyl-2,4-decadienoat wird mit  $\text{LiAlH}_4$  wie für die Alkinole beschrieben zum  $[\text{}^2\text{H}]_2$ -2,4-Decadienol reduziert und der Alkohol mit Pyridiniumchromat wie für die Alkenole beschrieben zum  $[\text{}^2\text{H}]_2$ -E,E-2,4-Decadienal oxidiert.

### **[<sup>2</sup>H]<sub>3</sub>-Guaiacol d-[20]**

Catechol wird mit [<sup>2</sup>H]<sub>6</sub>-Dimethylsulfat zum [<sup>2</sup>H]<sub>6</sub>-Dimethoxybenzen umgesetzt und dieses durch selektive Abspaltung einer Methylgruppe ins [<sup>2</sup>H]<sub>3</sub>-Guaiacol überführt (95).

In einem Zweihalskolben mit Rückflusskühler werden 0,5 g Catechol (4,5 mmol) zusammen mit 1,85 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (13,5 mmol) in 15 ml Aceton gelöst und unter Rühren 1 g [<sup>2</sup>H]<sub>6</sub>-Dimethylsulfat (8 mmol) hinzugegeben. Nachdem das spontane Sieden aufgehört hat, wird für weitere 4 h unter Rückfluss erhitzt. Danach wird 1 ml konz. Ammoniak hinzugeben und für weitere 10 min unter Erhitzen gerührt. Dann 20 ml Wasser hinzugeben und dreimal mit 20 ml Diethylether extrahieren. Die organischen Phasen werden vereint und mit jeweils 15 ml 1 N NaOH und Wasser gewaschen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhält man das [<sup>2</sup>H]<sub>6</sub>-Dimethoxybenzen als bräunliches Öl.

Zu 400 mg (10 mmol) NaH in 5 ml DMF unter Eiskühlung und N<sub>2</sub>-Atmosphäre 560 mg Thioethanol in 3 ml DMF zutropfen lassen. Eisbad entfernen und 10 min bei Raumtemperatur rühren lassen. 650 mg (4,5 mmol) [<sup>2</sup>H]<sub>6</sub>-Dimethoxybenzol in 2 ml DMF zugeben und 3 Stunden unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre unter Rückfluss erhitzen. Nach dem Abkühlen mit 30 ml kaltem Wasser versetzen und zweimal mit 10 ml Petrolether extrahieren (org. Phasen verwerfen). Wässrige Phase mit eiskalter 4 N HCl ansäuern und dreimal mit 20 ml Diethylether extrahieren.

### **[<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-6,10-Dimethyl-1-undecen d-[9]**

3,7-Dimethyloctansäure wird zum [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-3,7-Octanol reduziert und dieses mit Hilfe eines Grignard-Reagenzes zum [<sup>2</sup>H]<sub>2</sub>-6,10-Dimethyl-1-undecen verlängert (96).

Die Reduktion von 3,7-Dimethyloctansäure zum  $[\text{}^2\text{H}]_2$ -3,7-Octanol erfolgt mit  $\text{LiAlD}_4$  wie für  $[\text{}^2\text{H}]_2$ -3-Methylbutanol beschrieben.

$[\text{}^2\text{H}]_2$ -3,7-Octanol wird mit  $\text{PBr}_3$  zum  $[\text{}^2\text{H}]_2$ -3,7-Octan-1-bromid umgesetzt. 1,5 g (0,01 mol) 3,7-Dimethyl-octan-1-ol und 0,03 mol Pyridin (2,37 g) in Dichlormethan (20 ml) werden tropfenweise mit einer Lösung von 0,01 mol  $\text{PBr}_3$  (2,72 g) in Dichlormethan (20 ml) versetzt. Nach dem Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wird die Lösung mit 40 ml Wasser versetzt und mit zweimal 40 ml Diethylether extrahiert (92).

1,1 g  $[\text{}^2\text{H}]_2$ -3,7-Octan-1-bromid (5 mmol) werden in 20 ml trockenem Tetrahydrofuran mit 750 mg Allylmagnesiumbromid (5 mmol) und katalytischen Mengen  $\text{LiCuCl}_4$  versetzt. Nach drei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung mit 30 ml 0,1 M HCl versetzt und dreimal mit je 25 ml Pentan extrahiert. Die vereinigten Pentanphasen werden über Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreux-Kolonne aufkonzentriert.

### **6,10-Dimethyl-1-undecen [9]**

Die unmarkierte Verbindung wurde analog zur markierten Verbindung ausgehend vom 3,7-Dimethyloctan-1-ol synthetisiert.

## **Konzentrationsbestimmung der markierten Standardlösungen**

Die Konzentrationen der markierten Standardlösungen wurden mittels Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte über in bekannter Konzentration zugesetzte interne Standards (Ethylbutanoat: d-[1], d-[2], d-[3] und d-[5]; Ethyloctanoat: d-[4], d-[6] bis d-[8], d-[10] bis d-[13], d-[15], d-[17] und d-[19] bis d-[21]; 3-Methylbuttersäure: d-[14], d-[16] und d-[18]; 3,7-Dimethyl-1-octen: d-[9], [9]). Die Responsefaktoren wurden zuvor durch Injektion von Mischungen von internen Standards und unmarkierten Standards bestimmt.

## **Quantifizierung mittels dynamischer Headspace-Injektion (Purge and Trap)**

Die leichtflüchtigen Verbindungen Aceton [22], Ethylacetat [23] und Ethanol [24] wurden mittels dynamischer Headspace-Injektion und anschließender gaschromatographischer Trennung mit massenselektiver Detektion (GC-MS) quantitativ bestimmt.

Ca. 200 mg Öl werden mit ca. 40 mg internem Standard ( $[^{13}\text{C}]_2$ -Aceton,  $[^{13}\text{C}]_2$ -Ethylacetat und  $[^2\text{H}]_3$ -Ethanol in Triolein) in ein 20 ml Head Space-Vial eingewogen. Man erwärmt die Probe im PTA 3000 (IMT, Moosbach, Deutschland) auf 40 °C und treibt für 5 min bei einem Fluss von 10 ml/min die flüchtigen Analyten mit Helium ausgetrieben. Diese werden auf einer Tenax-Falle bei -110 °C adsorbiert und nach Beendigung der Extraktion durch schnelles Aufheizen auf 250 °C auf die Analysensäule (FFAP, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke) überführt. Die gaschromatographische Trennung erfolgt bei einem Säulenvordruck von 90 kPa temperaturprogrammiert: 33 °C/5 min/30 °C min<sup>-1</sup>/250 °C/2,5 min. Die Detektion wird mittels DSQII (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) im EI-Modus

massenspektrometrisch durchgeführt und die Quantifizierung erfolgt durch Integration der in Tabelle 15 angegebenen Massenspuren. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgt wie bereits für die anderen Analyten beschrieben. Da die markierten Standards kommerziell bezogen wurden und deren Markierungsgrade ( $^2\text{H}$ -Atom% bzw.  $^{13}\text{C}$ -Atom% >98) bekannt waren, wurde für diese Substanzen kein Korrekturfaktor bestimmt bzw. dieser gleich 1 gesetzt.

### Statistische Bewertung der Aromastoffanalytmethoden

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und zur Abschätzung des Analysenfehlers wurden drei verschiedene Olivenölproben jeweils dreimal untersucht. Der Mittelwert und der Variationskoeffizient (relative Standardabweichung) wurden für die einzelnen Analyten für jede Probe bestimmt. Der Variationskoeffizient wurde zwischen den drei Proben für die Aromastoffe einzeln miteinander verglichen und gemittelt. Über den so bestimmten mittleren Variationskoeffizienten lässt sich der Analysenfehler für sämtliche Olivenölproben abschätzen. Der mittlere Variationskoeffizient berechnet sich

gemäß: 
$$\overline{VarK(x)} = \frac{\sum_{j=1}^m VarK(x_j)}{m}$$

mit 
$$VarK(x_j) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \times \frac{1}{x} \quad \text{und} \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Die mittleren Variationskoeffizienten, welche für die einzelnen Analyten bestimmt wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet.

### **5.3 Herstellung der Modellöle**

Die verschiedenen Modellöle wurden durch Lösen der einzelnen Aromastoffe in raffiniertem Rapsöl hergestellt. Dazu wurden die Aromastoffe zunächst einzeln in eine geringe Menge (5 g) Rapsöl eingewogen und diese Lösungen entsprechend den Konzentrationsverhältnissen in der endgültigen Mischung zu einer Vormischung vereinigt. Die Vormischungen wurden in die Schweiz geschickt und dort vor der sensorischen Untersuchung 1:500 mit raffiniertem Rapsöl verdünnt. Die in den Modellölen enthaltenen Aromastoffe und deren Konzentrationen sind in Tabelle 8 wiedergegeben.

### **5.4 Bestimmung der hydrophilen Substanzen**

#### **Olivenölproben**

Als Probenmaterial standen 54 Olivenölproben (Nr. B1-54) zur Verfügung. Die sensorischen Beurteilungen sowie die Herkunftsländer sind in Tabelle A3 aufgelistet.

#### **Chemikalien**

Die folgenden kommerziell erhältlichen Chemikalien wurden verwendet:

3-Hydroxytyrosol, Tyrosol, 4-Hydroxyphenylelessigsäure, Essigsäure, Borsäure, ortho-Phosphorsäure (Aldrich, Steinheim, Deutschland).

## **Lösungsmittel für die HPLC**

HPLC-grade (supra gradient grade) Acetonitril (ACN) wurde über Bischoff Chromatography (Leonberg, Deutschland) und die Ameisensäure (Reinheit ~98 %) über Fluka (Steinheim, Deutschland) bezogen. Reinstwasser wurde über ein TKA ultrapure water system (Thermo Fisher Scientific, Niederelbert, Deutschland) gewonnen.

## **Photometrische Bestimmung der Gesamtphenole**

Die photometrische Bestimmung der Gesamtphenole erfolgte nach einer kombinierten Methode aus den von Beltrán et al. (52) und Mateos et al. (53) beschriebenen Methoden. Die von Beltrán et al. beschriebene Methode beruht auf der Extraktion der Phenole und anschließender Bestimmung der Extinktion bei  $\lambda = 225$  nm. Da sehr viele Substanzen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 225$  nm absorbieren, ist diese Methode nicht sehr selektiv. Zur selektiveren Bestimmung der Phenole entwickelten Mateos et al. eine direkte photometrische Methode, welche die pH-Wert-Abhängigkeit des Extinktionsverhaltens von Phenolen bei  $\lambda = 274$  nm (s. Abb. 41) ausnutzt. Dazu wird die Extinktion der Olivenölprobe bei pH=5 gemessen und durch Zugabe von Natriumhydroxidlösung der pH-Wert schrittweise erhöht. Die Differenz aus beiden Extinktionen stellt ein Maß für den Phenolgehalt in Olivenöl dar. Für die schrittweise Zugabe der NaOH-Lösung verwendeten die Autoren ein spezielles Dosiersystem. Gibt man das gesamte Volumen an NaOH-Lösung auf einmal hinzu, fällt NaOH aus und die Lösung wird trüb. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Phenole zunächst wie von Beltrán et al. beschrieben aus dem Olivenöl extrahiert. Allerdings wurde die Extraktion anstatt mittels Festphasenextraktion über eine Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt. Die Bestimmung der Phenole erfolgte dann gemäß der Methode von Mateos et al. aus dem Extrakt über die pH-Wertabhängigkeit der Extinktion bei  $\lambda = 274$  nm.

0,1 g Öl werden in 3 ml Pentan gelöst und mit 5 ml eines Gemisches aus Methanol und Britton-Robinson-Puffer (pH=5) (80:20, v:v) extrahiert. Die Extinktion der polaren Phase wird bei  $\lambda=274$  nm gemessen. Das Gemisch wird durch Zugabe von 150  $\mu$ l NaOH (1 g/100 ml) alkalisiert und die Extinktion erneut bei  $\lambda=274$  nm gemessen. Die Messgröße errechnet sich gemäß folgender Formel:

$$Phenol_{Gesamt} = \frac{E(pH = 13) - E(pH = 5)}{m_{Einwaage}}$$

Britton-Robinson-Puffer: 5 mmol Essigsäure (300 mg), 5 mmol Borsäure (309 mg) und 5 mmol ortho-Phosphorsäure (490 mg) in 1 L Wasser. Mit 1% NaOH auf pH=5 eingestellt.

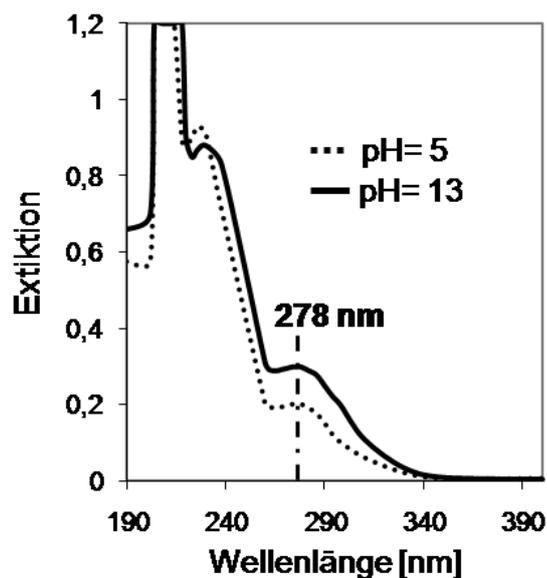


Abbildung 41: UV-VIS-Spektrum eines Olivenöl-Extraktes bei pH=5 (gepunktete Linie) und pH=13 (durchgezogene Linie)

## Semiquantitative Bestimmung hydrophiler Bestandteile

Die semiquantitative Bestimmung ausgewählter hydrophiler Bestandteile im Olivenöl erfolgte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels HPLC-MS.

Ca. 1 g Öl werden in 5 ml Pentan gelöst und nach der Zugabe von 100 µl interner Standardlösung (4-Hydroxyphenyllessigsäure in Methanol) mit 5 ml eines Methanol:Wasser (80:20, v:v) Gemisches extrahiert. Die Pentanphase wird verworfen und die polare Phase erneut mit 3 ml Pentan ausgeschüttelt. Die polare Phase wird direkt zur HPLC-MS-Analyse eingesetzt.

Die hochleistungsflüssigchromatographische (HPLC) Trennung erfolgte auf einer Agilent series 1290 HPLC-Anlage. Als Trennsäule diente eine Luna PFP(2) (3 µm, 100 Å, 150 x 2.0 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) temperiert auf 30 °C. Als Eluenten dienten 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und ein Gemisch aus Acetonitril und 0.1% wässriger Ameisensäure (90:10, v:v) (B). Die Eluenten-Zusammensetzung änderte sich während des Laufs folgendermaßen: von 10% (B) zu 40% (B) in 5 min, 50% (B) in 3 min, zu 90 % (B) in 2 min, 90% (B) gehalten für 4 min und zu 10 % (B) in 2 min.

Das Injektionsvolumen betrug 3 µl.

Das HPLC-System war gekoppelt mit einem Flugzeitmassenspektrometer Agilent MSD TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) ausgestattet mit einem Elektrosprayinterface im negativen Modus. Folgende Systemparameter wurden gewählt: Kapillarspannung, 4000 V; Verneblerdruck, 40 psi; Trocknungsgasflussrate, 10 L min<sup>-1</sup>; Gastemperatur, 300 °C; Skimmer-Spannung, 50 V; Octapole rf, 150 V; Fragmentor-Spannung, 130 V. LC-MS Massenspektren wurden mit einer Mindestauflösung von 10.000 (bestimmt bei  $m/z$  302) im Bereich  $m/z$  50-1000 aufgenommen. Das Instrument führte eine automatische Massenkalkulation über eine Dual-Vernebler Elektronensprayquelle durch, welche den Fluss vom Chromatographen zusammen mit einem niedrigem Fluss (ca. 5 µl min<sup>-1</sup>) einer Kalibrationslösung mit den Referenzmassen  $m/z$  119,03632 und  $m/z$  966,000725 ins Massenspektrometer

einbrachte. Die optimalen Ionisationsbedingungen wurden durch Infusion einer Lösung von 10 mg/l 3-Hydroxytyrosol in einer Mischung aus Methanol: 0,1 % wässriger Ameisensäure (50:50, v:v) evaluiert. MS-MS-Spektren wurden im negativen Modus aufgenommen. Die Fragmentierung der Analytmoleküle wurde bei einer Kollisionsenergie von 10 eV durchgeführt. Die massenspektrometrischen Rohdaten wurden mit Hilfe der Chromatographie-Software Agilent Mass Hunter Version B.04.00 ausgewertet.

Die semiquantitative Bestimmung der Analyten erfolgte über 4-Hydroxyphenyl-essigsäure als internen Standard (IS). Die Konzentrationen wurden durch Vergleich der Peakflächen der Analyten und des internen Standards ermittelt. Die verwendeten Massenspuren  $[M-H]^-$  sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die Integration der Peaks erfolgte aus den isolierten Massenspuren ( $\pm 10$  ppm). Die isolierten Massenspuren sind in Abbildung 42 dargestellt. Auf Grund des Auftretens verschiedener isomerer Verbindungen und deren Umlagerung ineinander, während der chromatographischen Trennung, sind die Peaks mancher Analyten nicht bis zur Basislinie getrennt. Daher wurden die Analyten **15a-i**, **17a-i** und **18b** als Summenparameter über alle Isomeren bestimmt. Dazu wurde über alle Signale mit derselben Masse ( $\pm 10$  ppm) integriert.

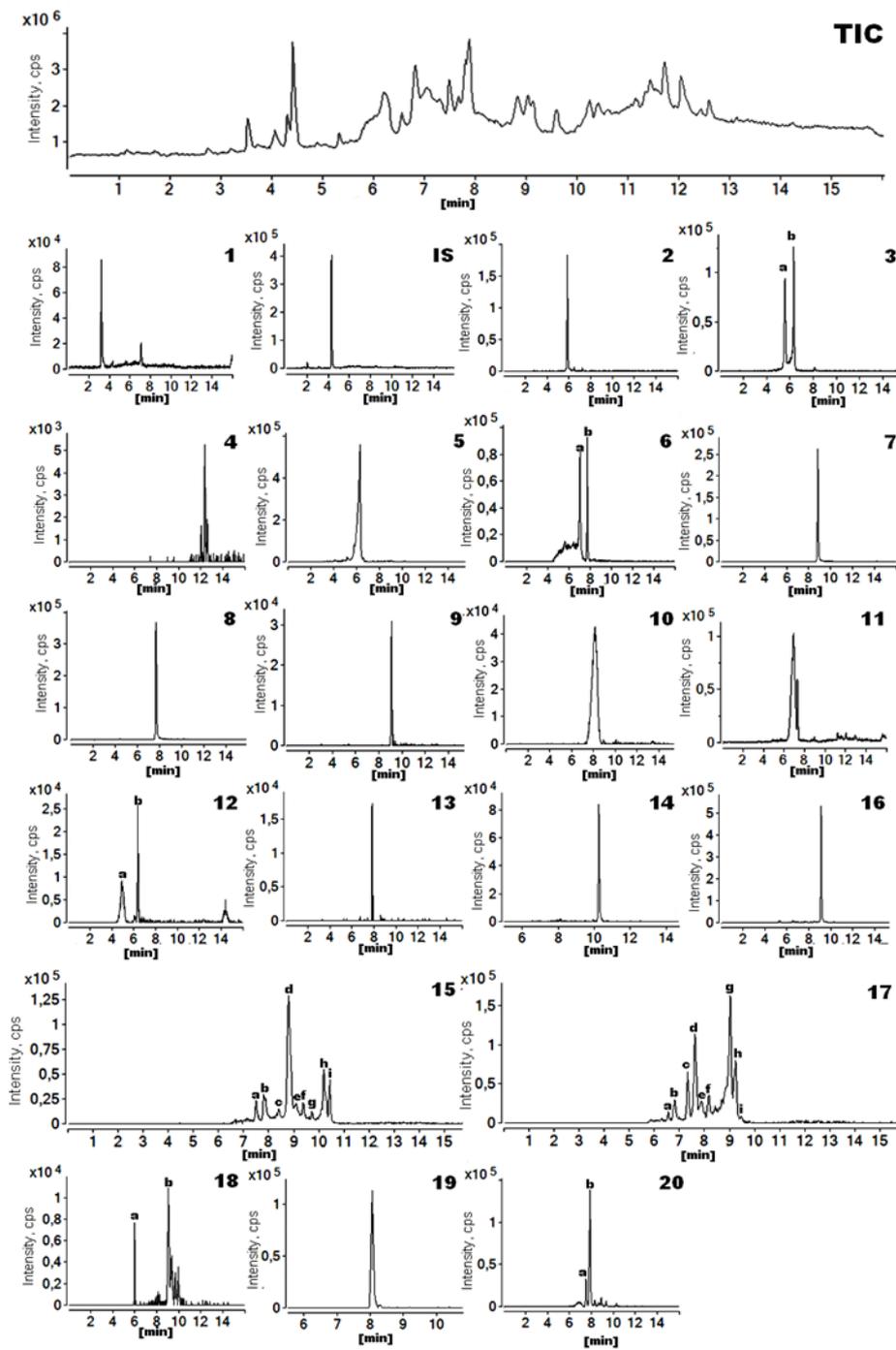


Abbildung 42: Massenspektren der im Olivenöl gefundenen hydrophilen Substanzen. Nummerierung und Masseladungszahlen siehe Tabelle 9

## Statistische Beurteilung der Methoden zur Bestimmung der hydrophilen Substanzen

Wie bereits für die Aromastoffmethoden beschrieben, erfolgte die Beurteilung der Methoden zur Analyse der hydrophilen Substanzen über die Bestimmung der mittleren Variationskoeffizienten über eine Dreifachbestimmung von drei verschiedenen Olivenölproben. Die ermittelten mittleren Variationskoeffizienten sind in Tabelle 16 aufgelistet.

**Tabelle 16: Mittlere Variationskoeffizienten für die semiquantitative Bestimmung mittels HPLC-MS**

Nr.	$\overline{VarK}$	Nr.	$\overline{VarK}$
1	3	11	7
2	10	12a	8
3a	9	12b	6
3b	20	13	n.b.
3a+b <sup>a</sup>	9	14	11
4	11	15a-i	10
5	9	16	7
6a	21	17a-i	12
6b	19	18a	7
6a+b <sup>a</sup>	10	18b	14
7	4	19	6
8	5	20a	12
9	9	20b	14
10	8		

**n.b. Substanz 13 war in allen drei mehrfach untersuchten Olivenölproben nicht nachweisbar.**  
**a Auf Grund von Isomerisierungsreaktionen ist der mittlere Variationskoeffizient für die Summe der Isomere kleiner als für die einzeln betrachteten Isomere.**

## 6 Abkürzungsverzeichnis

$\overline{VarK}$	mittlerer Variationskoeffizient
$^1\text{H-NMR}$	proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
amu	atomic mass unit
cf.	confer (vergleiche)
CI	chemical ionization
Da	Dalton
DLA	Decarboxymethyligstrosidalglycon
DOA	Decarboxymethyloleuropeinalglycon
DVB	Divenylbenzen
EG	Europäische Gemeinschaft
EI	electron impact
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FFAP	free fatty acid phase
FID	Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion
GC-O	Gaschromatographie mit olfaktometrischer Detektion
HPLC	high performance liquid chromatography
HS	head space
LA	Ligstrosidaglycon
LDA	linear discriminant analyses
LLE	liquid liquid extraction
LOX	Lipoxygenase

MLR	multilineare Regression
MOS	Metalloxidsensor
MS	Massenspektrometrie
MS-MS	Tandem-Massenspektrometrie
OA	Oleuropeinaglycon
OAV	odour activity value
PC	principal component
PCA	principal component analysis
PDMS	Polydimethylsiloxan
PLS-DA	partial least square discriminant analysis
PLS-R	partial least square regression
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
RI	Retentionsindex
SLDA	stepwise linear discriminant analyses
SPE	solid phase extraction
SPME	solid phase microextraction
V	Volumen

## 7 Literatur

1. Angerosa, F., *Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2002. 104, p. 639–660.
2. Procida, G., Giomi, A., Cichelli, A., Conte, L. S., *Study of volatile compounds of defective virgin oils and sensory evaluation: a chemometric approach*. J. Sci. Food Agric. 2005. 85, p. 2175–2183.
3. *Revised method for the organoleptic assessment of virgin olive oil*, Decision COI/T.20/Doc.No.15/Rev.3 Madrid Spain. 2010.
4. *Commission Regulation (EC) No 640/2008 of 4 July 2008 amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-pomace oil and on the relevant methods of analysis*. 2008.
5. Escuderos, M. E., Uceda, M., Sánchez, S., Jiménez, A., *Instrumental technique evolution for olive oil sensory analysis*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2007. 109, p. 536–546.
6. Matthäus, B., Fiebig, H.-J., *Die sensorische Untersuchung von Speiseölen – Teil 1*. Verbraucherdienst 1999. 44, p. 11–15.
7. Matthäus, B., Fiebig, H.-J., *Die sensorische Untersuchung von Speiseölen – Teil 2*. Verbraucherdienst 1999. 44, p. 34–38.
8. Lawless, H. T., *Descriptive analysis of complex odors: reality, model or illusion?* Food Quality and Preference 1999. 10, p. 325–332.
9. Laing, D., Willcox, M., *Perception of components in binary odour mixtures*. Chem. Senses 1983. 7, p. 249–264.
10. García-González, D. L., Aparicio, R., *Research in Olive Oil: Challenges for the Near Future*. J. Agric. Food Chem. 2010. 58, p. 12569–12577.
11. Rehner, G., Daniel, H., *Biochemie der Ernährung*. 1999, Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl.
12. Ohloff, G., *Riechstoffe und Geruchssinn. Die molekulare Welt der Düfte*. 1990, Berlin, New York: Springer-Verlag.
13. Rossiter, K. J., *Structure–Odor Relationships*. Chemical Reviews 1996. 96, p. 3201–3240.
14. Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., Buck, L. B., *Combinatorial Receptor Codes for Odors*. Cell 1999. 96, p. 713–723.
15. Darriet, P., Tominaga, T., Demole, E., Dubourdieu, D., *Evidence of the presence of a 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one precursor in Vitis vinifera Sauvignon blanc grape variety*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences 1993. p. 1332–1335.
16. Guth, H., *Determination of the Configuration of Wine Lactone*. Helv. Chem. Acta 1996. 79, p. 1559–1571.
17. Guth, H., Fritzler, R., *Binding Studies and Computer-Aided Modelling of Macromolecule/Odorant Interactions*. Chemistry & Biodiversity 2004. 1, p. 2001–2023.
18. Ullrich, F., Grosch, W., *Identification of the most intense volatile compounds formed during autoxidation linoleic acid*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1987, p. 277–282.

19. Morales, M. T., Tsimidou Maria, *The Role of Volatile Compounds and Polyphenols in Olive Oil Sensory Quality*. In *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*. 1999, Berlin: Springer Verlag.
20. Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G., *Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality*. *J. Chrom. A* 2004, p. 17–31.
21. Sánchez, J., Salas, J., *Biogenesis of Olive Oil Aroma*. In *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*. 1999, Berlin: Springer Verlag; pp 79–99.
22. Heldt, H.-W., Heldt, F., *Pflanzenbiochemie*. 1999, Heidelberg: Spektrum, Akad.-Verl.
23. Garcia-Gonzalez, D. L.; Morales, M. T.; Aparicio, R., *Olive and Olive Oil*. In *Handbook of fruit and vegetable flavor*. 2010, Hoboken; Wiley VCH.
24. Morales, M. T., Luna, G.; Aparicio, R., *Comparative study of virgin olive oil sensory defects*. *Food Chem.* 2005. *91*, p. 293–301.
25. Vichi, S., Romero, A., Gallardo-Chacón, J., Tous, J., López-Tamames, E., Buxaderas, S., *Influence of olives' storage conditions on the formation of volatile phenols and their role in off-odor formation in the oil*. *J. Agric. Food Chem.* 2009. *57*, p. 1449–1455.
26. El Riachy, M., Priego-Capote, F., León, L., Rallo, L., Luque Castro, M. D. de, *Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011. *113*, p. 678–691.
27. Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G., *Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil*. *J. Chrom. A* 2004. *1054*, p. 113–127.
28. Fu, S., Segura-Carretero, A., Arráez-Román, D., Menéndez, J. A., La Torre, A. de, Fernández-Gutiérrez, A., *Tentative Characterization of Novel Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oils by Rapid-Resolution Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry*. *J. Agric. Food Chem.* 2009. *57*, p. 11140–11147.
29. Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G., *Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality*. *J. Chrom. A* 2004. *1054*, p. 17–31.
30. Garcia, J. M., Sella, S., Perez-Camino, M. C., *Influence of Fruit Ripening on Olive Oil Quality*. *J. Agric. Food Chem.* 1996. *44*, p. 3516–3520.
31. Servili, M., Piacquadio, P., Stefano, G. de, Taticchi, A., Sciancalepore, V., *Influence of a new crushing technique on the composition of the volatile compounds and related sensory quality of virgin olive oil*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002. *104*, p. 483–489.
32. Amirante, P., Clodoveo, M. L., Dugo, G., Leone, A., Tamborrino, A., *Advance technology in virgin olive oil production from traditional and de-stoned pastes: Influence of the introduction of a heat exchanger on oil quality*. *Food Chem.* 2006. *98*, p. 797–805.
33. Di Giovacchino, L., *Technological Aspects*. In *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*. 1999, Berlin: Springer Verlag, pp 17–59.

34. Jiménez, A., Aguilera, M. P., Beltrán, G., Uceda, M., *Application of solid-phase microextraction to virgin olive oil quality control*. J. Chrom. A, 2006. 1121, p. 140–144.
35. Youssef, O., Youssef, N. B., Mokhtar, Z., Guido, F., *Influence of olive storage period on volatile compounds and oil quality of two Tunisian cultivars of Olea europea, Chemlali and Chetoui*. Intern. J. Food Sci. Technol. 2011. 46, p. 1245–1252.
36. Kiritsakis, A., Nanos, G., Polymenopoulos, Z., Thomai, T., Sfakiotakis, E., *Effect of fruit storage conditions on olive oil quality*. J. Am. Oil Chem. Soc. 1998. 75, p. 721–724.
37. Kalua, C. M., Bedgood, D. R., JR, Bishop A.G., Prenzler, P. D., *Discrimination of Storage Conditions and Freshness in Virgin Olive Oil*. J. Agric. Food Chem. 2006. 54, p. 7144–7151.
38. Luaces, P., Romero, C., Gutierrez, F., Sanz, C., Pérez, A. G., *Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil*. J. Sci. Food Agric. 2007. 87, p. 2721–2727.
39. Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R., *Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils*. Food Chem. 2001. 72, p. 19–28.
40. Guth, H., Grosch, W., *A Comparative Study of the Potent Odorants of Different Virgin Olive Oils*. Fett/Lipid 1991. 93, p. 335–339.
41. Reiners, J., Grosch, W., *Odorants of Virgin Olive Oils with Different Flavor Profiles*. J. Agric. Food Chem. 1998. 46, p. 2754–2763.
42. Zunin, P., Boggia, R., Lanteri, S., Leardi, R., De Andreis, Roberto, Evangelisti, F., *Direct thermal extraction and gas chromatographic-mass spectrometric determination of volatile compounds of extra-virgin olive oils*. J. Chrom. A 2004. 1023 p. 271–276.
43. Servili, M.; Conner, J. M.; Piggott, J. R.; Withers, S. J.; Paterson, A., *Sensory characterisation of virgin olive oil and relationship with headspace composition*, J. Sci. Food Agric. 1995. 67, p. 61–70.
44. Aparicio, R., Morales, M. T., *Characterization of Olive Ripeness by Green Aroma Compounds of Virgin Olive Oil*. J. Agric. Food Chem. 1998. 46 p. 1116–1122.
45. Arthur, C. L., Pawliszyn, J., *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Anal. Chem. 1990. 62, p. 2145–2148.
46. Jiménez, A., Beltrán, G., Aguilera, M. P., *Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils*. J. Chrom. A, 2004. 1028, p. 321–324.
47. Vichi, S. G. J. M., Caixach, J., Lopez-Tamames, E., Buxaderas, S., *Comparative study of different extraction techniques for the analysis of virgin olive oil aroma*. Food Chem., 2007. 105, p. 1171–1178.
48. Vichi, S., Castellote, A. I., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., López-Tamames, E., *Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection*. J. Chrom. A 2003. 983, p. 19–33.

49. Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L. S.; Buxaderas, S., Lopez-Tamames, E., *Solid-Phase Microextraction in the Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Fraction: Modifications Induced by Oxidation and Suitable Markers of Oxidative Status*. J. Agric. Food Chem. 2003. 51, p. 6564–6571.
50. Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A., *Analytical determination of polyphenols in olive oils*. J. Sep. Science, 2005. 28, p. 837–858.
51. Gutfinger, T., *Polyphenols in olive oils*. J. Am. Oil Chem. Soc. 1981. 58, p. 966–968.
52. Beltrán, G., Ruano, M. T., Jiménez, A., Uceda, M., Aguilera, M. P., *Evaluation of virgin olive oil bitterness by total phenol content analysis*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2007. 109, p. 193–197.
53. Mateos, R., Garcia-Ortiz Civantos, C., Castro, J., Garcia-Mesa, J. A., *Direct Spectrophotometric Determination of Bitterness in Virgin Olive Oil without Prior Isolation by pH Gradient*. J. Agric. Food Chem. 2005. 53, p. 9615–9619.
54. Angerosa, F., d'Alessandro, N., Konstantinou, P., Di Giacinto, L., *GC-MS Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil*. J. Agric. Food Chem. 1995. 43, p. 1802–1807.
55. Angerosa, F., d'Alessandro, N., Corana, F., Mellerio, G., *Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry*. J. Chrom. A 1996. 736, p. 195–203.
56. Carrasco-Pancorbo, A.; Neusüss, C.; Pelzing, M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A., *CE- and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil*. Electrophoresis 2007. 28, p. 806–821.
57. Suarez, M.; Macia, A., Romero, M., Motilva, M., *Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil*. J. Chrom. A 2008. 1214, p. 90–99.
58. Andrewes, P., Busch, J. L. H. C., Joode, T. de; Groenewegen, A., Alexandre, H., *Sensory Properties of Virgin Olive Oil Polyphenols: Identification of Deacetoxy-ligstroside Aglycon as a Key Contributor to Pungency*. J. Agric. Food Chem. 2003. 51, p. 1415–1420.
59. Gómez-Caravaca, A. M., Cerrerrani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Del Carlo, M., Compagnone, D., Cichelli, A., *Effects of Fly Attack (Bactrocera oleae) on the Phenolic Profile and Selected Chemical Parameters of Olive Oil*. J. Agric. Food Chem. 2008. 56, p. 4577–4583.
60. Gutiérrez, F., Albi, M. A.; Palma, R.; Rios, J. J., Olias, J. M., *Bitter taste of Virgin Olive Oil: Correlation of sensory evaluation and instrumental HPLC analysis*. J. Food Sci., 1989. 54, p. 68–70.
61. Gutiérrez Rosales, F.; Perdiguero, S.; Gutiérrez, R.; Olias, J., *Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil*. J. Am. Oil Chem. Soc., 1992. 69, p. 394–395.
62. Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F., Cert, A., *Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin Olive Oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection*. J. Agric. Food Chem. 2001. 49, p. 2185–2192.

63. Gutiérrez-Rosales, F., Ríos, J. J., Gómez-Rey, M. L., *Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. J. Agric. Food Chem. 2003. 51, p. 6021–6025.
64. Hrnčirik, K.; Fritsche, S., *Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2004. 106, p. 540–549.
65. Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E., *Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC*. J. Agric. Food Chem. 1992. 40, p. 1571–1576.
66. Bianco, A.; Buiarelli, F.; Cartoni, G.; Coccioli, F.; Muzzalupo, I.; Polidori, A.; Uccella, N., *Analysis by HPLC-MS/MS of biophenolic components in olives and oils*. Anal. Letters, 2001. 34, p. 1033–1051.
67. Danzer, K.; Hobert, H.; Fischbacher, C.; Jagemann K-U, *Chemometrik. Grundlagen und Anwendungen*. 2000, Berlin: Springer Verlag
68. Kessler, W., *Multivariate Datenanalyse*. 2007, Weinheim: WILEY-VCH
69. Angerosa, F., Di Giacinto, L., Vito, R., Cumitini, S., *Sensory Evaluation of Virgin Olive Oils by Artificial Neural Network Processing of Dynamic Head-Space Gas Chromatographic Data*. J. Sci. Food Agric., 1996. 72, p. 323–328.
70. Garcia-Gonzalez, D. L., Noelia Tena, Aparicio, R., *Characterization of olive paste volatiles to predict the sensory quality of virgin olive oil*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2007. 109, p. 663–672.
71. Mateos, R., Cert, A., Pérez-Camino, M., García, J., *Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives*. J. Am. Oil Chem. Soc., 2004. 81, p. 71–75.
72. Lanzón, A., Albi, T., Cert, A., Gracián, J., *The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining*, J. Am. Oil Chem. Soc. 1994. 71, p. 285–291.
73. Vichi, S., Romero, A., Tous, J., Tamames, E. L., Buxaderas, S., *Determination of volatile phenols in virgin olive oils and their sensory significance*. J. Chrom. A 2008. 1211, p. 1–7.
74. Grosch, W., *Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis*. Trends in Food Sci. Technol. 1993. 4, p. 68–73.
75. Guth, H.; Grosch, W., *Quantitation of Potent odorants of Virgin Olive Oil by Stable-Isotope Dilution Assays*. J. Am. Oil Chem. Soc. 1993. 5, p. 513–518.
76. Bortolomeazzi, R., Berno, P., Pizzale, L., Conte, Lanfranco S., *Sesquiterpene, Alkene and Alkane Hydrocarbons in Virgin Olive Oils of Different Varieties and Geographical Origins*. J. Agric. Food Chem. 2001. 49, p. 3278–3283.
77. Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop A.G., Prenzler, P. D., Robards, K., *Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review*. Food Chem. 2007. 100, p. 273–286.
78. Wang, Z., Hwang, J.-N., Kowalski, B. R., *ChemNets: Theory and Application*. Anal. Chem. 1995. 67, p. 1497–1504.
79. Morales, M. T., Ríos, J. J., Aparicio, R., *Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors*. J. Agric. Food Chem. 1997. 45, p. 2666–2673.

80. Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R., *Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds*. Food Chem. 2000. 68, p. 283–287.
81. Aparicio, R., Morales, M., Alonso, M., *Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by the sensory wheel*. J. Am. Oil Chem. Soc. 1996. 73, p. 1253–1264.
82. Inarejos-Garcia, A. M., Androulaki, A., Salvador, M. D., Fregapane, G., Tsimidou, M. Z., *Discussion on the objective evaluation of virgin olive oil bitterness*. Food Res. Inter. 2009. 42, p. 279–284.
83. Siliani, S., Mattei, A., Innocenti, L. B., Zanoni, B., *Bitter taste and phenolic compounds in extra virgin olive oil: an empirical relationship*. J. Food Quality 2006. 29, p. 431–441.
84. Fu, S., Arráez-Román, D., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., *Characterization of isomers of oleuropein aglycon in olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight and ion trap tandem mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass. Spectrom. 2009. 23, p. 51–59.
85. Bazoti, F. N., Gikas, E., Tsarbopoulos, A., *Simultaneous quantification of oleuropein and its metabolites in rat plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Biomed. Chrom. 2009. 24, p. 506–515
86. Obied, H., Bedgood, D.; Prenzler, P.; Robards, K., *Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography*. Anal. Chim. Acta 2007. 603, p. 176–189.
87. Limiroli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilio, V., Bianchi, G., Zetta, L.,  *$1H$  and  $13C$  NMR characterization of new oleuropein aglycones*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1995. 1, p. 1519–1523.
88. Christophoridou, S.; Dais, P.; Tseng, L.-H.; Spraul, M., *Separation and Identification of Phenolic Compounds in Olive Oil by Coupling High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Solid-Phase Extraction to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (LC-SPE-NMR)*. J. Agric. Food Chem. 2005. 53, p. 4667–4679.
89. Esterbauer H, *Autoxidation of methyl linoleate in water III. Separation of water soluble reaction products by chromatography*. Fette, Seifen, Anstrichm. 1968. 70, p. 1–4.
90. Guth, H., Grosch, W., *3-Methylnonane-2,4-dione – An Intense Odour Compound Formed during Flavour Reversion of Soya-Bean Oil*. Fett Wiss. Technol. 1989. 91, p. 225–230.
91. Guth H., Grosch, W., *Deterioration of Soya-bean Oil: Quantification of Primary Flavour Compounds Using a Stable Isotope Dilution Assay*. Lebensm. Wiss. Technol. 1990. 23, p. 513–522.
92. Becker, H. G. O., *Organikum*. 2001, Weinheim: WILEY-VCH.
93. Schieberle, P., *Primary odorants of pale lager beer*. Z. Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A 1991. 193, p. 558–565.
94. Lin, J., Fay, L., Welti, D., Blank, I., *Synthesis of trans-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal and its deuterated analog used for the development of a sensitive and selective quantification method based on isotope dilution assay with negative chemical ionization*. Lipids 1999. 34, p. 1117–1126.

95. Mirrington, R. N.; Feutrill, G. I., *Orcinol Monomethyl Ether*. *Organic Syntheses* 1988, p. 859.
96. Huo, S.; Negishi, E., *A Convenient and Asymmetric Protocol for the Synthesis of Natural Products Containing Chiral Alkyl Chains via Zr-Catalyzed Asymmetric Carboalumination of Alkenes. Synthesis of Phytol and Vitamins E and K*. *Organic Letters* 2001. 3, p. 3253–3256.

## 8 Anhang

# Prüfbogen

Datum: \_\_\_\_\_ Prüfer-Code: G \_\_\_\_\_ Probennummer: \_\_\_\_\_

### Negative Attribute

stichig-schlammig

modrig-feucht

weinig-essigsauer

metallisch

ranzig

andere

### Positive Attribute

fruchtig

Nase		Geschmack / Geruch		
	+	++	+++	
<b>Reifezustand der Olive</b> unreif reif	+ <input type="checkbox"/>	++ <input type="checkbox"/>	+++ <input type="checkbox"/>	süss Gras frisch geschnitten
<b>Nuss, Mandel, Pinie - frisch</b> nussartig (frisch) mandelartig (frisch) pinienartig (frisch)	+ <input type="checkbox"/>	++ <input type="checkbox"/>	+++ <input type="checkbox"/>	<b>Nuss, Mandel, Pinie - getr.</b> nussartig (getr.) mandelartig (getr.) pinienartig (getr.)
<b>Früchte</b> grüner Apfel reifer Apfel grüne Banane reife Banane Zitrus Cassis Melone kandierte Früchte	+ <input type="checkbox"/>	++ <input type="checkbox"/>	+++ <input type="checkbox"/>	<b>Gemüse, Kräuter</b> grüne Tomate reife Tomate Artischocke Pilze Kräuter

bitter

scharf

### Gesamteindruck / Ausgewogenheit

Harmonie

Negativ (total unharmonisch)      Standard      positiv (Spitzenöle)

Dauerhaftigkeit

kurz      Standard      lang

Abbildung A 1: Erweiterter Sensorik-Prüfbogen des Schweizer Olivenöl-Panels

Tabelle A 1: Sensorikdaten Olivenölproben A1-95

Nr.	Land	Fehler	Fruchtigkeit	Bitterkeit	Schärfe	Klassifizierung	Jahr
A1	G	k	3.2	1.7	2.4	1	2008
A2	T	k	3.6	2.0	3.2	1	2008
A3	S	k	2.2	1.4	1.2	1	2008
A4	S	k	1.9	1.5	1.6	1	2008
A5	S	k	4.2	3.4	3.4	1	2008
A6	S	k	4.2	2.5	2.7	1	2008
A7	P	r0.95	2.0	1.8	1.5	-1	2008
A8	P	r1.3	0.0	0.9	1.0	-1	2008
A9	I	k	3.2	2.2	2.6	1	2008
A10	I	k	2.5	1.8	1.6	1	2008
A11	I	k	4.3	3.0	3.6	1	2008
A12	G	r0.8	4.1	2.2	1.6	-1	2008
A13	S	k	2.8	2.2	2.0	1	2008
A14	I	r0.5	1.9	1.5	2.4	-1	2008
A15	I	k	3.2	1.9	1.9	1	2008
A16	S	k	3.7	2.5	3.7	1	2008
A17	S	k	4.3	3.4	3.8	1	2008
A18	S	k	4.2	3.6	3.6	1	2008
A19	G	k	3.4	2.1	2.4	1	2008
A20	G	k	3.4	2.3	2.5	1	2008
A21	G	k	3.6	1.9	2.5	1	2008
A22	S	k	4.5	3.4	4.0	1	2008
A23	S	k	3.7	2.1	2.4	1	2008
A24	S	k	4.6	2.4	3.9	1	2008
A25	S	k	4.1	2.5	3.0	1	2008
A26	Sl	k	5.1	2.9	4.1	1	2008
A27	K	a1.8	4.2	1.3	2.0	-1	2008
A28	T	r1.2;a 0.7	2.1	1.3	2.3	-1	2008
A29	Is	k	2.7	1.5	1.8	1	2008
A30	S	k	3.9	2.9	3.2	1	2008
A31	G	k	4.6	2.1	3.0	1	2008
A32	G	k	3.8	2.1	2.1	1	2008
A33	G	k	4.6	2.5	3.4	1	2008
A34	G	k	3.7	2.0	2.7	1	2008
A35	I	m0.4;r 1.4	2.2	1.0	1.0	-1	2008
A36	I	k	4.4	2.1	2.9	1	2008
A37	S	m2.2	1.3	0.8	1.0	-1	2008
A38	T	k	3.7	2.8	2.5	1	2008
A39	S	k	2.3	1.3	1.3	1	2008
A40	S	k	2.1	1.4	2.0	1	2008
A41	S	k	2.4	2.2	2.1	1	2008
A42	K	k	3.1	2.2	2.3	1	2008
A43	S	k	3.2	1.1	2.1	1	2008
A44	S	k	3.9	2.6	2.4	1	2008
A45	S	k	4.80	2.20	2.95	1	2009
A46	S	k	4.9	2.5	3.2	1	2009

S: Spanien; I: Italien; G: Griechenland; K: Kroatien; T: Türkei; Is: Israel; P: Portugal; Sl: Slowenien; SA: Saudi Arabien; M:Marokko

k: kein Fehler; r: ranzig; m: stichig-schlammig; f: modrig-feucht

Fortsetzung Tabelle A1

Nr.	Land	Fehler	Fruchtigkeit	Bitterkeit	Schärfe	Klassifizierung	Jahr
A47	I	k	4.4	2.2	2.9	1	2009
A48	I	k	4.9	3.2	2.9	1	2009
A49	S	k	4.5	2.1	2.2	1	2009
A50	S	k	5.4	2.7	3.7	1	2009
A51	S	k	4.2	1.7	1.8	1	2009
A52	I	k	4.5	2.1	2.6	1	2009
A53	S	k	5.0	2.0	3.3	1	2009
A54	S	f0.5	4.0	1.8	1.9	-1	2009
A55	S	k	5.2	2.6	2.9	1	2009
A56	SA	r1.1	3.3	1.5	1.4	-1	2009
A57	S	k	3.8	1.9	2.7	1	2009
A58	Is	k	3.8	2.4	1.9	1	2009
A59	S	r1.4	4.2	1.4	1.4	-1	2009
A60	I	k	5.7	2.7	2.6	1	2009
A61	S	r0.4	3.8	2.2	1.9	-1	2009
A62	I	k	5.0	1.9	2.7	1	2009
A63	I	k	5.1	2.4	2.8	1	2009
A64	G	r0.7	3.6	1.6	1.4	-1	2009
A65	G	k	4.2	1.7	2.2	1	2009
A66	G	k	4.1	1.4	1.6	1	2009
A67	G	k	4.7	1.9	2.1	1	2009
A68	G	k	3.4	1.4	1.1	1	2009
A69	G	k	4.5	1.8	1.8	1	2009
A70	I	m1.1	2.20	1.30	1.30	-1	2010
A71	Is	f1.6;r1.2	2.00	0.60	0.50	-1	2010
A72	P	m1.7	3.60	0.90	0.70	-1	2010
A73	S	r1.75	2.15	0.65	0.75	-1	2010
A74	M	r0.75	2.90	0.65	0.75	-1	2010
A75	G	m2.7;a2.2	2.70	1.15	1.60	-1	2010
A76	J	r1.2	3.55	1.50	1.40	-1	2010
A77	P	r2.8	1.85	0.55	0.55	-1	2010
A78	SA	r1.4	3.00	1.50	1.80	-1	2010
A79	A	r2.7	1.60	0.60	0.45	-1	2010
A80	G	r1.4	2.90	1.10	1.00	-1	2010
A81	I	r2.8	1.10	0.35	0.45	-1	2010
A82	G	r1.3	2.90	1.10	1.10	-1	2010
A83	I	f1.80	0.65	0.45	0.00	-1	2010
A84	I	r1.60	2.10	0.70	1.10	-1	2010
A85	I	k	4.50	2.30	2.30	1	2010
A86	I	k	5.15	1.95	2.50	1	2010
A87	G	f0.6	0.98	0.75	0.95	-1	2010
A88	I	k	3.90	1.75	2.25	1	2010
A89	S	k	2.80	1.35	1.50	1	2010
A90	I	k	3.30	1.70	1.80	1	2010
A91	I	k	3.50	2.10	2.20	1	2010
A92	G	k	4.25	2.10	2.70	1	2010
A93	I	k	3.15	1.00	1.20	1	2010
A94	I	r2.8	1.13	0.55	0.55	-1	2010
A95	I	f1.6;r1.2	1.05	0.60	0.50	-1	2010

Tabelle A 2: Quantifizierungsdaten der 24 Aromastoffe. Angaben in [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A1	1	1	1	922	12	517	70	2725	3727	3308	2490	1439
A2	1	1	1	1432	8	576	58	11998	1496	624	2072	690
A3	2	2	1	1025	7	338	135	2950	1263	1022	2875	493
A4	1	1	1	3452	1	218	73	11968	2432	64	1246	1447
A5	1	1	1	315	7	359	85	238	10181	1453	2917	570
A6	1	1	1	1384	6	552	88	5354	12357	1074	3835	687
A7	5	12	3	1142	44	87	591	4539	3449	1968	2572	1049
A8	5	14	5	981	32	157	508	3887	5314	1684	2204	1102
A9	2	1	1	1104	11	207	140	14213	1061	465	1066	923
A10	2	1	1	1550	9	111	99	13025	435	745	616	959
A11	1	1	1	1222	4	3075	86	6925	2654	817	2635	668
A12	1	1	2	693	11	89	78	428	6118	4082	3133	629
A13	1	1	1	399	2	863	43	17108	>100	503	812	786
A14	2	1	1	701	6	132	167	4811	3473	255	601	1103
A15	2	1	1	836	8	121	138	7227	1925	269	608	1115
A16	1	1	1	830	12	678	51	3433	>100	920	1051	1240
A17	1	1	1	844	6	397	45	8966	859	509	787	665
A18	1	1	1	698	7	514	44	3007	1211	428	1144	490
A19	1	1	1	864	12	269	67	4830	3956	2305	912	928
A20	1	1	1	691	8	319	39	5023	5783	2191	912	1107
A21	1	1	1	1236	14	214	80	4528	3423	2603	991	1156
A22	1	1	1	539	1	2159	26	1154	6897	1945	4524	400
A23	1	1	1	558	1	1755	52	2167	9587	835	7995	450
A24	1	1	1	400	1	2139	48	1051	1790	3151	3276	449
A25	1	1	1	968	3	418	77	177	989	920	6952	342
A26	1	1	1	2362	1	960	62	17487	100	58	2471	1548
A27	1	1	7	679	9	505	410	4052	613	55	1531	790
A28	1	1	2	2103	2	234	4	957	3873	191	670	2368
A29	1	1	1	1844	5	220	102	8591	9165	299	1540	100
A30	2	2	1	306	1	197	92	1100	6615	185	6428	375
A31	1	1	1	619	17	452	131	848	>100	2601	5380	690
A32	1	1	1	1146	16	162	108	5225	3856	2514	1522	871
A33	1	1	1	781	3	284	77	5481	2503	1843	1071	994
A34	2	1	1	815	14	374	83	5291	7316	3798	1364	958
A35	1	1	1	2307	9	119	190	10955	3370	122	624	844
A36	1	1	3	1220	9	171	165	11005	624	433	970	999
A37	43	95	6	688	4	125	272	2243	3945	76	1524	2124
A38	1	1	1	1459	5	1048	92	3409	7574	442	2073	706
A39	3	7	1	50	6	47	466	120	3458	158	10646	373
A40	1	1	1	458	2	624	107	4951	3203	610	4289	468
A41	21	51	10	327	20	70	905	795	2687	625	1810	873
A42	1	1	1	1077	3	388	130	6112	599	152	2590	727
A43	1	5	12	314	13	165	82	4166	1740	1211	640	1418
A44	3	17	5	330	13	462	136	906	11580	2261	2079	407
A45	1	1	1	249	10	458	123	3020	2191	3245	2779	380
A46	1	1	1	771	1	6436	5	1434	1319	1939	4895	212

Nummerierung der Aromastoffe wie in Tabelle 1

Fortsetzung Tabelle A2

Nr.	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A1	976	30	37	151	277	95	4	327	36919	150873	277234
A2	749	30	65	32	64	81	2	42	64794	31736	63828
A3	573	20	38	158	213	92	2	146	38023	158147	212949
A4	229	68	85	275	586	74	1	96	85258	275148	586290
A5	924	16	37	85	179	107	1	37	37148	85463	179441
A6	1024	30	49	39	193	129	5	54	49168	38738	192778
A7	5424	35	426	102	459	152	49	594	426192	102287	459186
A8	4429	32	295	134	394	183	50	525	294831	134230	394078
A9	1509	37	60	163	365	113	8	244	59754	163146	364659
A10	813	34	71	127	337	63	9	205	70649	127237	337017
A11	296	20	47	122	259	76	9	209	47379	122105	259371
A12	75	18	44	80	203	91	12	309	44158	79864	202559
A13	325	26	33	86	196	50	1	105	33412	85818	195623
A14	482	41	64	97	330	45	42	350	64421	96571	329521
A15	474	43	52	123	301	119	11	373	51677	122689	300730
A16	279	32	50	124	249	60	3	88	49896	124180	248896
A17	340	14	25	98	165	115	4	47	25175	97657	164884
A18	433	16	42	63	353	73	1	38	41788	63341	352554
A19	315	23	111	105	193	98	7	197	110727	105493	192790
A20	285	26	134	156	279	96	2	177	134214	156044	278917
A21	293	29	42	124	250	78	15	241	42390	123834	249939
A22	568	14	54	106	138	197	0	30	54461	106150	138012
A23	243	12	47	93	131	68	1	222	47056	93345	130927
A24	515	13	10	114	129	158	0	57	10000	114479	128663
A25	266	20	64	141	238	97	0	63	63671	140785	237555
A26	311	53	28	118	278	149	1	117	28352	118280	278281
A27	1655	19	40	133	419	118	14	281	40445	133232	418571
A28	286	34	20	20	2126	257	6	45	20380	20196	2126385
A29	803	51	54	140	729	140	9	64	54323	139720	728872
A30	921	8	14	107	158	36	1	166	13951	107421	158374
A31	97	18	17	74	144	113	9	130	16959	73636	144360
A32	194	31	77	40	151	70	9	203	77002	39903	150720
A33	248	19	42	67	208	76	12	266	42439	67305	208459
A34	467	47	73	114	272	95	5	444	72567	114481	271634
A35	1312	76	91	486	724	44	40	149	91099	485640	724308
A36	1498	32	17	128	370	117	10	192	17072	127994	370351
A37	2105	47	106	185	272	52	2	237	105756	185120	271634
A38	324	24	69	99	316	630	20	1462	68765	98609	315593
A39	5785	8	31	74	193	103	3	168	31005	74130	193466
A40	1232	18	32	87	234	62	6	141	31876	86777	234473
A41	2138	28	73	79	166	45	3	189	73348	78631	165545
A42	485	28	235	175	538	150	2	156	234846	174664	538443
A43	361	31	59	106	219	74	3	55	58516	106286	219100
A44	581	15	205	85	161	210	3	65	205029	84744	160686
A45	2883	9	94	20	124	90	2	125	93783	20064	124299
A46	347	5	35	44	166	195	7	39	35131	44497	165663

Fortsetzung Tabelle A2

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A47	1	1	1	952	13	4971	86	3098	951	981	3618	576
A48	1	1	1	324	3	1855	51	2925	114	2542	24185	602
A49	1	1	1	221	7	1000	91	2270	30371	3687	3192	290
A50	1	1	1	545	1	6128	14	993	19011	1447	3742	311
A51	1	1	1	223	14	652	187	1009	3444	8139	5628	511
A52	1	1	1	1017	6	2534	84	1462	832	453	9647	703
A53	2	1	1	442	6	2939	91	2104	719	693	4622	369
A54	1	15	1	553	15	352	184	5480	13693	2279	2421	6427
A55	1	6	1	303	3	1241	134	2497	7747	419	4507	1039
A56	1	1	1	1584	15	568	246	7670	100	1423	3397	496
A57	4	3	2	1314	20	848	403	3206	11039	562	1072	1326
A58	1	1	1	322	9	637	79	333	5130	5110	7167	449
A59	6	1	1	1305	1	142	156	981	6481	610	3354	1053
A60	1	1	5	160	22	1017	90	1197	3965	2739	1543	595
A61	2	1	1	624	22	400	76	7115	3125	1277	1319	761
A62	1	1	1	662	6	2333	30	4175	1333	3513	4016	437
A63	3	3	1	778	12	3826	115	3960	2354	840	2237	639
A64	1	1	1	355	16	119	127	3296	3525	2018	1103	845
A65	3	1	1	1148	24	298	126	6336	3938	2420	1487	1446
A66	1	1	1	592	14	1796	38	3749	7778	4085	1728	517
A67	1	1	1	481	10	940	74	6071	3909	1455	1217	560
A68	1	1	1	836	14	417	115	7699	1854	1257	1443	1366
A69	1	1	1	453	6	441	51	4843	10608	1631	929	1124
A70	2	1	1	147	16	78	164	1254	3854	2614	3069	876
A71	3	1	1	518	66	70	6562	2902	171	48	891	2197
A72	1	1	1	1060	1	55	344	4037	699	23	1240	1213
A73	8	28	4	544	26	278	715	2460	5616	952	2474	839
A74	4	18	2	552	29	103	432	1666	4477	1660	2909	623
A75	6	12	1	786	15	284	396	5330	6702	50	2780	604
A76	1	1	1	461	16	172	171	5530	3881	1522	1056	1418
A77	4	8	1	4280	20	1709	349	5402	4755	348	1313	3105
A78	3	2	1	399	6	807	69	2246	170	1467	3954	698
A79	1	1	1	2429	1	114	265	5858	2440	14	466	1248
A80	2	1	1	1794	9	148	151	20569	409	69	589	876
A81	1	1	1	953	2	77	114	5459	629	37	324	1516
A82	4	7	1	751	5	314	103	1251	652	445	1589	533
A83	3	1	1	257	88	37	433	120	2908	636	1080	6192
A84	2	1	1	795	26	134	808	3705	663	489	1068	1339
A85	4	1	1	851	5	141	372	21365	>100	75	797	521
A86	2	1	1	587	9	1587	108	2732	327	593	2814	251
A87	5	3	1	1024	24	81	1107	4066	241	425	747	719
A88	4	1	1	726	36	96	293	5621	3793	2543	769	1723
A89	3	20	1	642	5	524	191	1469	4087	1202	2964	322
A90	1	1	1	687	12	61	135	5468	2598	2315	897	983
A91	1	1	1	372	1	468	179	3257	4012	756	3405	723
A92	4	7	1	382	5	279	394	8215	341	50	2723	189
A93	6	4	1	587	45	581	366	1871	957	999	8213	284
A94	7	24	5	4800	23	533	478	6078	6189	317	936	2047
A95	6	1	1	352	46	47	6353	1460	135	28	475	957

Fortsetzung Tabelle A2

Nr.	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A47	344	20	66	146	132	65	1	70	65620	146103	131942
A48	311	12	30	68	175	146	1	162	30367	68240	174951
A49	1301	4	11	28	165	223	7	33	10599	28023	164784
A50	405	5	88	47	122	209	5	27	88388	47172	122158
A51	871	7	31	40	191	222	6	89	30841	40468	191307
A52	410	26	37	146	187	60	6	66	36712	145771	186544
A53	1603	9	56	100	195	57	1	58	55639	99962	194990
A54	1493	66	141	78	348	142	12	224	140696	78179	347995
A55	445	13	135	72	206	53	4	168	134506	72409	206022
A56	855	14	735	89	429	92	35	261	735381	88585	428614
A57	239	95	47	72	230	55	0	63	46569	71955	229590
A58	1056	10	102	25	158	98	0	69	101802	25125	158408
A59	451	34	511	46	636	74	5	67	511404	46387	635526
A60	284	11	64	45	100	100	6	48	63588	45098	99859
A61	105	17	10	99	142	207	4	314	10000	99245	141850
A62	1045	13	27	19	285	94	1	57	27062	18828	284792
A63	508	26	68	92	124	64	2	84	68388	91660	123745
A64	132	15	18	65	161	60	1	184	17999	64942	161006
A65	425	35	80	70	243	106	24	474	80147	69503	243218
A66	43	14	29	38	108	86	8	240	28551	37528	107696
A67	2958	17	86	53	110	106	32	346	86015	52716	109564
A68	146	33	10	143	195	81	8	268	10000	142863	195080
A69	65	27	64	2	158	92	15	278	64176	1571	157892
A70	133	17	110	57	633	144	55	459	110351	56534	632598
A71	1184	55	87	169	723	77	84	1461	86707	169082	722717
A72	253	41	91	71	321	33	1	122	91292	71181	320935
A73	3640	25	79	70	198	159	63	216	78914	70109	197650
A74	3500	20	159	76	394	90	127	235	159108	76321	393772
A75	1043	13	107	43	200	64	7	138	107467	42634	199900
A76	688	22	158	61	184	141	25	262	158434	60770	183956
A77	330	85	76	156	7664	149	0	530	76406	155789	7663788
A78	308	19	82	282	213	172	0	112	81822	281903	213060
A79	311	111	115	285	1023	152	8	225	114575	284685	1023229
A80	1703	110	55	379	659	41	40	236	54998	379063	658989
A81	169	109	41	315	290	60	14	115	40500	314594	290144
A82	662	24	162	137	289	191	6	203	161793	136786	289361
A83	131	22	92	41	214	171	73	228	92040	41097	213974
A84	1792	40	78	193	562	121	21	720	77623	192837	561941
A85	854	67	38	74	454	70	44	248	37755	73570	453901
A86	1163	31	45	143	426	39	1	112	45221	142775	425664
A87	2680	71	115	126	688	105	20	752	115247	125607	687808
A88	1376	48	78	46	446	126	24	372	77945	45895	445607
A89	2276	35	54	72	374	189	3	122	53634	71848	374437
A90	701	36	46	54	320	104	15	317	45659	54032	320461
A91	1288	58	29	86	261	347	0	130	29338	85860	261358
A92	1989	22	22	102	244	33	4	295	22442	102321	243997
A93	1004	21	48	77	367	82	5	86	48226	76712	367053
A94	697	131	49	91	6136	207	0	757	49006	91429	6136064
A95	1094	67	48	129	482	69	59	1464	47689	129027	481665

**Tabelle A 3: Sensorikdaten Olivenölproben B1-54**

Nr.	Bitterkeit	Schärfe	Herkunft	Nr.	Bitterkeit	Schärfe	Herkunft
B1	1.50	1.80	S	B28	1.20	1.40	I
B2	1.35	1.60	S	B29	1.50	2.50	I
B3	1.10	1.35	I	B30	1.25	1.95	G
B4	1.30	2.25	I	B31	1.00	1.10	S
B5	0.80	1.60	S	B32	0.85	1.10	S
B6	2.70	2.40	S	B33	1.10	1.70	I
B7	0.90	1.25	I	B34	0.95	0.95	Is
B8	3.10	3.70	S	B35	1.05	1.30	Is
B9	3.10	3.60	I	B36	1.05	1.30	Is
B10	1.45	1.65	G	B37	0.50	0.60	Is
B11	1.20	1.50	S	B38	3.00	3.05	P
B12	0.90	1.20	S	B39	3.30	2.85	I
B13	1.05	1.60	C	B40	3.30	3.90	I
B14	1.05	1.30	G	B41	3.05	3.15	I
B15	1.50	2.60	S	B42	0.90	1.00	S
B16	3.00	3.20	P	B43	2.70	2.30	S
B17	3.50	3.30	P	B44	1.30	1.90	I
B18	2.95	3.25	P	B45	1.40	2.10	C
B19	0.80	1.30	F	B46	1.20	1.80	S
B20	1.50	2.20	T	B47	0.70	0.80	P
B21	3.25	3.30	P	B48	1.20	2.50	P
B22	2.70	3.30	I	B49	3.20	3.10	S
B23	3.20	3.40	S	B50	2.70	2.90	S
B24	1.40	1.40	P	B51	1.25	1.60	I
B25	1.40	1.70	S	B52	2.70	3.10	S
B26	0.85	1.55	P	B53	1.25	2.50	I
B27	1.25	1.90	P	B54	1.35	2.25	I

**S: Spanien; I: Italien; G: Griechenland; C: Kalifornien (USA); T: Türkei; Is: Israel; P: Portugal;  
F: Frankreich**

**Tabelle A 4: Gesamtphenolgehalte**

Nr.	Gesamtphenolgehalt	Nr.	Gesamtphenolgehalt
B1	0.99	B28	0.85
B2	0.36	B29	1.02
B3	0.78	B30	1.44
B4	0.84	B31	0.26
B5	0.68	B32	1.41
B6	1.78	B33	0.33
B7	0.90	B34	1.20
B8	5.15	B35	0.34
B9	2.48	B36	1.37
B10	1.88	B37	1.44
B11	0.72	B38	3.51
B12	0.17	B39	1.86
B13	0.74	B40	2.52
B14	3.60	B41	2.57
B15	0.98	B42	0.83
B16	2.79	B43	2.65
B17	2.64	B44	0.78
B18	3.17	B45	0.67
B19	1.09	B46	0.66
B20	1.19	B47	1.92
B21	3.82	B48	0.61
B22	1.53	B49	4.14
B23	3.26	B50	2.43
B24	0.78	B51	1.05
B25	1.86	B52	2.18
B26	0.56	B53	0.60
B27	0.64	B54	0.49

Tabelle A 5: Semiquantitative Daten HPLC-MS. Angaben in mmol/kg

Nr.	1	2	3a	3b	4	5	6a	6b	7	8	9	10
B1	1.95	0.23	0.07	0.04	0.01	3.51	0.03	0.02	0.14	0.33	0.13	0.68
B2	0.10	0.23	<0.01	0.01	0.01	0.58	0.02	<0.01	0.05	0.12	0.02	1.61
B3	0.31	0.26	0.17	0.01	0.01	0.77	0.01	<0.01	0.14	0.30	0.03	0.28
B4	1.68	0.22	0.10	0.03	0.01	2.90	0.02	0.01	0.04	0.13	0.04	0.47
B5	0.13	0.30	0.04	0.02	0.01	1.32	0.04	0.01	0.17	0.52	0.17	0.15
B6	0.20	0.21	0.03	0.02	0.01	3.35	0.04	0.00	0.40	0.55	0.08	1.50
B7	0.24	0.34	0.10	0.03	0.01	2.34	0.04	0.03	0.07	0.16	0.04	0.99
B8	0.16	0.28	0.11	0.04	0.01	5.51	0.19	0.15	0.48	0.72	0.05	0.46
B9	0.11	0.28	0.11	0.02	0.01	3.74	0.13	0.08	0.04	0.09	0.02	2.19
B10	3.07	0.30	0.13	0.09	0.01	3.85	0.02	0.02	0.30	0.58	0.11	0.04
B11	0.08	0.30	0.02	0.03	0.01	0.77	0.03	0.04	0.18	0.37	0.22	0.13
B12	1.25	0.35	0.00	0.12	0.01	0.81	0.03	0.02	0.22	0.51	0.20	0.01
B13	0.11	0.23	0.08	0.02	0.01	1.60	0.03	0.01	0.19	0.46	0.20	0.28
B14	0.82	0.28	0.25	0.22	0.01	2.95	0.04	0.04	0.26	0.54	0.08	0.36
B15	0.11	0.30	0.03	0.03	0.01	2.29	0.03	0.02	0.16	0.39	0.22	0.48
B16	0.25	0.32	0.20	0.02	0.01	3.51	0.08	0.04	0.35	0.43	0.11	1.09
B17	0.30	0.36	0.19	0.02	0.01	3.66	0.05	0.04	0.33	0.44	0.11	1.53
B18	0.29	0.28	0.23	0.01	0.01	4.35	0.07	0.05	0.32	0.40	0.08	1.54
B19	0.07	0.21	0.03	0.03	0.01	1.08	0.05	0.03	0.31	0.25	0.01	0.08
B20	0.03	0.25	0.03	0.01	0.01	0.54	0.03	0.02	0.15	0.11	0.08	0.93
B21	0.37	0.24	0.24	0.03	0.01	5.64	0.05	0.04	0.36	0.59	0.07	0.68
B22	0.19	0.23	0.15	0.02	0.01	4.09	0.05	0.04	0.11	0.22	0.04	1.31
B23	0.04	0.31	0.06	0.04	0.01	4.02	0.12	0.08	0.18	0.44	0.12	0.70
B24	1.41	0.32	0.11	0.02	0.01	1.46	0.01	0.01	0.15	0.34	0.06	1.00
B25	0.30	0.30	0.04	0.05	0.01	4.14	0.04	0.04	0.48	0.46	0.11	1.34
B26	1.41	0.23	0.19	0.01	0.01	0.82	0.01	<0.01	0.14	0.39	0.08	0.42
B27	1.57	0.27	0.17	0.01	0.01	1.20	0.01	<0.01	0.15	0.39	0.07	0.53
B28	0.15	0.22	0.08	0.01	0.01	3.49	0.02	0.00	0.06	0.17	0.12	1.95
B29	0.58	0.27	0.09	0.03	0.01	3.43	0.03	0.03	0.05	0.15	0.06	1.16
B30	0.19	0.32	0.15	0.02	0.01	2.03	0.03	0.02	0.33	0.45	0.07	0.53
B31	0.00	0.33	0.03	0.02	0.01	0.91	0.00	0.00	0.12	0.12	0.02	0.50
B32	2.15	0.29	0.01	0.02	0.01	3.35	0.14	0.00	0.08	0.18	0.03	0.72
B33	0.08	0.26	0.05	0.01	0.01	0.29	0.01	0.01	0.21	0.36	0.05	1.26
B34	0.18	0.29	0.06	0.02	0.01	1.30	0.01	0.01	0.07	0.13	0.08	1.41
B35	0.01	0.26	0.00	0.04	0.01	0.37	0.01	0.01	0.08	0.23	0.03	0.09
B36	0.20	0.37	0.07	0.03	0.01	2.97	0.03	0.01	0.06	0.14	0.03	1.46
B37	0.79	0.26	0.03	0.02	0.01	2.21	0.01	0.01	0.08	0.15	0.04	0.91
B38	0.15	0.21	0.23	0.03	0.01	2.30	0.09	0.05	0.28	0.45	0.05	1.00
B39	0.53	0.30	0.10	0.02	0.01	3.49	0.05	0.03	0.34	0.54	0.15	0.85
B40	0.24	0.23	0.12	0.03	0.01	11.10	0.09	0.05	0.03	0.11	0.04	2.85
B41	0.19	0.27	0.10	0.04	0.01	2.27	0.07	0.06	0.28	0.49	0.07	1.13
B42	0.34	0.26	0.03	0.02	0.01	1.54	0.02	0.01	0.18	0.08	0.05	0.64
B43	0.75	0.33	0.20	0.04	0.01	2.17	0.06	0.05	0.09	0.25	0.06	0.26
B44	0.86	0.34	0.06	0.02	0.01	1.79	0.02	0.01	0.19	0.37	0.07	0.95
B45	0.09	0.35	0.06	0.02	0.01	1.24	0.02	0.01	0.22	0.44	0.22	0.23
B46	0.12	0.28	0.02	0.01	0.01	0.72	0.02	0.01	0.18	0.39	0.20	0.27
B47	0.68	0.24	0.06	0.03	0.01	1.30	0.02	0.02	0.21	0.31	0.08	0.63
B48	0.27	0.23	0.05	0.01	0.01	0.58	0.03	0.01	0.23	0.47	0.23	0.38
B49	0.49	0.38	0.05	0.03	0.01	3.27	0.05	0.02	0.12	0.34	0.04	1.14
B50	0.04	0.23	0.04	0.03	0.01	1.47	0.10	0.06	0.21	0.29	0.06	0.21
B51	1.11	0.30	0.15	0.02	0.01	2.28	0.01	0.01	0.18	0.29	0.08	1.11
B52	0.01	0.26	0.06	0.03	0.01	1.92	0.10	0.13	0.27	0.28	0.15	0.40
B53	0.21	0.24	0.04	0.02	0.01	0.73	<0.01	<0.01	0.21	0.35	0.08	1.06
B54	0.15	0.28	0.06	0.02	0.01	0.44	0.01	<0.01	0.23	0.30	0.07	1.04

Nummerierung der hydrophilen Substanzen wie in Tabelle 9

Fortsetzung Tabelle A5

Nr.	11	12a	12b	13	14	15a-i	16	17a-i	18a	18b	19	20a	20b
B1	4.14	0.02	0.18	n.d.	n.d.	0.38	0.09	1.94	0.04	0.21	0.02	n.d.	0.02
B2	1.78	0.05	0.08	n.d.	n.d.	0.21	0.08	0.74	0.05	0.03	0.02	n.d.	0.01
B3	1.16	0.01	0.08	n.d.	0.03	1.19	0.52	4.83	n.d.	0.08	0.18	0.02	0.10
B4	0.70	0.01	0.08	n.d.	0.01	1.13	0.08	1.74	0.01	0.08	0.05	0.01	0.07
B5	1.59	0.07	0.07	n.d.	0.01	0.18	0.17	0.98	0.05	0.39	0.10	n.d.	0.00
B6	1.14	0.13	0.05	n.d.	0.08	6.22	0.56	4.34	n.d.	0.19	0.01	0.16	0.78
B7	2.59	0.04	0.12	n.d.	0.02	0.83	0.34	1.79	0.01	0.10	0.02	0.01	0.07
B8	0.91	0.06	0.03	n.d.	0.06	9.57	0.71	9.55	n.d.	0.17	0.04	0.32	1.74
B9	5.87	0.06	0.16	n.d.	0.01	2.60	0.11	5.14	0.02	0.15	0.06	0.05	0.24
B10	0.13	0.00	0.06	n.d.	0.03	7.15	0.26	6.71	n.d.	0.17	0.02	0.21	1.08
B11	0.08	0.00	0.01	n.d.	0.01	0.28	0.06	0.32	n.d.	0.19	0.08	n.d.	0.02
B12	0.07	0.00	0.04	n.d.	0.02	0.19	0.18	0.42	n.d.	0.10	0.09	n.d.	0.01
B13	1.47	0.03	0.07	n.d.	n.d.	0.28	0.06	1.21	0.01	0.30	0.12	n.d.	0.01
B14	0.77	0.00	0.04	n.d.	0.12	11.79	0.94	11.32	n.d.	0.17	0.01	0.41	2.12
B15	1.73	0.08	0.09	n.d.	0.01	0.41	0.13	1.43	0.01	0.30	0.07	n.d.	0.03
B16	3.08	0.06	0.24	n.d.	0.03	6.80	0.45	9.19	0.01	0.12	0.00	0.17	0.82
B17	4.13	0.09	0.25	n.d.	0.03	7.74	0.45	11.59	n.d.	0.13	0.00	0.20	1.06
B18	4.12	0.09	0.25	n.d.	0.03	7.05	0.48	11.37	n.d.	0.12	0.00	0.18	0.91
B19	0.05	0.00	0.00	n.d.	0.09	2.09	0.51	1.11	n.d.	0.12	0.04	0.07	0.34
B20	0.80	0.00	0.04	n.d.	0.02	3.24	0.24	2.34	n.d.	0.05	0.03	0.08	0.45
B21	1.87	0.08	0.09	n.d.	0.03	10.85	0.35	13.43	n.d.	0.23	0.00	0.38	1.89
B22	3.43	0.08	0.19	n.d.	0.01	1.18	0.15	2.41	0.01	0.10	0.05	0.02	0.10
B23	3.53	0.10	0.11	n.d.	0.03	5.99	0.47	11.57	0.01	0.23	0.04	0.16	0.88
B24	2.93	0.01	0.26	n.d.	0.02	1.94	0.17	4.05	n.d.	0.25	0.02	0.04	0.21
B25	4.38	0.07	0.31	n.d.	0.01	3.33	0.18	6.24	0.01	0.16	0.10	0.10	0.51
B26	1.78	0.01	0.10	0.02	0.01	0.44	0.10	1.85	n.d.	0.19	0.05	n.d.	0.03
B27	1.96	0.01	0.15	n.d.	0.01	0.89	0.06	2.58	n.d.	0.22	0.03	0.02	0.09
B28	3.11	0.04	0.11	n.d.	0.01	0.92	0.04	1.89	0.01	0.06	0.03	0.01	0.04
B29	1.42	0.02	0.06	n.d.	0.01	0.72	0.08	1.74	0.02	0.06	0.02	n.d.	0.03
B30	0.77	0.01	0.03	n.d.	0.02	4.53	0.20	5.58	n.d.	0.19	0.04	0.12	0.56
B31	0.07	0.00	0.00	n.d.	0.02	0.36	0.04	0.28	n.d.	0.05	0.04	n.d.	0.01
B32	0.96	0.00	0.12	n.d.	0.06	5.24	0.65	9.49	0.01	0.72	0.00	0.08	0.28
B33	2.68	0.07	0.10	n.d.	0.01	0.31	0.16	1.39	n.d.	0.04	0.03	n.d.	0.02
B34	2.05	0.14	0.08	n.d.	0.02	4.91	0.21	6.49	n.d.	0.07	0.06	0.13	0.65
B35	0.01	0.00	0.00	n.d.	0.01	0.70	0.07	0.59	n.d.	0.04	0.01	0.02	0.08
B36	0.09	0.02	0.14	n.d.	0.01	4.26	0.04	4.05	n.d.	0.10	0.06	0.06	0.25
B37	1.43	0.09	0.13	n.d.	0.01	4.23	0.11	7.11	n.d.	0.10	0.04	0.11	0.57
B38	2.37	0.07	0.08	n.d.	0.02	7.58	0.27	13.78	n.d.	0.63	0.00	0.19	1.01
B39	2.96	0.06	0.21	n.d.	0.04	3.18	0.60	6.02	n.d.	0.14	0.06	0.08	0.43
B40	6.47	0.00	0.22	n.d.	0.01	3.65	0.07	4.68	n.d.	0.11	0.03	0.05	0.32
B41	3.96	0.02	0.18	n.d.	0.02	4.51	0.27	9.36	0.01	0.06	0.01	0.10	0.57
B42	2.06	0.00	0.06	0.01	0.01	1.85	0.17	4.45	n.d.	0.38	0.09	0.03	0.15
B43	1.27	0.01	0.07	n.d.	0.01	6.93	0.24	18.53	n.d.	0.44	0.02	0.21	1.04
B44	1.87	0.03	0.18	n.d.	0.02	1.80	0.26	2.56	n.d.	0.09	0.07	0.04	0.21
B45	1.03	0.04	0.06	n.d.	0.01	0.25	0.07	0.94	0.02	0.27	0.04	n.d.	0.01
B46	0.70	0.04	0.03	n.d.	0.02	1.02	0.27	1.93	0.01	0.21	0.09	0.03	0.16
B47	1.70	0.01	0.11	n.d.	0.05	4.97	0.53	7.63	0.00	0.80	0.04	0.15	0.75
B48	1.84	0.02	0.14	n.d.	0.01	0.22	0.11	1.28	0.05	0.28	0.10	n.d.	0.01
B49	3.37	0.05	0.09	n.d.	0.07	13.11	0.81	21.59	n.d.	0.37	n.d.	0.42	1.94
B50	0.20	0.01	0.01	n.d.	0.05	11.03	0.48	7.26	n.d.	0.13	n.d.	0.34	1.84
B51	2.33	0.01	0.28	n.d.	0.02	2.42	0.27	3.40	n.d.	0.09	0.04	0.07	0.36
B52	0.33	0.01	0.01	n.d.	0.01	1.62	0.08	1.52	n.d.	0.26	0.07	0.05	0.26
B53	2.13	0.07	0.10	n.d.	0.03	1.21	0.26	1.90	n.d.	0.07	0.02	0.03	0.16
B54	2.81	0.03	0.14	n.d.	0.04	0.96	0.27	2.23	n.d.	0.05	0.04	0.01	0.07

n.d. nicht detektiert