



Entwicklung analytischer Methoden zur Objektivierung sensorischer  
Qualitätskontrollen von Haselnusskernen

Vom Fachbereich C - Mathematik und Naturwissenschaften  
der Bergischen Universität Wuppertal  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigte Dissertation

von

Anke Sies

Wuppertal 2004

**Für Björn**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 1999 bis April 2003 im Fach Lebensmittelchemie, Fachbereich C - Mathematik und Naturwissenschaften der Bergischen Universität Wuppertal unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Guth.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. März 2004  
Referent: Prof. Dr. H. Guth  
Korreferent: Prof. Dr. S. Gäb

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Guth für die sehr interessante Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. S. Gäb danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeiten zu den Untersuchungen der Aromavorstufen und für die Übernahme des Korreferats.

Für die hilfreiche Zusammenarbeit während der Analyse der Hydroperoxyfettsäuren bedanke ich mich bei Herrn Dr. O. Schmitz und Herrn Dr. D. Melchior.

Bei Herrn Dr. M. Podeschwa bedanke ich mich für seine praktischen Tipps zur Synthese der Aromastoffe und seinen ausgelassenen Humor.

Herrn Dr. B. Medeke danke ich für die Programmierungen zur Auswertung der GC-Chromatogramme und für das Korrekturlesen der Arbeit.

Für die Verkostung der Haselnusskerne danke ich ganz besonders Herrn Dr. W. Sturm.

Herrn A. Brakelmann und der Belegschaft der Mechanischen Werkstatt danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und für die Herstellung diverser Materialien. Ebenso danke ich Herrn J. Luderich und seinen Mitarbeitern der Glasbläserei für die Spezialanfertigung zahlreicher Glasgeräte.

Den Firmen LECO Instrumente (Mönchengladbach) und ATAS Deutschland (Magdala) danke ich für die Bereitstellung von Arbeitsmaterialien und Geräten. Für die freundliche Betreuung während der in Mönchengladbach durchgeführten Untersuchungen bedanke ich mich bei Herrn Dr. R. Hirsch und Herrn Dr. R. Löscher.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Petz sowie bei allen meinen Kolleginnen und Kollegen bedanke ich mich herzlich für viele kreative Gespräche und das freundliche Arbeitsklima.

Mein ganz privater Dank gilt Frau J. Abel, Frau K. Babanek, Herrn Dr. B. Medeke, Frau L. Rizzoli und Frau P. Sies für die freundschaftliche Begleitung während dieser Zeit.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>DIAGRAMMVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 EINFÜHRUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>8</b>
<b>3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Charakterisierung des eingesetzten Untersuchungsmaterials.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Identifizierung relevanter Aromastoffe in frischen und gelagerten Haselnusskernen.....</b>	<b>13</b>
3.2.1 AEVA.....	13
3.2.2 Identifizierung von Aromakomponenten mittels Flash-Chromatographie.....	17
3.2.3 Identifizierung von Geruchstoffen in Haselnussölen mittels TCT-HRGC-O.....	19
3.2.4 Diskussion.....	28
<b>3.3 Quantifizierung wichtiger Geruchsstoffe in Haselnusskernen.....</b>	<b>31</b>
3.3.1 DTD/Fast-GC/TOF- Massenspektrometrie .....	32
3.3.2 Ergebnisse der Isotopenverdünnungsanalyse.....	58
3.3.3 Vergleich der TCT-HRGC-MS mit der DTD/Fast-GC/TOF-MS .....	60
3.3.4 Diskussion.....	63
<b>3.4 Aromavorstufen in Haselnusskernen .....</b>	<b>65</b>
3.4.1 Hydroperoxydbestimmungen mittels HPLC .....	65
3.4.2 Hydroperoxidbestimmungen mittels CE .....	69
3.4.3 Diskussion.....	73
<b>4 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>75</b>

<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>77</b>
<b>5.1</b>	<b>Methoden und Gerätesysteme</b>	<b>77</b>
5.1.1	AEVA	77
5.1.2	TCT-HRGC-O	80
5.1.3	Flash-Chromatographie	85
5.1.4	DTD/Fast-GC/TOF- Massenspektrometrie	86
5.1.5	Isotopenverdünnungsanalyse	87
5.1.6	Hydroperoxydbestimmung mittels HPLC	88
5.1.7	Hydroperoxydbestimmung mittels CE	89
<b>5.2</b>	<b>Synthesevorschrift der Aromastoffe</b>	<b>90</b>
5.2.1	3-Methyl-4-heptanon	90
5.2.2	[ <sup>2</sup> H]-3-Methyl-4-heptanon	91
5.2.3	[ <sup>2</sup> H]-(E,E)-2,4-Nonadienal und [ <sup>2</sup> H]-(E,E)-2,4-Nonadienal	93
<b>5.3</b>	<b>Synthesevorschrift der Hydroperoxide</b>	<b>95</b>
5.3.1	Photooxygenierung	95
5.3.2	Enzymatische Synthese	95
<b>ANHANG</b>		<b>97</b>
	<b>Ergebnisse Fraunhofer- Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV, Freising)</b>	<b>97</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
	<b>Chemikalienliste</b>	<b>109</b>
	<b>Geräteliste</b>	<b>112</b>

## Abstract

An analytical method was developed for the rapid determination of sensory quality deviations of hazelnuts. The method is based on the investigation of aroma spectra via direct thermal desorption of lipids and on the identification of relevant components using a time of flight mass spectrometer after chromatographic separation (DTD/Fast-GC/TOF-MS).

The sample preparation is quite simple and the application as fast-GC shortens the analysis time substantially. Small deviations in the sensory impression correlated with measurable changes in the aroma profile obtained by the developed method. A classification and consequently an evaluation of the quality of the nuts was achieved using different models of statistical evaluation and discriminant analysis.

The compounds used as markers for quality deviations of hazelnuts in the DTD/Fast-GC/TOF-MS analysis were identified by applying aroma extract dilution analysis (AEDA) and olfactory investigations of thermal desorbed oils from hazelnuts (TCT-HRGC-O). We identified homologous aldehydes from hexanal to undecanal as well as 2,4-(E,E)-nonadienal and 2,4-(E,E)-decadienal as autoxidation products of lipids and original constituents like the monoterpenes  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene, camphene and  $\Delta$ -3-carene.

To clarify the cause of peroxidative deterioration of hazelnuts, hydroperoxy fatty acids as precursors of aroma compounds from peroxidation products were investigated using HPLC and MEKC. It was shown that the peroxidative damage of hazelnuts was mostly caused by lipoxygenase activity.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEVA	Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse
BG	Bestimmungsgrenze
CE	Kapillarelektrophorese
CHARM	Combined Hedonic Response Measurement
DIN	Deutsche Industrienorm
DTD	Direkte thermische Desorption
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Erfassungsgrenze
EI	Elektronenstoß-Ionisierung
EOF	Elektroosmotischer Fluss
FD-Faktor	Aromastoff-Verdünnungsfaktor
FFAP	Free Fatty Acid Phase
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HP	Hydroperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HODE	Hydroxylinolsäure
HPOE	Isomere Hydroperoxide der Ölsäure
HPODE	Isomere Hydroperoxide der Linolsäure
HPOTE	Isomere Hydroperoxide der Linolensäure
HRGC-MS	Hochauflösende Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HRGC-O	Hochauflösende Gaschromatographie-Olfaktometrie
IVA	Isotopenverdünnungsanalyse



IVV	Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung
ID	Kapillarinne Durchmesser
INSTD	Innerer Standard
ISTD	Interner Standard
MEKC	Micellare elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
MSD	Massenselektiver Detektor
NP-HPLC	Normalphasen-HPLC
NWG	Nachweisgrenze
P	Wahrscheinlichkeit
PDC	Pyridiniumdichromat
PTI	Purge and Trapp-Injektion
PTV	Programmable Temperatur Vaporisation
POZ	Peroxidzahl
QM	Quantifizierungsmasse
RI	Retentionsindex
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFE	Supercritical Fluid Extraction
SPME	Solid Phase Micro Extraction
SZ	Säurezahl
TCT	Thermal-Desorption-Cold-Trap
TOF-MS	Time-of-Flight-Mass-Spectrometry
UV-DAD	UV-Diodenarray-Detektor
v/v	Volumenanteil

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1	Geographische Karte der Türkei.....	10
Abbildung 3.2	Aufbau und Funktionsweise des TCT-Injektors.....	19
Abbildung 3.3	Prinzip der DTD/Fast-GC/TOF-MS Analyse.....	31
Abbildung 3.4	Getestete Glaslinerkonstruktionen.....	34
Abbildung 3.5	Reproduzierbarkeit von Ölinjektionen bei der dynamischen Thermodesorption.....	34
Abbildung 3.6	Temperaturabhängigkeit der DTD-Injektion.....	35
Abbildung 3.7	Zeitabhängigkeit der DTD-Injektion.....	36
Abbildung 3.8	Einfluss der Standzeiten von Haselnussöl auf die Geruchsstoffkonzentrationen.....	36
Abbildung 3.9	Vergleich der Massenspur 57 für die sensorisch verkosteten Haselnusskerne.....	43
Abbildung 3.10	Vergleich der Massenspur 72 für die sensorisch verkosteten Haselnusskerne.....	43
Abbildung 3.11	Ergebnis der Diskriminanzanalyse.....	49
Abbildung 3.12	HPLC-Chromatogramm im Chemolumineszenz-Modus.....	67
Abbildung 5.1	Reaktionsmechanismus zur Synthese des [ <sup>2</sup> H]-3-Methyl-4-heptanon.....	91
Abbildung 5.2	Massenspektren des 3-Methyl-4-heptanons und des [ <sup>2</sup> H]-3-Methyl-4-heptanons.....	92
Abbildung 5.3	Reaktionsmechanismus Synthese [ <sup>2</sup> H]-(E,E)-2,4-Decadienal u. [ <sup>2</sup> H]-(E,E)-2,4-Nonadienal.....	93
Abbildung 5.4	Massenspektren [ <sup>2</sup> H]-(E,E)-2,4-Nonadienal und [ <sup>2</sup> H]-(E,E)-2,4-Decadienal.....	94

## Diagrammverzeichnis

Diagramm 3.1	Gemittelte Wetterdaten Türkei Zonguldak.....	11
Diagramm 3.2	Extraktionsausbeuten Oxidationsprodukte u. $\alpha$ -Pinen bei 30 u. 60 Min. Desorption.....	21
Diagramm 3.3	Extraktionsausbeuten Oxidationsprodukte nach dreimaliger Desorption.....	21
Diagramm 3.4	FD-Faktoren ausgewählter Verbindungen der Ernte 2000 und Ernte 1998 n.....	26
Diagramm 3.5	Konzentration Geruchstoffe für Sonnenblumenöle.....	38
Diagramm 3.6	Aromawerte (nasal) Geruchstoffe für Sonnenblumenöle.....	39
Diagramm 3.7	Konzentration Monoterpene und Filberton in Einzelnüssen Ernte 2000 u. Ernte 1998 n.....	40
Diagramm 3.8	Konzentration Peroxidationsprodukte in Einzelnüssen der Ernte 2000 u. Ernte 1998 n.....	42
Diagramm 3.9	Konzentration n-Alkane in Einzelnüssen der Ernte 2000 u. Ernte 1998 n.....	42
Diagramm 3.10	Konzentrationsunterschiede 3-Methyl-4-heptanon in den Ernten 2000 - 1998 (n,k).....	45
Diagramm 3.11	Konzentrationsunterschiede (E,E)-2,4-Nonadienal in den Ernten 2000 - 1998 (n,k).....	46
Diagramm 3.12	Konzentrationsunterschiede Hexanal in den Ernten 2000 - 1998 (n,k).....	46
Diagramm 3.13	Konzentrationsunterschiede Octanal in den Ernten 2000 - 1998 (n,k).....	47
Diagramm 3.14	Konzentration des Filbertons in rohen und gerösteten Haselnusskernen der Ernte 2000.....	50
Diagramm 3.15	Qualitätsfaktor NUSSARTIG für Einzelnüsse (Modellrechnung).....	52
Diagramm 3.16	Qualitätsfaktor RANZIG für Einzelnüsse (Modellrechnung).....	52
Diagramm 3.17	Qualitätsfaktor ANDERSARTIG für Einzelnüsse (Modellrechnung).....	53
Diagramm 3.18	Qualitätsfaktor RANZIG für Verschneidungen (Modellrechnung).....	54
Diagramm 3.19	Qualitätsfaktor ANDERSARTIG für Verschneidungen (Modellrechnung).....	54
Diagramm 3.20	Qualitätsfaktor RANZIG für Verschneidungen (Modellrechnung).....	55
Diagramm 3.21	Faktor NUSSQUALITÄT über $\alpha$ -Pinen als ISTD (Modellrechnung).....	56
Diagramm 3.22	Faktor NUSSQUALITÄT über $\alpha$ -Pinen als ISTD, Verschneidungen (Modellrechnung).....	56
Diagramm 3.23	Qualitätsfaktor RANZIG für Verschneidungen der Ernte 2000 mit der Ernte 1998 k.....	61
Diagramm 3.24	Qualitätsfaktor RANZIG für Verschneidungen der Ernte 2000 mit der Ernte 1998 n.....	61
Diagramm 3.25	Faktor NUSSQUALITÄT über $\alpha$ -Pinen als INSTD für Versch. Ernte 2000 mit Ernte 1998 k.....	61
Diagramm 3.26	Faktor NUSSQUALITÄT über $\alpha$ -Pinen als INSTD für Versch. Ernte 2000 mit Ernte 1998 n.....	62
Diagramm 3.27	Öl (HPOE)- und Linolsäurehydroperoxide (HPODE) in Haselnussproben.....	68
Diagramm 3.28	Flächenwerte der mit der TCT-Methode untersuchten Aromastoffe.....	69
Diagramm 6.1	Größenverteilung der Haselnusskerne zum Zeitpunkt der Ernte 2000 nach IVV.....	97
Diagramm 6.2	Peroxidase-Aktivität roher Haselnusskerne nach IVV.....	100
Diagramm 6.3	Lipoxidase-Aktivität in rohen Haselnusskernen nach IVV.....	101
Diagramm 6.4	Phenoloxidase-Aktivität roher Haselnusskerne nach IVV.....	101
Diagramm 6.5	Alkoholdehydrogenase in rohen Haselnusskernen nach IVV.....	101

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Übersicht der Probenmenge und Lagerbedingungen.....	11
Tabelle 3.2	Teilergebnisse der AEVA der Ernte 2000 und der Ernte 1998 n.....	14
Tabelle 3.3	Teilergebnisse der AEVA der Ernte 2000 g und der Ernte 1998 n g.....	16
Tabelle 3.4	Vortrennung des Aromastoffextraktes der Ernte 2000 g über Flash-Chromatographie.....	18
Tabelle 3.5	Reproduzierbarkeit dynamische Headspace- Technik bei der Analyse von Haselnussöl.....	22
Tabelle 3.6	Teilergebnisse der TCT- Olfaktometrie Ernte 2000.....	24
Tabelle 3.7	Teilergebnisse TCT-Olfaktometrie Ernte 1998 n.....	25
Tabelle 3.8	Teilergebnisse der TCT-Olfaktometrie der Ernte 2000 g.....	27
Tabelle 3.9	Geruchsschwellenwerte ausgewählter Aromastoffe nach Belitz et. al, 2001.....	38
Tabelle 3.10	Konzentrationen [mg/kg Öl] Geruchstoffe in Einzelnüssen Ernte 2000.....	41
Tabelle 3.11	Konzentrationen [mg/kg Öl] Geruchstoffe in Einzelnüssen Ernte 1998 n.....	41
Tabelle 3.12	Als Variablen eingesetzte Geruchsverbindungen der Diskriminanzanalyse.....	48
Tabelle 3.13	Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse.....	48
Tabelle 3.14	Kumulierte Flächenwerte und Faktoren NUSSARTIG, RANZIG und ANDERSARTIG.....	51
Tabelle 3.15	Konzentration [µg/kg Öl] Aromastoffe Ernte 2000.....	59
Tabelle 3.16	Konzentration [µg/kg Öl] Aromastoffe Ernte 1998 n.....	59
Tabelle 3.17	Konzentration [µg/kg Öl] Aromastoffe Durchschnittsproben.....	60
Tabelle 3.18	Kalibrierung der Hydroperoxide.....	66
Tabelle 3.19	Konzentrationen von Öl (HPOE)- und Linolsäurehydroperoxide (HPODE).....	67
Tabelle 3.20	Mittelwerte und Standardabweichungen der Migrationszeiten 13-S-HPOTE.....	71
Tabelle 3.21	Kapillarelektrophoretische Bestimmung von Hydroperoxy- und Hydroxyfettsäuren.....	72
Tabelle 5.1	Ergebnisse der AEVA der Ernte 2000 und Ernte 1998 n.....	78
Tabelle 5.2	Ergebnisse der AEVA der Ernte 2000 g und der Ernte 1998 n g.....	79
Tabelle 5.3	Ergebnisse der TCT- Olfaktometrie der Ernte 2000.....	81
Tabelle 5.4	Ergebnisse TCT-Olfaktometrie der Ernte 1998 n.....	82
Tabelle 5.5	Ergebnisse der TCT-Olfaktometrie der Ernte 2000 g.....	83
Tabelle 5.6	Zur Auswertung herangezogene Massen für die Quantifizierung (DTD/Fast-GC/TOF-MS)...	86
Tabelle 5.7	Zur Auswertung herangezogene Massen für die Quantifizierung (IVA).....	87
Tabelle 5.8	Bei der Auswertung berücksichtigte Korrekturfaktoren (K).....	88
Tabelle 6.1	Größenverteilung der unterschiedlichen Erntejahre nach IVV.....	98
Tabelle 6.2	Wassergehalt [%] der Proben nach IVV.....	99
Tabelle 6.3	Ölgehalt [%] der Proben nach IVV.....	99
Tabelle 6.4	Proteingehalt [%] der Proben nach IVV.....	99
Tabelle 6.5	Anteil der Linol- und Ölsäure an der Triglyceridzusammensetzung nach IVV.....	99
Tabelle 6.6	Induktionszeiten (Ranzimat) von extrahiertem Haselnussöl nach IVV.....	100
Tabelle 6.7	GC-Bestimmung der Fettsäuren nach Um-/Veresterung (FAME) nach IVV.....	100

# 1 Einführung

## Sensorische Qualitätsbewertung von Lebensmitteln

Die Qualitätsprüfung und Qualitätssicherung einer Handelsware stellt eine allgemeine Anforderung an jeden Gewerbe- bzw. Dienstleistungsbetrieb dar. Im Bereich der Lebensmittel produzierenden, verarbeitenden bzw. vertreibenden Industrien und Handelsbetriebe wird bei der Qualitätsprüfung neben chemischen Analysen ein besonderer Schwerpunkt auf sensorische Untersuchungen gelegt. Dies ergibt sich aus den begrenzten Möglichkeiten chemischer Analysen, den über die Sinneswahrnehmung des Menschen erfolgten Gesamteindruck vollständig abzubilden.

Die Bedeutung der Sensorik als wissenschaftliche Disziplin zur Beurteilung von Nahrungs- und Genussmitteln belegen Matthäus und Fiebig, 1999 an zahlreichen Anwendungsbeispielen. Sie erläutern Verfahren zur Auswahl der Prüfer, Anwendungsgebiete der zulässigen Prüfverfahren und -geräte, der erlaubten Hilfsmittel und die zu verwendenden Begriffe.

Auch wenn durch strenge Vorgaben und Definitionen bei der Durchführung von sensorischen Untersuchungen eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen gesucht wird, so bleibt eine nicht erfassbare Abhängigkeit der Bewertung von der Konstitution des Prüfers bestehen. Wie stark der Mensch als Messinstrument das Ergebnis beeinflusst, ist dabei abhängig vom Alter, der Erfahrung und dem Training des Prüfers. Ebenso nimmt die seelische und körperliche Verfassung wie der Gemütszustand, Hungergefühle oder Stress einen Einfluss auf das Ergebnis. Der Verzehr von Genussmitteln sowie Rauchen kann das Ergebnis beeinflussen, wenn er unmittelbar vor oder während der Prüfung erfolgt. Auch eine Adaption oder Ermüdung kann auf den Gesamteindruck bei der Sinneswahrnehmung einwirken [Matthäus und Fiebig, 1999].

Besonders deutlich treten die Schwierigkeiten der sensorischen Untersuchungen bei Lebensmitteln mit komplexer Aromazusammensetzung wie z.B. bei Wein oder Olivenöl hervor. Obwohl ausgebildete Panels unter Einhaltung strenger Richtlinien eine Qualitätsbewertung durchführen, weichen die Ergebnisse oftmals erheblich voneinander ab. Diese Abweichungen lassen Zweifel an der Sensorik als objektive Methode der Qualitätsprüfung aufkommen.

In einer kritischen Analyse der beschreibenden Sinnesprüfung verweist Lawless, 1999 auf die Schwierigkeiten bei der Identifizierung einzelner Attribute in komplexen Mischungen. Die Ursache von nicht erkannten Geruchseindrücken führt er teilweise auf spezifische Unterschiede in den Empfindlichkeiten der Sinneswahrnehmung, uneinheitliches oder fehlendes Vokabular sowie auf die durch ein limitiertes Auffassungsvermögen gegebene Begrenztheit der menschlichen Urteilskraft. Im Weiteren verweist Lawless, 1999 auf die eingeschränkte Fähigkeit des Menschen, Geruchsintensitäten korrekt abzuschätzen. Er zitiert Engen und Pfaffman, 1959 nach denen gute Intensitätsabschätzungen bei einer Skala von nur drei Einheiten erzielt werden, eine Erweiterung der Skaleneinteilung jedoch zu erheblichen Verschlechterungen der Intensitätsabschätzungen führt.

Zurückzuführen sind die Differenzen sensorischer Untersuchungsergebnisse auf den komplizierten Prozess der Sinneswahrnehmung. Leffingwell, 2002 erläutert die neueren Erkenntnisse auf dem Gebiet der Olfaktometrie in einem Übersichtsartikel. Er beschreibt das Prinzip der Wahrnehmung als Kombination aus Erkennen und Verarbeiten eines Geruchseindruckes, indem die Bindung der Aromastoffe an Geruchsrezeptoren Signale erzeugen, welche entlang der Nervenzellen an das Gehirn weitergeleitet wird. Dabei können einzelne Rezeptoren unterschiedliche Aromastoffe binden sowie umgekehrt unterschiedliche Rezeptoren die gleichen Aromastoffe. Die Bindung der Aromastoffe an die Rezeptoren erfolgt in Abhängigkeit von der Konzentration einem bestimmten Bindungsmuster.

Die multiplen Kombinationsmöglichkeiten eines Konglomerats von Aromastoffen führen bei der Bindung zu Codierungen, welche vom Gehirn als eine Art „sensorisches Alphabet“ gelesen werden. Die Interpretation der Signalübertragungen ist von den oben erläuterten konstitutionellen Voraussetzungen des Prüfers abhängig [Malnic et al., 1999]. Dies erklärt, warum trotz der begrenzten Anzahl von ca. 1000 Rezeptorgenen ein Vielfaches an Geruchsnoten erkannt wird [Zozulya et al., 2001; Glusman et al., 2000; Glusman et al., 2001]. Es erklärt ebenfalls, warum Aromastoffe wie das 4-Methoxy-2-methyl-2-butanthiol in Verdünnung nach Johannisbeere, in hohen Konzentrationen jedoch nach Katzenurin riecht.

Als Bestätigung dieser Theorie können z. B. die Ergebnisse von Laing und Wilcox, 1983 gelten. Sie haben die Änderung des Geruchseindruckes mit der Änderung der Konzentration von Aromastoffen in binären Mischungen untersucht. Dabei stellten sie fest, dass sich der Geruchseindruck einer Mischung aus (E)-2-Hexenal (süß, fruchtig, mandelartig, apfelartig) und (E)-2-Decenal (orangenartig, nach Karton, nach Farbe, ölig) proportional der Konzentrationsverhältnisse aus den Geruchseindrücken der Einzelverbindungen zusammensetzt. Bei einer Mischung, in der die Geruchsintensitäten der Einzelkomponenten ungefähr gleich groß

waren, entdeckten sie jedoch ein abweichendes Aromaprofil, welches sich nicht mehr mit den Attributen der Einzelverbindungen beschreiben ließ.

Diese durch den Menschen gegebenen, nicht messbaren Einflussfaktoren der Wahrnehmung führen zu einem allgemeinen Interesse an der Entwicklung analytischer Methoden zur Stützung und Objektivierung sensorischer Bewertungen von Lebensmitteln. Die hierfür notwendigen Kenntnisse über Zusammenhänge zwischen sensorischen und chemischen Qualitätsparametern werden vor allem durch Aromaanalysen gewonnen. Dabei kann sich die Aufgabenstellung von dem Erkennen einzelner sensorischer Abweichungen bis zur asymptotischen Annäherung an den sensorischen Gesamteindruck erstrecken.

### **Analytische Kriterien zur Qualitätsbewertung von Lebensmitteln**

Ein auf Day und Anderson, 1965 zurückzuführendes und von Ullrich und Grosch, 1987 weiterentwickeltes Verfahren der Aromaanalyse beruht auf dem Prinzip der relativen Bewertung des Beitrages aller Einzelkomponenten aus einem Aromaextrakt, der Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (AEVA). Die isolierten Aromakonzentrate werden schrittweise verdünnt, bis die gaschromatographisch aufgetrennten Aromastoffe nicht mehr olfaktorisch an einem Sniffing-Port wahrnehmbar sind (HRGC-O). Durch Koelutionen verursachte Überlagerungen von Geruchseindrücken werden über erneute Analysen auf Trennsäulen unterschiedlicher Polaritäten sowie durch eine Fraktionierung des Aromaextraktes mit einer sich erneut daran anschließenden olfaktorischen Untersuchung der Einzelfraktionen erkannt.

Die benötigten Verdünnungsvolumina werden durch den Aromastoff-Verdünnungsfaktor (FD-Faktor) ausgedrückt. Nach diesem Verfahren werden Komponenten mit hohen FD-Faktoren als wichtige Verbindungen mit einem hohen Beitrag zum Gesamtaroma eines Lebensmittels eingestuft, respektive leisten Komponenten mit niedrigen Faktoren einen geringen Beitrag. Die oben beschriebenen Zusammenhänge der olfaktorischen Wahrnehmung sowie Wechselwirkungen der Komponenten untereinander und Einflüsse der Lebensmittelmatrix bleiben bei dieser Methode unberücksichtigt. Eine anschließende quantitative Bestimmung der wichtigsten Geruchstoffe und die Analyse von Modellmischungen mit Weglassversuchen einzelner Aromastoffe berücksichtigt diese Effekte und leisten einen weiteren Beitrag zur Annäherung an das sensorisch wahrnehmbare Aromaprofil.

Der Vorteil der AEVA liegt in einem deutlich reduzierten Aufwand für die Identifizierung der zum sensorischen Gesamteindruck eines Lebensmittels beitragenden Aromakomponenten im Vergleich zu einer näherungsweise vollständigen Analyse des Aromaspektrums. Durch den Bezug auf die Verdünnungsstufen werden Unterschiede in der Wahrnehmungsempfindlichkeit der Prüfer ausgeglichen. Auch ist eine einheitliche Festlegung der Begriffsbestimmungen zwischen verschiedenen Prüfern nicht zwingend erforderlich. Der einzelne Prüfer muss aber die von ihm eingeführten Begriffsbezeichnungen konsequent anwenden und die übliche Praxis „guter“ sensorischer Untersuchungen einhalten.

Eine Erweiterung der AEVA, bei der der Trägergasstrom abgerochen und die Dauer des Geruchseindruckes ermittelt wird, führt zum Combined Hedonic Response Measurement (CHARM). Das Verfahren ist aufwendig und kann durch eine Kombination aus AEVA und dem von Ullrich und Grosch, 1987 beschriebenen Konzept des Aromawertes, welches die Geruchsschwellenwerte der Aromastoffe berücksichtigt, ersetzt werden. Der Aromawert  $A_i$  der Verbindung  $i$  wird über das Verhältnis der Konzentration  $c_i$  zum Geruchsschwellenwert  $a_i$  der Verbindung definiert:

$$A_i = c_i / a_i \quad (c_i = \text{Konzentration Verbindung } i; a_i = \text{Geruchsschwellenwert Verbindung } i)$$

Einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse der HRGC-O nimmt das Extraktionsverfahren zur Isolierung der Geruchstoffe ein. Mit den jeweiligen Verfahren der Ultraschall-, Mikrowellen-, Flüssig/Flüssig- und der überkritischen Flüssig- Extraktion (SFE) werden möglichst schonende und vollständige Extraktionen der Analyten sowie die Minimierung von Artefakten angestrebt [Ren, 2001; Elmore et al., 1997; Deibler et al., 1999; Bhattacharjee et al., 2003; Yamini et al., 2002; Hérent und Collin, 1998; Bernardo-Gil et al., 2002]. Die durch die große Bandbreite der Verbindungsklassen verursachten Schwierigkeiten einer Isolierung und Analyse der Aromastoffe werden von Belitz et al., 2001 sowie von Jackson und Linskens, 2001 beschrieben.

Bei der Interpretation der mittels HRGC-O erzielten Ergebnisse ist zu beachten, dass Matrixeffekte des Lebensmittels und die während des Verzehrs eintretenden Wechselwirkungen der Komponenten unberücksichtigt bleiben.

Werden Zusammenhänge zwischen sensorischen und chemischen Qualitätsparametern erkannt, lassen sich die als relevant identifizierten Aromastoffe in die Qualitäts- und Prozesskontrolle von Lebensmitteln einbinden. Als Voraussetzung gelten signifikante Änderungen der Konzentrationen bei Qualitätsabweichungen und ein sich durch Schnelligkeit, einfache Handhabung, Robustheit und ausreichende Empfindlichkeit auszeichnendes Nachweisverfahren. Weitere wichtige Aspekte

wie der Personalaufwand und die erforderlichen Analysenkosten müssen im Verhältnis zum Nutzen den wirtschaftlichen Anforderungen genügen.

In einem Review stellen Wilkes et al., 2000 das breite Spektrum der Aromaanalyse dar. Neben einem methodischen Vergleich erläutern sie Anwendungsbeispiele und zeigen aktuelle Trends in der Probenvorbereitung auf. Mit dem Schwerpunkt auf besonders schnelle und preiswerte Analysen führen Pillonel et al., 2002 in einem Übersichtsartikel die verschiedenen Techniken der Headspace und der Solid Phase Micro Extraction (SPME) zur Bestimmung flüchtiger Bestandteile in Lebensmitteln auf.

### **Qualitätsbewertung von Haselnusskernen**

Haselnusskerne als wirtschaftlich bedeutsame Verarbeitungsprodukte für die Süßwarenindustrie sind wie viele pflanzliche Rohstoffe ein Saisonprodukt, das nur einmal im Jahr nach der Ernte frisch zur Verfügung steht.

Verarbeiter von Haselnusskernen beklagen häufig, dass offensichtlich in den Erzeugerländern unterschiedliche Erntejahrgänge oder Qualitätsstufen von Nüssen miteinander vermischt werden. Diese Vorgehensweise kann zum einen zu inhomogenen Röstergebnissen und zum anderen zum Verderb ganzer Produktchargen führen. Durch große Überproduktion, Ernteüberschüsse und zum Teil ungünstige Preispolitik der Anbauländer ist der Verarbeiter von rohen Haselnusskernen mit dem Problem konfrontiert, ob er wirklich aktuelle Ernte kauft oder eine Verschneidung neuer Ernte mit alter Ernte.

Obwohl Zusammenhänge zwischen der sensorischen Qualität und der Aromastoffzusammensetzung von Haselnusskernen in der Literatur beschrieben wurden, konnte bisher kein routinetaugliches Verfahren entwickelt werden, welches die direkte Untersuchung von Aromastoffen zur Qualitätsbewertung von Haselnusskernen erlaubt.

Erstmals identifizierten Barthel et al., 1974 das Hexanal und das Octanal als geruchsaktivste Komponenten roher, ranziger Haselnusskerne. Jauch, 1989 und Güntert et al., 1991 erkannten das Filberton als Schlüsselverbindung der rohen Haselnuss. Eine systematische Untersuchung der quantitativen Zusammensetzung des Aromaspektrums von Haselnüssen wurde von Silberzahn, 1988 durchgeführt. Kinderlerer und Johnson, 1992 sowie Ziegleder und Rieblinger, 1999 beschrieben einen Konzentrationsanstieg der homologen Reihe der Alkanale Hexanal bis



Nonanal, der Alkenale 2-Heptenal bis 2-Undecenal und der Alkansäuren Hexansäure bis Nonansäure in gelagerten Haselnusskernen. Als Sekundärprodukte der Lipidperoxidation in Haselnüssen identifizierte Sandmeier, 1996 primäre Alkohole wie das Octanol. Qualitative Untersuchungen der flüchtigen Verbindungen gerösteter Haselnusskerne wurden von Kinlin et al., 1972 und von Sheldon et al., 1972 durchgeführt. Matsui et al., 1998 bewertete die Aromarelevanz der flüchtigen Verbindungen von Haselnussölen, hergestellt aus gerösteten Haselnusskernen.

In der Literatur wurde die Verbindung Hexanal als Indikatorgeruchstoff für eine Qualitätsminderung bei Haferextrudaten [Guth und Grosch, 1994] und bei der Autoxidation von Linolsäuremethylestern [Ullrich und Grosch, 1987] beschrieben. Untersuchungen zur Hexanalzunahme bei einer Lagerung von Haselnüssen [Rieblinger, 1999; Ziegleder und Rieblinger, 1999; Schäfer, 2002] zeigten dagegen keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen frischen und gelagerten Produkten.

Radtke und Heiß [Radtke, 1965; Radtke und Heiß, 1971] analysierten den Wassergehalt, die Peroxidzahl (POZ) sowie die Säurezahl (SZ) von Haselnüssen und korrelierten ihre Analysendaten mit der sensorischen Qualität und der Lagerstabilität der untersuchten Proben. Sie wiesen einen leichten Anstieg der SZ bei einer Lagerung der Ware (1 1/2 Jahre) nach, Unterschiede im Wassergehalt und in der POZ wurden von ihnen nicht festgestellt.

Weitere umfangreiche Arbeiten zur Qualitätsbewertung von Haselnusskernen wurden von Züricher und Hadorn [Züricher und Hadorn, 1975; Hadorn et al., 1977; Hadorn et al., 1978] durchgeführt. Sie untersuchten Parameter wie Wassergehalt, freie Fettsäuren, Fettsäureverteilung, Induktionszeit des oxidativen Fettverderbs, Enzymaktivitäten von Peroxidase, Lipoxidase, Phenoxidase, und Esterase sowie eine Vielzahl weiterer Parameter. Die größten Unterschiede zwischen normal aromatischen und stark bitteren, muffig ungenießbaren Haselnusskernen wiesen sie in den Gehalten der freien Fettsäuren und bei der Verkürzung der Induktionszeit nach. Für die sensorisch abweichenden Haselnusskerne stieg der Gehalt der freien Fettsäuren um den Faktor 100 und die Induktionszeit verkürzte sich um den Faktor 7.

Sturm, 1979 setzte die von Kleinert, 1959 beschriebene Eisen(III)-thiocyanat-Reaktion zur Identifizierung einer Ranzigkeit bei Haselnusskernen ein. Auf einer Farbskala von 1-10 Einheiten (schwach rosa bis stark rosa) betrug die Differenz zwischen einwandfreien und deutlich ranzigen Einzelnusskernen durchschnittlich 5,3 Einheiten.

Rieblinger und Ziegleder, 1995 untersuchten die Sauerstoffzehrung, die Triglycerid-Zusammensetzung und den Gesamttocopherolgehalt zur Ermittlung einer Qualitätsminderung bei

Haselnüssen. Hierbei stellten sie insbesondere Belastungen des Öles in der Oberflächenschicht von Haselnusskernen fest. Sie wiesen eine größere Sauerstoffzehrung, einen höheren Gehalt linolsäurehaltiger Triglyderide und niedrigere Gehalte an Tocopherolen in dem Oberflächenöl im Vergleich zum Gesamtöl nach.

Von Rieblinger und Guth, 2002 wurde eine im Vergleich zu frischen Haselnusskernen doppelt so hohe Alkoholdehydrogenase-Aktivität (AHD) bei kühl gelagerten Haselnusskernen (2 Jahre) festgestellt. Bei einer bei Raumtemperatur gelagerten Ware wies die AHD 1/10 der Aktivität einer frischen Ernte auf. Die Aktivitäten der Peroxidase, Lipoxidase, Phenolase und Lipase wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen frischer und gelagerter Ware auf.

Schäfer, 2002 [Schäfer, 2002; Schäfer et. al., 2002] entwickelte eine Schnellmethode zur Abschätzung der Haselnussqualität, welche auf einem Vitalitätstest von Einzelnussanalysen beruht. Er zeigte, dass intakte Enzyme frischer Haselnusskerne das 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) zu 1,3,5-Triphenylformazan reduzieren. Die gehälfteten Haselnusskerne wurden in ein TTC- Methylcellulose-Gel gedrückt und bei 35 °C für 6 Std. inkubiert. Als Qualitätskriterium wurde der gefärbte Anteil der Haselnusskerne herangezogen und in einer Vitalitätskennzahl (VKZ) ausgedrückt. Mit einer VKZ von 80-90 und 1-5 % Anteilen ungefärbter Haselnusskerne für frische Haselnusskerne sowie einer VKZ von 45-60 mit 30-40% ungefärbten Haselnusskernen für einjährig gelagerte, nicht klimatisierte Haselnusskerne wies Schäfer Verschneidungen der frischen Haselnusskerne mit 5-10 % der gelagerten Ware nach (VKZ = 88, für 5 % und VKZ = 84 für 10% Verschneidung mit Anteilen von bis zu 9 % ungefärbter Haselnusskerne). Zu Berücksichtigen ist eine monatliche Abnahme der VKZ für Haselnusskerne um ca. 3-4 Einheiten ab dem Zeitpunkt der Ernte, welche den Nachweis auf den Erntezeitpunkt beschränkt.

Zur Identifizierung mikrobiologisch verdorbener Haselnusskerne quantifizierte Schäfer et. al., 2003 den Glycerin-Gehalt in Haselnusskernen. Nach dem Homogenisieren von Haselnüssen mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (7/3; v/v) wies er gaschromatographisch und enzymatisch für einwandfreie Haselnusskerne einen Gehalt von 10 mg/100 g nach, während er bei verfallener Ware Gehalte bis ca. 1.300 mg/100 g quantifizierte.

Obschon z. B. eine Verkürzung der Induktionszeit, die Zunahme der freien Fettsäuren, die Farbvertiefung der Eisen(III)-thiocyanat-Reaktion oder die Zunahme von UV-aktiven Dienen mit einer Reduzierung der sensorischen Qualitäten einhergehen, können mit den beschriebenen Methoden geringfügige Abweichungen bzw. ein niedriger Prozentsatz minderer Qualitäten in Nusshomogenisaten frischer Haselnussernten nicht nachgewiesen werden.

## 2 Ziele der Arbeit

Das primäre Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines analytischen Verfahrens zur Qualitätsbeurteilung von Haselnusskernen. Geeignete Kontrollmethoden sind nötig, welche die Beurteilungskraft der Lagerfähigkeit roher oder gerösteter Ölsamenkerne verbessert und wirtschaftliche Einbußen infolge Ranzigkeit vorbeugen.

Insbesondere die Routinetauglichkeit und eine hohe Nachweisempfindlichkeit wurden dabei als Zielsetzung verfolgt. Gleichzeitig soll das Verfahren als Kontrollverfahren zur Bewertung der sensorischen Untersuchungsergebnisse eingesetzt werden.

Dazu sollen die aromarelevanten Geruchstoffe von rohen und gerösteten Haselnüssen mittels AEVA identifiziert werden. Eine vergleichende AEVA von frischen und gelagerten Haselnüssen soll dann Verbindungen aufzeigen, die als Indikatorgeruchstoffe für eine Qualitätsbewertung von Haselnüssen geeignet sind. Eine Auswahl der Verbindungen soll anschließend mittels Isotopenverdünnungsanalyse quantifiziert werden.

Weiterhin soll eine neue Methode zur direkten analytischen Bestimmung von Geruchstoffen in Ölen und ölhaltigen Lebensmitteln entwickelt werden. Hierzu sollen die Geruchstoffe mittels direkter thermischer Desorption aus den isolierten Haselnussölen extrahiert und anschließend mittels Fast-GC/TOF- Analyse untersucht werden.

Die erhaltenen Daten sollen mittels statistischer Methoden analysiert und mit den sensorischen Untersuchungen bzw. dem Alter der Haselnüsse korreliert werden.

Als sekundäres Ziel wurde die Übertragbarkeit des analytischen Nachweisverfahrens auf andere fettreiche Lebensmittel, wie z. B. zur Qualitätskontrolle von Speiseölen, verfolgt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Charakterisierung des eingesetzten Untersuchungsmaterials

Das Hauptanbaugebiet für Haselnusskerne ist die Türkei. Als weltgrößter Haselnussproduzent besitzt sie einen Anteil von ca. 73 % der Gesamtproduktionsmenge. Nach Angaben der deutschen Süßwarenindustrie und der Importeure bezieht Deutschland jährlich ca. 80.000 Tonnen Haselnusskerne und ist somit größter Importeur weltweit.

Der Fettgehalt und die Fettsäurezusammensetzung von Haselnusskernen wurde von Züricher und Hadorn, 1975, Fincke, 1981, Parcerisa et al., 1997, Rieblinger und Guth, 2002 (siehe Anhang Ergebnisse IVV) sowie von Alasalvar et al., 2003 bestimmt. Der Ölgehalt der Haselnüsse beträgt ~ 60-70 % und ist reich an ungesättigten Fettsäuren (Fettsäurezusammensetzung: ~ 80-90 % Ölsäure, ~ 10-15 % Linolsäure).

Neben der Fettsäurezusammensetzung ermittelten Parcerisa et al., 1998 und Alasalvar et al., 2003 den Tocopherol- und Sterin-Gehalt von Haselnusskernen. Der größte Anteil der Tocopherole entfällt auf das  $\alpha$ -Tocopherol mit 370 mg/kg Öl; die Hauptverbindung der Sterine bildet mit durchschnittlich 1,1 g/kg Öl das  $\beta$ -Sitosterin.

Özdemir und Devres, 1999 sowie Rieblinger und Guth, 2002 untersuchten physikalische Eigenschaften, den Wasser-, Fett-, Kohlenhydrat- und Mineralstoffgehalt sowie die Fettsäure-, Aminosäure- und Sterinzusammensetzung von Haselnusskernen türkischer Anbaugelände. Untersuchungen zur Enzymaktivität der Peroxidase, Lipoxidase, Phenoloxidase, Alkoholdehydrogenase und Esterase in Haselnusskernen wurden von Bonvehí und Rosúa, 1996 und von Rieblinger und Guth, 2002 (siehe Anhang Ergebnisse IVV) beschrieben.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Haselnüsse stammten alle aus demselben Haselnussgarten in der Türkei aus der Nähe von Karapüreçek (Abb. 3.1). Es handelte sich um ca. 600 – 640 Bäume vom Typ Karafindik.

Abbildung 3.1 Geographische Karte der Türkei, Standort des Haselnussgartens



Quelle: [www.onlineholidays.de/pages/karte/map\\_turkei.html](http://www.onlineholidays.de/pages/karte/map_turkei.html)

Die Haselnusskerne wurden zum einen Teil frisch nach der Ernte im Jahr 1998 in der Türkei geschlagen (von der Steinschale befreit) und unter kontrollierten Bedingungen bei 10°C eingelagert. Der andere Teil der Ernte wurde ungeschlagen und nach üblicher Industriepraxis eingelagert. Diese Praxis umfasst eine Lagerung, bei der die Temperatur und die Feuchtigkeit nicht reguliert werden, sondern von den klimatischen Bedingungen des Gebietes abhängen.

Im Erntejahr 1999 wurde die Prozedur der Einlagerung wiederholt.

Im Jahr 2000 wurde die frisch geerntete und geschlagene Ware zusammen mit der in der Türkei eingelagerten Ware durch die Firma Storck, Halle und Firma Ritter, Waldenbuch nach Deutschland befördert. Die Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die zur Verfügung gestellten Proben.

Von den einzelnen Proben wurde jeweils ein Anteil der Haselnusskerne durch die Firma Barth, Freiberg/Neckar geröstet. Eine Kalibrierung der rohen und gerösteten Proben führte das Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV), Freising durch. Die Sortierung erfolgte in handelsübliche Fraktionen mit <11 mm, 11-13 mm und >13 mm Durchmesser. Der Anteil der jeweiligen Fraktion an der Gesamtprobe einer Ernte gleicher Lagerbedingungen ist in

Diagramm 6.1 und Tabelle 6.1 (siehe Anhang Ergebnisse IVV) dargestellt. Anschließend wurden alle Proben eingefroren und bis zur Durchführung der jeweiligen Analyse bei -18 °C tiefgekühlt.

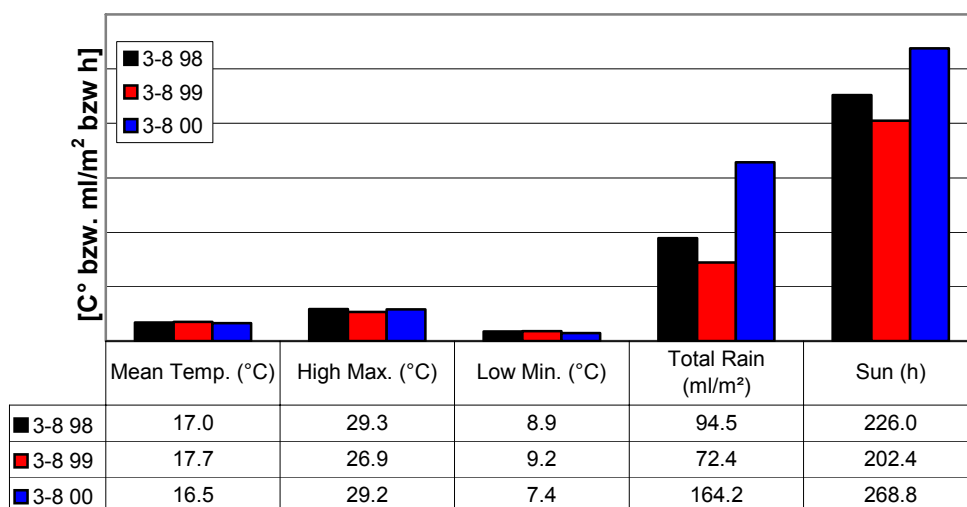
**Tabelle 3.1 Übersicht der Probenmenge und Lagerbedingungen**

Erntejahr	Menge [kg]	Lagerbedingung
1998	480	„Normallagerung“
	480	„Kühllagerung“
1999	480	„Normallagerung“
	480	„Kühllagerung“
2000	240	-

Im Folgenden wird die Bezeichnung **k** „Kühllagerung“ für Haselnusskerne der bei 10 °C gelagerten Ernten sowie **n** „Normallagerung“ für die gelagerten Ernten ohne Klimakontrolle verwendet. Für geröstete Haselnusskerne wird zusätzlich ein **g** eingeführt.

Für die Jahre 1998 bis 2000 wurden per Internet verfügbare Daten zum Anbaugebiet der untersuchten Haselnusskerne in der Türkei (Wetterstation Zonguldak) abgerufen. Aus der Vielzahl der Informationen wurden die Durchschnittstemperatur, Maximal- / Minimaltemperatur, die mittlere Niederschlagsmenge und die Sonnenscheinstunden miteinander im Vegetationszeitraum März bis August (3-8) der unterschiedlichen Ernteperioden verglichen (Diagramm 3.1).

**Diagramm 3.1 Gemittelte Wetterdaten der Vegetationsperioden von Haselnüssen (März bis August) für drei Erntejahre (Türkei Zonguldak)**



(Quelle: <http://www.weatheronline.co.uk/Turkey/Zonguldak.htm>)

Ein Vergleich der Erntejahre 1998 bis 2000 zeigt für das Jahr 1999 mit erhöhten Durchschnittstemperaturen von 17,7°C und gemäßigten Extremwerten (High Max. und Low Max.) die besten Wachstumsbedingungen. Des Weiteren fielen im Jahr 1999 die geringsten Niederschlagsmengen bei der niedrigsten Zahl an Sonnenscheinstunden. Bekanntermaßen tragen die klimatischen Wachstumsbedingungen und der Reifegrad zum Zeitpunkt der Ernte von pflanzlichen Rohstoffen entscheidend zur Qualität der Ware bei, so dass für das Erntejahr 1999 die beste Qualität der Haselnusskerne erwartet wurde. Die Erfahrungen der Haselnusskerne verarbeitenden Industrie bestätigten, dass die Nüsse aus dem Erntejahr 1999 deutlich stabiler in der Haltbarkeit waren als die der anderen Erntejahre. Für die Ernte 2000 wurde eine befriedigende Qualität mit hohem Schimmelbefall und für die Ernte 1998 eine mäßige Qualität festgestellt.

## **3.2 Identifizierung relevanter Aromastoffe in frischen und gelagerten Haselnusskernen**

Zunächst wurden sensorische Untersuchungen durchgeführt, um die wichtigsten Geruchsstoffe von rohen und gerösteten Haselnusskernen zu identifizieren [Grosch et al., 1992]. Mit der Zielsetzung die Unterschiede zwischen frischer und gelagerter Ernten aufzudecken, wurden die Ernten 2000 (roh/geröstet) und die unter nicht klimatisierten Bedingungen gelagerten Ernten 1998 n (roh/geröstet) untersucht. Bei diesen beiden Erntejahren waren die größten Qualitätsunterschiede zu erwarten.

Als Untersuchungsmethoden kamen die Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) und eine Kombination aus Gaschromatographie- Olfaktometrie mit einem Thermal-Desorption-Cold-Trap Injektor (TCT-HRGC-O) zum Einsatz.

### **3.2.1 AEVA**

Zur Gewinnung des Aromaextraktes wurden die Haselnusskerne vermahlen und mit einem Gemisch aus Diethylether/Pentan extrahiert. Der gewonnene Extrakt wurde einer Hochvakuumdestillation unterworfen, wodurch das Lösungsmittel und die darin gelösten Aromastoffe von der Fettmatrix abgetrennt wurden. Nach der Destillation an einer Vigreux-Kolonnen und Mikrodestillation wurden die einkonzentrierten Aromaextrakte mittels Gaschromatographie- Olfaktometrie sensorisch untersucht. Die Bewertung der Aromarelevanz der am Sniffing-Port wahrgenommenen Verbindungen erfolgte über die FD-Faktoren, die aus den entsprechenden Verdünnungsstufen der Originalextrakte erhalten wurden.

#### **3.2.1.1 Ergebnisse der AEVA**

Eine vergleichende Untersuchung von gelagerten und frischen Haselnusskernen zeigte geringfügige Unterschiede im Aromaspektrum, die bedingt sein können durch eine bei der Lagerung auftretende Peroxidation der Triglyceride und daraus hervorgehender flüchtiger, sensorisch aktiver Sekundärprodukte [Guth und Grosch, 1989].

In den gerösteten Haselnusskernen wurden neben den Sekundärprodukten der Lipidperoxidation Reaktionsprodukte der Maillard-Reaktion wahrgenommen.



### 3.2.1.2 AEVA roher Haselnusskerne

Die Untersuchungen wurden mit zwei rohen Haselnussproben der Erntejahre 1998 n und 2000 begonnen. Beim Abriechnen der beiden Proben am Sniffing-Port wurden insgesamt 26 aromaaktive Verbindungen mit Verdünnungsfaktoren (FD-Faktoren) von 1 und höher wahrgenommen. Die Identifizierung erfolgte über den Vergleich der chromatographischen (RI-Werte an zwei Kapillarphasen unterschiedlicher Polarität), massenspektroskopischen- und sensorischen Eigenschaften mit denen ihrer Referenzverbindungen. Ein Auszug aus den Ergebnissen ist in Tabelle 3.2, die vollständige Liste ist in Tabelle 5.1 (Kapitel 5.1.1) dargestellt.

**Tabelle 3.2 Teilergebnisse der AEVA der flüchtigen Verbindungen der Ernte 2000 und der Ernte 1998 n**

Verbindung <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	FD-Faktor Ernte 2000	FD-Faktor Ernte 1998 n
2,5-Dimethyl-3-methoxypyrazin	nussartig, röstig	1000	1000
1-Octen-3-on	metallisch, pilzartig	300	300
2-Acetyl-1-pyrrolin	röstig	300	300
Octanal	seifig	300	300
Methional	kartoffelartig	100	300
2-Isobutyl-3-methoxypyrazin <sup>c)</sup>	erdig	100	50
2-Methylpropionsäure	schweißartig	100	50
(E,E)-2,4-Nonadienal	frittiertes Fett	100	300
2-/3-Methylbuttersäure	schweißartig	50	100
Buttersäure	schweißartig	50	100
Hexanal	grün	20	50
$\alpha$ -Pinen	terpenartig	50	10
2-Phenylethanol	blumig, süß	10	1
(E,Z)-2,4-Decadienal	fettig	1	10
(E,Z)-2,4-Nonadienal	fettig	1	10

- a) Die Verbindungen wurden identifiziert durch Vergleich mit der Referenzsubstanz auf der Basis folgender Kriterien: RI-Wert auf 2 Kapillarsäulen (DB-FFAP und DB-5, siehe Tab. 5.1, Kapitel 5.1.1), Massenspektren (EI) und Geruchsqualität am Sniffing-Port.
- b) Geruchsbeschreibung während der HRGC-O
- c) Die MS-Signale waren für eine Interpretation zu schwach, die Identifizierung erfolgte auf der Basis der in a) angegebenen Kriterien.

In den Proben dominierten nussartige, röstige, seifige, metallische, pilzartige, kartoffelartige, erdige, fettige und schweißartige Geruchsnoten. Die potentesten Aromastoffe in beiden Proben, d.h. diejenigen, die in den höchsten Verdünnungsstufen noch wahrnehmbar sind, waren

2,5-Dimethyl-3-methoxypyrazin (nussartig), 1-Octen-3-on (pilzartig), 2-Acetyl-1-pyrrolin (röstig), Octanal (seifig), Methional (kartoffelartig) und (E,E)-2,4-Nonadienal (frittiertes Fett). Daneben sind Filberton (nussartig, fruchtig) und (E)-2-Nonenal (fettig) aufgrund hoher FD-Faktoren weitere wichtige Geruchsstoffe in den untersuchten Proben.

Ein Vergleich der FD-Faktoren der Ernte 1998 n mit denen der Ernte 2000 zeigt, dass bei den Verbindungen, welche das Gesamtaroma am stärksten prägen, keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden. Die größten Unterschiede wurden für die Verbindungen mit niedrigen FD-Faktoren (Faktoren 5-10) festgestellt. Für die Haselnusskerne der Ernte 1998 n wurden im Vergleich zur Ernte 2000 für die Komponenten Hexanal, (E,E)-2,4-Decadienal, (E,E)-2,4-Nonadienal, (E)-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal, 2-/3-Methylbuttersäure und Buttersäure höhere FD-Faktoren gefunden.

### **3.2.1.3 AEVA gerösteter Haselnusskerne**

Beim Abriechen der beiden gerösteten Proben konnten in der Ernte 2000 g und in der Ernte 1998 n g insgesamt 28 aromaaktive Verbindungen mit Verdünnungsfaktoren (FD-Faktoren) von 1 und höher am Sniffing-Port wahrgenommen werden. Ein Auszug aus den Ergebnissen ist in Tabelle 3.3, die vollständige Liste ist in Tabelle 5.2 (Kapitel 5.1.1) dargestellt.

In den Proben dominierten nussartige, fruchtige, malzartige, seifige, röstige, fruchtige, kartoffelartige und grüne Geruchsnoten. Aufgrund ihrer chromatographischen (RI-Werte an zwei Kapillarphasen unterschiedlicher Polarität) und sensorischen Eigenschaften wurden mit Ausnahme einer Komponente (RI = 1020 an einer DB-5 Kapillaren) 27 Verbindungen identifiziert.

Die potentesten Aromastoffe in beiden Proben, d.h. diejenigen, die in den höchsten Verdünnungsstufen noch wahrnehmbar sind, waren 3-Methylbutanal (malzartig), 3-Methyl-4-heptanon (fruchtig, nussartig), Filberton (nussartig, fruchtig) und Octanal (seifig, citrusartig). Daneben sind Methional (kartoffelartig), 2-Furfurylthiol (röstig), Hexanal (grün), Nonanal (seifig),  $\alpha$ -Pinen (terpenartig), 2,5-Dimethyl-3-methoxypyrazin (röstig) und (E,E)-2,4-Decadienal (frittiertes Fett) aufgrund hoher FD-Faktoren weitere wichtige Geruchsstoffe in den untersuchten Proben. Mit Ausnahme des 2-Furfurylthiols und 3-Methylbutanals wurden diese Verbindungen bereits in den rohen Haselnusskernen nachgewiesen.

Bei einem Vergleich der FD-Faktoren der Proben Ernte 1998 n g und Ernte 2000 g wird deutlich, dass die Verbindungen  $\gamma$ -Terpinen, Hexanal, 2-Furfurylthiol, 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin, (E,Z)-2,4-Nonadienal, (E,E)-2,4-Nonadienal, (E)-2-Nonenal, (E)-2-Decenal,  $\Delta$ -3-Caren, 2-/3-Methylbuttersäure und Buttersäure in der gelagerten Ernte 1998 n g mit höheren FD-Faktoren wahrgenommen wurden. Einige dieser Verbindungen wurden bereits in den rohen Haselnusskernen als mögliche Indikatorsubstanzen für einen peroxidativen Fettverderb bei Haselnusskernen erkannt (vgl. Kapitel 3.2.1.2).

**Tabelle 3.3** Teilergebnisse der AEVA der flüchtigen Verbindungen der Ernte 2000 g und der Ernte 1998 n g

Verbindung <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	Ernte 2000 g FD-Faktor	Ernte 1998 n g FD-Faktor
3-Methylbutanal	malzartig	1000	1000
3-Methyl-4-heptanon	fruchtig, nussartig	1000	1000
Filberton	haselnussartig, fruchtig	1000	1000
Octanal	seifig, citrusartig	1000	1000
Methional	kartoffelartig	1000	100
2-Furfurylthiol	röstig	100	1000
Nonanal	seifig	100	100
Hexanal	grün	100	1000
$\alpha$ -Pinen	terpenartig	100	100
2,5-Dimethyl-3-methoxypyrazin <sup>c)</sup>	röstig	100	100
(E,E)-2,4-Decadienal	frittiertes Fett	100	100
Unbekannt	röstig	100	10
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	nussig	100	10
(E,Z)-2,4-Nonadienal	fettig	10	100
(E)-2-Decenal	fettig	10	100
$\Delta$ -3-Caren	terpenartig	10	100
$\gamma$ -Terpinen	terpenartig	1	100
(E,E)-2,4-Nonadienal	frittiertes Fett	10	100
(E)-2-Nonenal	fettig	1	10
2-/3-Methylbuttersäure	schweißartig	1	10
Buttersäure	schweißartig	1	10

- a) Die Verbindungen wurden identifiziert durch Vergleich mit der Referenzsubstanz auf der Basis folgender Kriterien: RI-Wert auf 2 Kapillarsäulen (DB-FFAP und DB-5, siehe Tab. 5.2, Kapitel 5.1.1), Massenspektren (EI) und Geruchsqualität am Sniffing-Port.
- b) Geruchsbeschreibung während der HRGC-O
- c) Die MS-Signale waren für eine Interpretation zu schwach, die Identifizierung erfolgte auf der Basis der in a) angegebenen Kriterien.

### **3.2.2 Identifizierung von Aromakomponenten mittels Flash-Chromatographie**

Die Untersuchung des Aromaprofils von Haselnusskernen mittels AEVA (Kapitel 3.2.1) führte bei Überlagerungen ähnlicher Geruchseindrücke insbesondere bei den gerösteten Haselnusskernen zu Schwierigkeiten bei der Identifizierung aromaaktiver Verbindungen. Aus diesem Grunde wurde der Aromaextrakt aus der Hochvakuum-Destillation gerösteter Haselnusskerne der Ernte 2000 g in eine saure, basische und neutrale Fraktion getrennt (vgl. Kapitel 5.1.3). Die einzelnen Fraktionen der Flash-Chromatographie wurden mittels HRGC-MS und HRGC-O auf zwei Kapillaren unterschiedlicher Polaritäten untersucht.

#### **3.2.2.1 Ergebnisse der Flash-Chromatographie**

In der sauren Fraktion des Ether-Trennungsgangs der Ernte 2000 g wurden als Hauptkomponenten die n-Homologen der organischen Säuren von der Essigsäure bis zur Octansäure nachgewiesen. Die 2-Ethylhexansäure wurde als verzweigte Säure erkannt.

Die Hauptbestandteile der basischen Fraktion waren das 1-Ethylamin, 1-Butylamin und 2-Butylamin sowie das Formamid.

Zur weiteren Auftrennung des Substanzgemisches der neutralen Fraktion wurde eine Flash-Chromatographie durchgeführt.

In der unpolaren Fraktion (Fraktion Nr. 1, Pentan/Ether; 97,5/2,5; v/v) wurden Alkane, Monoterpene und Furane nachgewiesen. Mit steigender Polarität des Eluenten (Fraktion Nr. 2, Pentan/Ether; 95/5; v/v; Fraktion Nr. 3 Pentan/Ether; 90/10; v/v;) wurden Ketone, Aldehyde, Alkene und Methyl-derivate des Benzols eluiert. Die Pyrazine eluierten in der Fraktion mit der höchsten Polarität (Fraktion Nr. 5 Pentan/Ether; 70/30; v/v). In der Tabelle 3.4 sind die über den Vergleich mit Retentionsindizes auf zwei Phasen und Massenspektren mit denen von Referenzverbindungen identifizierten flüchtigen Komponenten der einzelnen Fraktionen aufgeführt.

Die Untersuchungen mittels HRGC-O der auf 100 µl einkonzentrierten Fraktionen 1-5 bestätigen, dass mit der direkten Analyse des Aromaextraktes mögliche Koelutionen durch eine erneute Analyse auf einer zweiten Kapillare unterschiedlicher Polarität nahezu vollständig erkannt wurden.

**Tabelle 3.4 Vortrennung des Aromastoffextraktes der Ernte 2000 g über Flash-Chromatographie an Kieselgel**

Fraktion Nr.	Aromastoff
1 <sup>a)</sup>	2-Acetyl-5-methylfuran, $\Delta$ -3-Caren, $\Delta$ -4-Caren, Camphen, Decan, 2,5-Dimethylfuran, Limonen, Nonan, Octan, 2,3,4-Trimethylfuran, 2-Pentylfuran, $\alpha$ -Phellandren, $\alpha$ -Pinen, $\beta$ -Pinen, 1-Octen
2 <sup>b)</sup>	Benzaldehyd, Benzol, 2-Butanon, Butansäureethylester, Butansäuremethylester, (E)-2-Decenal 2-Ethyl-5-methylfuran, 2-Heptanon, 4-Heptanon, 2-(Z)-Heptenal, Hexanal, (Z)-2-Hexenal, 2-Hexanon, 3-Hexanon, 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal, 3-Methyl-2-butanon, 3-Methyl-4-heptanon, 5-Methyl-2-hepten-4-on, 6-Methyl-5-hepten-2-on, 3-Methyl-2-pentanon, Nonanal, (E)-2-Nonenal, Octanal, 1-Octen-3-on, 2,3-Pentandion, 2-Pentanon, Toluol, p-Xylol
3 <sup>c)</sup>	2-Butenal, Ethylacetat, Furfural, 2-Heptanol, 4-Heptanol, 3-Hexen-2-on, 2-Hexanol, 3-Methyl-2-butanol, 3-Methyl-4-heptanol, 1-Nonanol, 1-Octanol, 1-Octen-3-ol, 2-Pentanol, 3-Penten-2-on
4 <sup>d)</sup>	-
5 <sup>e)</sup>	2,5-Dimethyl-3-methoxypyrazin, 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin, 2-Ethyl-5-methylpyrazin, 2-Ethyl-6-methylpyrazin, Ethylpyrazin

Fließmittelzusammensetzung:

- a) Pentan/Ether; 97,5/2,5; v/v;
- b) Pentan/Ether; 95/5; v/v;
- c) Pentan/Ether; 90/10; v/v;
- d) Pentan/Ether; 80/20; v/v;
- e) Pentan/Ether; 70/30; v/v;

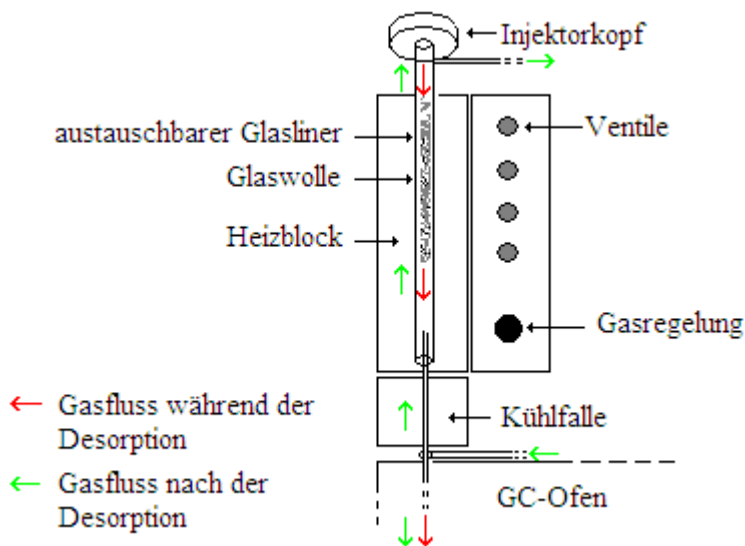
Insgesamt bestätigen die Untersuchungen der Einzelfraktionen mittels HRGC-O die in Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3 aufgeführten Komponenten als wichtige, das Gesamtaroma gerösteter Haselnusskerne prägende Aromastoffe.

### 3.2.3 Identifizierung von Geruchstoffen in Haselnussölen mittels thermischer Desorption und anschließender Kryofokussierung (TCT-HRGC-O)

Eine schonende Methode zur Anreicherung von Aromastoffen besteht in der Gasextraktion von Lebensmitteln. Bei fettreicher Matrix führt die Lipophilie der Aromastoffe jedoch im Allg. zu geringen Ausbeuten und damit zu Problemen der Empfindlichkeit. Gute Extraktionsausbeuten werden durch den Einsatz einer dynamischen Headspace-Desorption mit einem TCT-Injektor (Temperatur-kontrollierte-Thermodesorption) erreicht, bei der das zu analysierende Öl frisch gepresster Haselnusskerne direkt in den Liner der Injektoreinheit eingespritzt wird. Hierbei führen niedrige Desorptionstemperaturen zu Minimierungen einer Peroxidation und Pyrolyse. Die bei einer Headspace-Analyse auftretenden Verluste durch Adsorptionen an den Glaswandungen werden über den kurzen Transportweg der Zielanalyten verringert.

Zur Isolierung der Aromastoffe wird das Öl gepresster Haselnusskerne direkt in die Injektoreinheit des TCT- Systems injiziert. Die am Kapillaranfang fokussierten flüchtigen Komponenten werden chromatographisch getrennt und mittels Olfaktometrie untersucht. Eine während der Trennung auftretende Nachelution von Aromastoffen wird über eine Gas-Rückspülung der Desorptionseinheit vermieden. Nach jeder GC-Analyse wird der mit Öl beladene Glasliner ausgetauscht (vgl. Abb. 3.2).

**Abbildung 3.2 Aufbau und Funktionsweise des TCT-Injektors**



Die Ermittlung der FD-Faktoren erfolgt im Falle der direkten thermischen Desorption über eine schrittweise Reduktion der Öl-Injektionsvolumina. Aromastoffe, die in den kleinsten

Injektionsvolumina olfaktorisch noch wahrnehmbar sind, erhalten als potenteste Aromen die höchsten FD-Faktoren.

### 3.2.3.1 Methodenentwicklung

Die Extraktionsausbeute der dynamischen Headspace-Analyse wurde durch die Variation der Desorptionstemperatur, Desorptionszeit und der Injektionsvolumina optimiert. Eine Überprüfung der Vollständigkeit der Extraktion erfolgte durch die erneute Analyse eines bereits desorbierten Öles.

Um eine schonende Extraktion der Aromastoffe zu erreichen, wurde die Desorptionstemperatur möglichst niedrig gewählt. Bedingt durch die Wärmeübertragungen des Gaschromatographen auf die Injektoreinheit wurden reproduzierbare Ergebnisse bei einer Desorptionstemperatur ab 60 °C (60 min) erzielt.

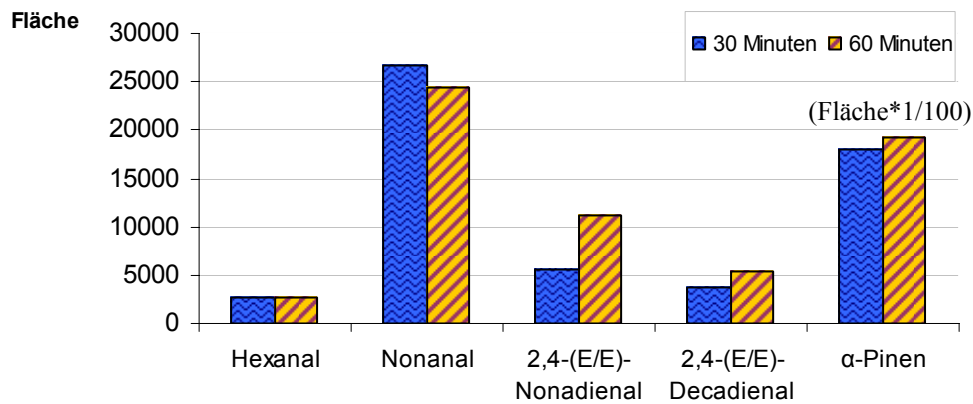
Mit der Desorption von 100 µl eines frisch gepressten Haselnussöles lagen die Konzentrationen der extrahierten Aromastoffe in einem zur Analyse geeigneten Konzentrationsbereich. Größere Injektionsvolumina führten zu einer Überladung der Säule mit dem Monoterpen  $\alpha$ -Pinen.

Eine maximale Extraktionsausbeute originärer Pflanzeninhaltsstoffe wurde mit einer Desorptionszeit von 60 min erreicht. Nach einer zweiten Desorption und Analyse des Öles wurden die Monoterpene nicht mehr nachgewiesen.

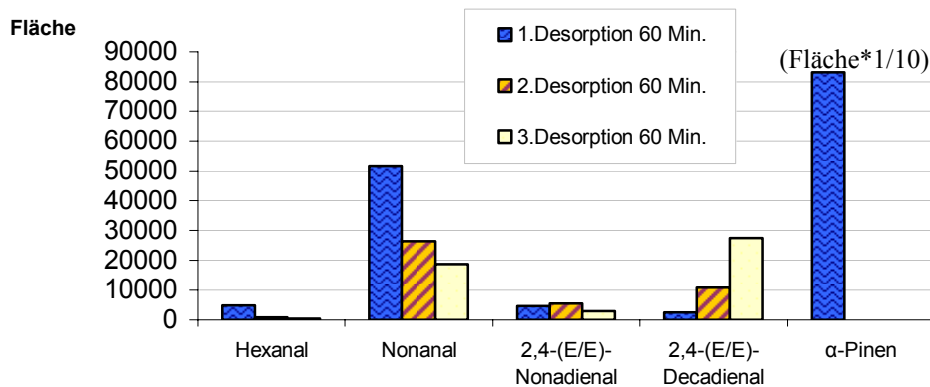
Der Einfluss der Desorptionstemperatur und der Desorptionszeit auf die Konzentration typischer Peroxidationsprodukte von Fettsäuren ist in Diagramm 3.2 dargestellt. Eine Verdoppelung der Desorptionszeit führte bei Hexanal und Nonanal zu annähernd gleichen Ausbeuten, die Flächenwerte von (E,E)-2,4-Nonadienal und (E,E)-2,4-Decadienal nahmen zu.

Während Verbindungen aus der Klasse der Monoterpene nach einer zweiten Desorptionsphase eines bereits desorbierten Öles nicht mehr nachgewiesen werden konnten, wurden Peroxidationsprodukte auch nach einer dreifachen Desorption des Öles von insgesamt 180 min detektiert (Diagramm 3.3). Hierbei nahm die Konzentration der Alkanale ab, während die des (E,E)-2,4-Nonadienals ein Maximum durchlief und die Konzentration des (E,E)-2,4-Decadienals über den Desorptionszeitraum zunahm. Möglicherweise werden (E,E)-2,4-Nonadienal, (E,E)-2,4-Decadienal, Hexanal und Nonanal aus bereits im Öl vorliegenden labilen Vorläufern (Linolsäurehydroperoxide) durch die thermische Belastung gebildet (vgl. Kapitel 3.2.4).

**Diagramm 3.2 Extraktionsausbeuten typischer Oxidationsprodukte und des  $\alpha$ -Pinen von 100  $\mu$ l frisch gepresstem Haselnussöl der Ernte 2000 bei 30 und 60 Minuten Desorption**



**Diagramm 3.3 Extraktionsausbeuten typischer Oxidationsprodukte nach aufeinander folgender, dreimaliger Extraktion von 100  $\mu$ l frisch gepresstem Haselnussöl der Ernte 2000**



Die Desorptionsphase wurde unter dem Aspekt einer vollständigen Extraktion originärer Aromastoffe und zur Minimierung peroxidativer Prozesse auf 60 min bei 60 °C festgelegt.



### 3.2.3.2 Ergebnisse der TCT-HRGC-O

Die Reproduzierbarkeit der Analyse wurde mit einer vierfachen Injektion von jeweils 100 µl eines homogenisierten Öles aus frisch gepressten Haselnusskernen überprüft (Tab.3.5). Während Aromakomponenten mit kurzen Retentionszeiten gute Peak-Symmetrien aufwiesen, führten die hohen Retentionszeiten der Komponenten (E,E)-2,4-Nonadienal und (E,E)-2,4-Decadienal zu Peakverbreiterungen und damit zu einer stärkeren Abweichung der Integrationsflächen. Die Genauigkeit der hier neu entwickelten TCT-HRGC-O Methode ist für die olfaktorische Untersuchung von Proben ausreichend, da die Bestimmung der FD-Faktoren mit einem Fehler von Faktor ca. 2-3 behaftet ist.

**Tabelle 3.5**                    **Reproduzierbarkeit der dynamischen Headspace- Technik bei der Analyse von Haselnussöl (60 Minuten Desorptionszeit, 4 Bestimmungen)**

<b>Verbindung</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
Hexanal	9,7
α-Pinen	10,6
3-Methyl-4-heptanon	11,7
Filberton	12,4
Nonanal	13,5
2,4-(E,E)-Nonadienal	28,4
2,4-(E,E)-Decadienal	38,2

Während bei der AEVA aufgrund der benötigten Probenmenge von ca. 400 g Probe/Analyse nur Durchschnittsproben untersucht werden können, lassen sich mit der TCT-HRGC-O Einzelnussanalysen durchführen. Die Einzelnussanalyse bietet die Möglichkeit einzelne Individuen einer Probencharge zu untersuchen und damit die Variationsbreite der Aromastoffzusammensetzung zu ermitteln. Darüber hinaus können Einzelnüsse halbiert werden und eine Hälfte für sensorische Untersuchungen und die andere Hälfte zur Analyse eingesetzt werden. Durch diese Vorgehensweise ist eine direkte Korrelation von sensorischen und analytischen Daten möglich. Der Einfluss einzelner Haselnusskerne auf die Gesamtaromaqualität der Durchschnittsprobe wird bei dieser Vorgehensweise nicht erfasst.

Für die Untersuchung mit der TCT-HRGC-O wurden sensorisch verkostete Haselnusshälften der Erntejahre 2000 und 1998 n sowie der Ernte 2000 g untersucht. Die Ermittlung der FD-Faktoren erfolgte mittels HRGC-O durch Injektion verschiedener Ölmengen.

### 3.2.3.2.1 TCT-HRGC-O roher Haselnusskerne

Das Öl von 10 Haselnusshälften der Ernte 2000 mit frischem, angenehm nussigen Geschmack sowie das von 10 Haselnusshälften der Ernte 1998 n mit seifigem und ranzigem Geschmack wurde jeweils vereinigt, homogenisiert und zur Analyse eingesetzt.

Beim Abriechen der Ernte 2000 konnten bei einer Injektion von 50 µl Öl 37 aromaaktive Komponenten wahrgenommen werden. Ein Auszug aus den Ergebnissen ist in Tabelle 3.6, die vollständige Liste ist in Tabelle 5.3 (Kapitel 5.1.2) dargestellt. Im Vergleich zur Ernte 1998 n wurden bei einer Injektion von 5 µl Öl 32 aromaaktive Komponenten wahrgenommen (Tab. 3.7 und Tab. 5.4). Die Analyse der Ernte 1998 n mit größeren Volumina führte zu Wahrnehmungsstörungen am Sniffing-Port aufgrund zu starker Überlagerungen einzelner Geruchseindrücke.

Über stoffspezifische Eigenschaften (RI-Werte an zwei Kapillarphasen unterschiedlicher Polarität, massenspektroskopischen- und sensorischen Eigenschaften) konnten insgesamt für die Ernte 2000 und Ernte 1998 n 35 Komponenten über den Vergleich ihrer Retentionsindizes und Massenspektren mit denen von Referenzverbindungen identifiziert werden (Tab. 5.3 und Tab. 5.4, Kapitel 5.1.2). Mittels der thermischen Desorption wurden leichter flüchtige Komponenten erfasst, die bei der AEVA vom Lösungsmittel überdeckt werden. So wurde neben unbekanntem Verbindungen das 2-Methylpropanal (malzig), das Propanal (fruchtig, stechend), das 1-Octen (grün), das 2-Butanon (ätherisch), das Aceton (lösungsmittelartig) und das Ethylacetat (Nagelack, lösungsmittelartig) mit FD-Faktoren >1 wahrgenommen, die aufgrund der Flüchtigkeit bei der AEVA nicht detektiert wurden.

Die Aromastoffe, die in der Ernte 2000 (Öl aus 10 Haselnusshälften, sensorisch kontrolliert) mit hohen FD-Faktoren von 50 wahrnehmbar sind, waren neben einer unbekanntem Verbindungen (RI-FFAP = 783) das 2-Butanon (ätherisch), das Camphen (campherartig), das 3-Methylbutanal (malzig), das 2-Pentanon (fruchtig, bananenartig), das β-Pinen (terpenartig, harzig) und das α-Phellandren (terpenartig, medizinisch). α-Pinen (terpenartig), 2-Methylbutanal (malzig) und 1-Octen (grün) wurden als wichtige Aromastoffe mit FD-Faktoren von 10 erkannt.

Tabelle 3.6

**Teilergebnisse der TCT- Olfaktometrie der flüchtigen Verbindungen in Haselnusskernen der Ernte 2000 (10 Einzelnusshälften)**

Verbindung <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	RI (DB-FFAP)	RI (DB-5)	FD-Faktor Ernte 2000
2-Butanon	ätherisch	870	-	50
Camphen	campherartig	1065	949	50
3-Methylbutanal	malzig	927	652	50
2-Pentanon	fruchtig, nach Banane	972	-	50
$\alpha$ -Phellandren	terpenartig, medizinisch	1209	1007	50
$\beta$ -Pinen	terpenartig, harzig	1102	985	50
Unbekannt	-	783	-	50
2-Methylbutanal	malzig	907	663	10
$\alpha$ -Pinen	terpenartig	1013	940	10
1-Octen	grün	830	768	10
Unbekannt	-	724	-	10

- a) Die Verbindungen wurden identifiziert durch Vergleich mit der Referenzsubstanz auf der Basis folgender Kriterien: RI-Wert auf 2 Kapillarsäulen (DB-FFAP und DB-5), Massenspektren (EI) und Geruchsqualität am Sniffing-Port.
- b) Geruchsbeschreibung während der HRGC-O

In der Ernte 1998 n (Öl aus 10 Haselnusshälften, sensorisch kontrolliert) wurden die Aromastoffe  $\Delta$ -3-Caren (terpenartig), 4-Heptanol (fruchtig), Limonen (ätherisch, nach Zitrone), Octanal (seifig, citrusartig) und 1-Octen-3-on (pilzartig, metallisch) mit hohen FD-Faktoren von 50 wahrgenommen (Tab. 3.7). Zwei nicht identifizierte Verbindungen (RI-FFAP = 1560 und 1589) wurden ebenfalls als wichtige Komponenten mit hohen FD-Faktoren erkannt.

Ein Vergleich der potentesten Geruchsstoffe der Ernte 2000 mit der Ernte 1998 n (Öl aus jeweils 10 Haselnusshälften, sensorisch kontrolliert) vermittelt einen Gesamteindruck über die Unterschiede zwischen den beiden Proben. So dominierten in der Ernte 2000 fruchtige, terpenartige, malzartige, ätherische, campherartige, harzige und medizinische Geruchseindrücke, während in der Ernte 1998 n neben den fruchtigen, terpenartigen, campherartigen und ätherischen Geruchseindrücken seifige, metallische, erdige, saure, grüne, pilzartige und bittermandelartige Aromastoffe dominierten.

Tabelle 3.7

**Teilergebnisse TCT-Olfaktometrie der flüchtigen Verbindungen in gelagerten Haselnusskernen der Ernte 1998 n (10 Einzelnusshälften)**

Verbindung <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	RI (DB-FFAP)	RI (DB-5)	FD-Faktor Ernte 1998 n
$\Delta$ -3-Caren	terpenartig	1141	1020	50
4-Heptanol	fruchtig	1310	-	50
Limonen	ätherisch, nach Zitrone	1193	1030	50
Octanal	seifig, citrusartig	1280	1004	50
1-Octen-3-on <sup>c)</sup>	pilzartig, metallisch	1300	980	50
Unbekannt	fruchtig	1560	-	50
Unbekannt	erdig, kellerartig	1589	-	50
Benzaldehyd	bittermandelartig	1496	963	10
2-Butanon	ätherisch	870	-	10
$\beta$ -Pinen	terpenartig, harzig	1102	985	10
Camphen	campherartig	1065	949	10
Decanal	seifig, blumig	1477	1207	10
Essigsäure	sauer, scharf	1450	-	10
Filberton	nussartig	1295	968	10
1-Octen	grün	830	-	10
2-Pentylfuran	butterartig, grüne Bohnen, Süßholz	1222	977	10
$\alpha$ -Phellandren	terpenig, medizinisch	1209	1007	10
Unbekannt	petroleumartig	1460	-	10

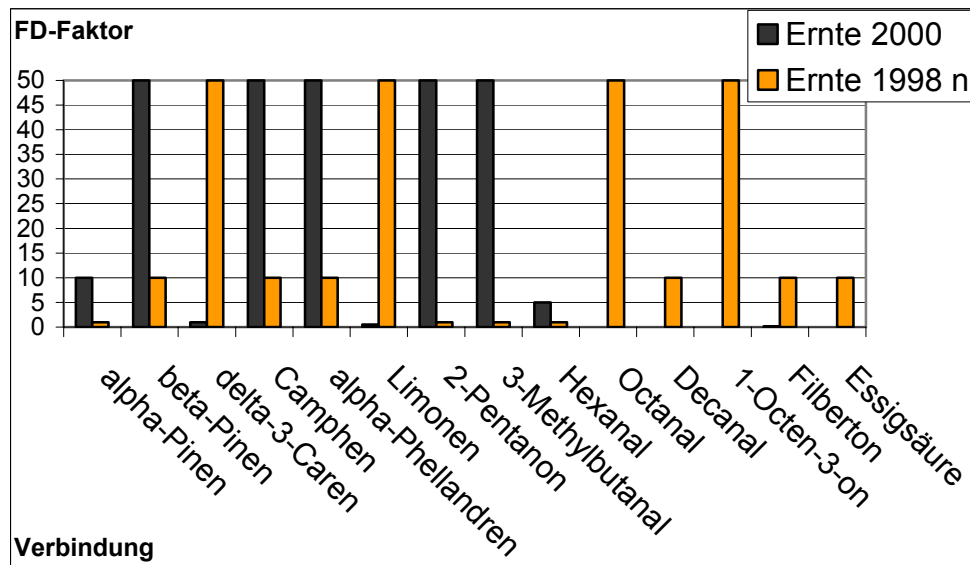
- a) Die Verbindungen wurden identifiziert durch Vergleich mit der Referenzsubstanz auf der Basis folgender Kriterien: RI-Wert auf 2 Kapillarsäulen (DB-FFAP und DB-5), Massenspektren (EI) und Geruchsqualität am Sniffing-Port.
- b) Geruchsbeschreibung während der HRGC-O
- c) Die MS-Signale waren für eine Interpretation zu schwach, die Identifizierung erfolgte auf der Basis der in a) angegebenen Kriterien.

Im Gegensatz zur Ernte 1998 n konnten die Oxidationsprodukte Nonanal (seifig), Decanal (seifig, blumig) und 1-Octen-3-on (pilzartig) in der Ernte 2000 geruchlich nicht wahrgenommen werden (Tab. 5.3 und Tab. 5.4). Ebenfalls nicht identifiziert wurden das 4-Heptanol (fruchtig), Essigsäure (sauer, scharf) und das 4-Heptanon (fruchtig, ananasartig). Wichtige Aromastoffe der Ernte 2000 wie das  $\beta$ -Pinen (terpenartig, harzig), Camphen (campherartig) und das  $\alpha$ -Phellandren (terpenartig, medizinisch) mit hohen FD-Faktoren (FD = 50) wurden in der Ernte 1998 n mit niedrigeren FD-Faktoren erkannt (FD = 10). In der Ernte 1998 n wurden die in der Ernte 2000 mit geringen FD-Faktoren wahrgenommenen Komponenten Myrcen (ätherisch, seifig),  $\alpha$ -Terpinen (terpenartig) und 2-Nonanon (blumig, fettig) nicht erkannt. Das Filberton (nussartig) wurde in der Ernte 2000

nicht wahrgenommen, während es in der gelagerten Ernte 1998 n in den mittleren Injektionsvolumina (FD = 10) auftrat.

In Diagramm 3.4 sind die FD-Faktoren für Verbindungen mit deutlichen Unterschieden zwischen der Ernte 2000 und Ernte 1998 n graphisch aufgetragen.

**Diagramm 3.4** FD-Faktoren ausgewählter Verbindungen der Ernte 2000 und Ernte 1998 n



### 3.2.3.2.2 TCT-HRGC-O gerösteter Haselnusskerne

Die hohe Aromastoffkonzentration gerösteter Haselnusskerne führte bei einer Injektion von 50 µl Öl aus 10 Haselnusshälften der Ernte 2000 g (sensorisch einwandfrei) zu überlagernden Geruchseindrücken am Sniffing-Port. Aus diesem Grund wurde nur die frische Ernte 2000 g mit einem Injektionsvolumen von 10 µl Öl zur Analyse eingesetzt.

Insgesamt wurden für die Ernte 2000 g mit der TCT-HRGC-O Methode 56 aromaaktive Komponenten bei einer Injektion von 10 µl Öl wahrgenommen. Ein Auszug aus den Ergebnissen ist in Tabelle 3.8, die vollständige Liste ist in Tabelle 5.5, Kapitel 5.1.2 dargestellt.

Über stoffspezifische Eigenschaften (RI-Werte an zwei Kapillarphasen unterschiedlicher Polarität, massenspektroskopischen- und sensorischen Eigenschaften) konnten insgesamt 44 Komponenten identifiziert werden.

Tabelle 3.8

**Teilergebnisse der TCT-Olfaktometrie der flüchtigen Verbindungen in  
Haselnusskernen der Ernte 2000 g (10 Einzelnusshälften)**

Verbindung <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	RI (DB-FFAP)	RI (DB-5)	FD-Faktor Ernte 2000 g
$\beta$ -Pinen	terpenartig, harzig	1102	985	100
3-Methylbutanal	malzig	927	652	100
Octanal	seifig, citrusartig	1268	1004	100
Pentanal	stechend, bittermandelartig	968	722	100
Propanal	fruchtig, stechend	796	450	100
Acetaldehyd	stechend, ätherisch,	647	-	50
2-Butanon	ätherisch	870	-	50
2,5-Dimethylpyrazin	nussartig	1390	906	50
Filberton	haselnussartig	1295	968	50
3-Methyl-4-heptanon	fruchtig, nussartig	1159	925	50
6-Methyl-5-hepten-2-on	grün, fettig, stechend	1332	985	50
Myrcen	krautig, metallisch	1172	989	50
2-Pentylfuran	butterartig, grüne Bohnen, Süßholz	1222	977	50
$\alpha$ -Phellandren	terpenig, medizinisch	1209	1007	50
2-Pentanon	fruchtig, nach Banane	972	-	50
$\alpha$ -Pinen	terpenartig	1013	950	50
Unbekannt	-	1150	-	50
$\Delta$ -3-Caren	terpenartig	1135	1020	10
Camphen	campherartig	1065	949	10
Ethylbutanoat	fruchtig	1030	803	10
(Z)-2-Heptenal	grün, fettig	1319	957	10
Hexanal	grün	1082	801	10
3-Isobutyl-3-methoxypyrazin <sup>c)</sup>	erdig	1517	1184	10
Limonen	ätherisch, citrusartig	1180	1030	10
Nonanal	seifig	1388	1102	10
2,3,5-Trimethylfuran	röstig	1050	730	10
Unbekannt	-	1092	-	10

- a) Die Verbindungen wurden identifiziert durch Vergleich mit der Referenzsubstanz auf der Basis folgender Kriterien: RI-Wert auf 2 Kapillarsäulen (DB-FFAP und DB-5), Massenspektren (EI) und Geruchsqualität am Sniffing-Port.
- b) Geruchsbeschreibung während der HRGC-O
- c) Die MS-Signale waren für eine Interpretation zu schwach, die Identifizierung erfolgte auf der Basis der in a) angegebenen Kriterien.

Die höchsten FD-Faktoren wurden für 3-Methylbutanal (malzig),  $\beta$ -Pinen (terpenartig, harzig), Octanal (seifig, citrusartig), Pentanal (stechend, bittermandelartig) und Propanal (fruchtig, stechend) erkannt. Weiterhin wiesen die Aromastoffe Acetaldehyd (stechend, ätherisch), 2,5-Dimethylpyrazin (nussartig), Filberton (haselnussartig), 3-Methyl-4-heptanon (fruchtig, nussartig), 6-Methyl-5-hepten-2-on (grün, fettig, stechend), Myrcen (krautig, metallisch), 2-Pentylfuran (butterartig, grüne Bohnen),  $\alpha$ -Phellandren (terpenig, medizinisch), 2-Pentanon (fruchtig, nach Bananen), 2-Butanon (ätherisch) und das  $\alpha$ -Pinen (terpenartig) sowie eine unbekannte Verbindung hohe FD-Faktoren auf.

Im Vergleich zu rohen Haselnusskernen wurden in den gerösteten Haselnüssen die Aldehyde Propanal, Pentanal, Hexanal, Octanal und das Filberton mit höheren FD-Faktoren wahrgenommen. Die sensorische Relevanz originär vorkommender Inhaltstoffe ist in den rohen Haselnusskernen aufgrund fehlender Röstaromen höher als in den gerösteten Haselnusskernen. Röstaromen wie z. B. das 2,5-Dimethylpyrazin waren in den rohen Haselnusskernen sensorisch nicht nachweisbar.

### **3.2.4 Diskussion**

Mittels AEVA wurden in frischen Haselnusskernen der Ernte 2000 (Durchschnittsprobe aus 400 g Untersuchungsmaterialien) die Verbindungen Octanal, 1-Octen-3-on, 2,5-Dimethyl-3-methoxypyrazin und 2-Acetyl-1-pyrrolin mit hohen FD-Faktoren als potente Aromastoffe identifiziert. Auf Basis des FD-Faktors leisten diese Verbindungen einen hohen Beitrag zum Gesamtaroma roher Haselnüsse.

Die wichtigen Geruchstoffe, die bei der Lagerung von Haselnüssen entstehen, wurden mittels vergleichender AEVA von frischen (Ernte 2000) und gelagerten Haselnüssen (Ernte 1998 n) untersucht. Die FD-Faktoren der aromaktivsten Komponenten in der frischen und gelagerten Probe zeigten keine signifikanten Unterschiede. Für die Lipidoxidationsprodukte Hexanal, (E,E)-2,4-Nonadienal und (E,E)-2,4-Decadienal wurden in der gelagerten Probe (Ernte 1998 n) im Vergleich zur frischen Probe (Ernte 2000) höhere FD-Faktoren gefunden.

Über die direkte Injektion und Desorption der Öle mit der TCT-HRGC-O Methode wurden als aromarelevante Verbindungen originäre Inhaltstoffe wie das  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen,  $\alpha$ -Phellandren und Camphen in rohen und gerösteten Haselnusskernen erkannt. Darüber hinaus wurden in gelagerten

Haselnusskernen im Vergleich zur frischen Ernte 2000 erhöhte FD-Faktoren für das  $\Delta$ -3-Caren und das Limonen nachgewiesen. Im Gegensatz zur AEVA wurden mittels der TCT-HRGC-O Methode Octanal, Decanal und das 1-Octen-3-on mit hohen FD-Faktoren als potente Aromastoffe der gelagerten Haselnusskerne erkannt. Die Verbindungen wurden in der frischen Ernte 2000 nicht wahrgenommen. Hexanal wurde in der frischen Ernte höher bewertet als in der gelagerten Ernte. Octanal wurde bereits von Barthel et al., 1974 als wichtige Geruchskomponente in oxidierten Haselnüssen beschrieben. Die mittels AEVA in Durchschnittsproben (Ernte 2000 und Ernte 1998 n) nachgewiesenen Peroxidationsprodukte (E)-2-Nonenal, (E)-2-Decenal, (E,E)-2,4-Decadienal, (E,Z)-2,4-Decadienal, (E,Z)-2,4-Nonadienal, (E)-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal wurden mit der TCT-HRGC-O Untersuchung nicht nachgewiesen.

Ein Vergleich der Ergebnisse der AEVA und TCT-HRGC-O zeigt, dass mittels der AEVA- Technik nussartige, pilzartige, röstige, seifige, kartoffelartige und fettige Geruchseindrücke dominierten, während bei der TCT-HRGC-O Methode potente Verbindungen mit fruchtigem, terpenartigem, ätherischem und campherartigem Geruch auftraten.

Die Unterschiede in der Bewertung der Aromarelevanz einzelner Verbindungen bei der AEVA und TCT-HRGC-O Methode ist u. a. auf die unterschiedliche Probenvorbereitung zurückzuführen. Die AEVA bedingt eine lange Probenaufarbeitung (1-2 Tage) bei der eine Autoxidation des isolierten Haselnussöles eintreten kann. Dagegen wird bei der TCT-HRGC-O Methode nur ein Pressvorgang des Öles und eine sich anschließende Desorption der Geruchstoffe aus dem isolierten Haselnussöl benötigt (~75 Min). Weiterhin sind die Ausbeuten bei der Isolierung der Geruchstoffe bei den beschriebenen Verfahren unterschiedlich.

Mit der schonenden und einfachen Probenaufarbeitung der TCT-HRGC-O Methode werden autoxidative Prozesse weitgehend gehemmt. Nicht ausschließen lassen sich jedoch enzymatische Prozesse während des Pressvorganges und während der Desorptionsphase. Durch das Pressen der Kerne werden die Zellen zerstört und Enzymsysteme freigesetzt. Vom IVV, Freising wurden in den untersuchten Proben Aktivitäten der Lipoxidase, Peroxidase, Alkoholdehydrogenase und Phenoloxidase nachgewiesen (Diagramm 6.2 - 6.5, Anhang Ergebnisse IVV) [Rieblinger und Guth, 2002]. Bei Extraktionsbedingungen von 60 min Desorptionszeit und 60 °C Desorptionstemperatur ist anzunehmen, dass die Enzymsysteme weitgehend intakt sind. Unter Berücksichtigung der Substratspezifität der Lipoxygenase auf das (Z,Z)-1,4-Pentadiensystem und der Fettsäurezusammensetzung der Haselnusskerne (vgl. Tab. 6.3, Tab .6.5 und Tab. 6.7) kann die Konzentrationszunahme des (E,E)-2,4-Decadienals bei einer wiederholten Desorption des Öles auf einen Abbau von labilen Hydroperoxiden zurückgeführt werden (Diagramm 3.3). Dagegen deutet die



kontinuierliche Konzentrationsabnahme des Nonanals auf eine unvollständige bzw. zeitlich verzögerte Desorption der aus der Autoxidation der Ölsäure hervorgehenden Komponente hin. Die erhöhten FD-Faktoren des Hexanals für die Ernte 2000 (Tabelle 3.6) im Vergleich zur Ernte 1998 n (Tabelle 3.7) können durch einen Abbau von Fettsäurehydroperoxiden mit einer Hydroperoxid-Lyase erklärt werden. Die Aktivität der Lyase nimmt vermutlich mit der Lagerung der Ware ab.

Bei den gerösteten Proben sind die Unterschiede in den FD-Faktoren (Ernte 2000 und Ernte 1998 n) weniger signifikant. Übereinstimmende Geruchseindrücke bei der AEVA und TCT-HRGC-O waren: nussartig, malzartig, fruchtig, seifig und röstig. Von den Ergebnissen der AEVA abweichend wurden mit der TCT-HRGC-O im Weiteren ätherische, krautige, metallische, stechende, bittermandelartige, butterartige und harzige Geruchseindrücke wahrgenommen. Die in den gerösteten Haselnusskernen als wichtige Aromastoffe identifizierten Verbindungen wurden mit Ausnahme des 3-Methyl-4-heptanons, 2,5-Dimethyl-3-methoxypyrazins,  $\alpha$ -Pinens,  $\Delta$ -3-Carens, o-Aminoacetophenons und des Methionals bereits in der Literatur als potente Aromastoffe von Haselnussölen identifiziert [Matsui et al., 1998].

Zu berücksichtigen ist bei einem Vergleich der Untersuchungsergebnisse der beiden Analysenverfahren (TCT-HRGC-O, AEVA) der Einfluss der Probennahme. Insbesondere bei der gelagerten Ernte führte der Einsatz von homogenisierten Mischproben bei der AEVA zu geringen Unterscheidungsmerkmalen zwischen frischer und gelagerter Ernte. Demgegenüber ermöglicht die TCT-HRGC-O Methode eine Einzelnussanalytik, die die Variationsbreite der Probencharge erfassen kann. Haselnusskerne, die durch eine Lagerung einer Lipidoxidation ausgesetzt waren, können mittels TCT-HRGC-O Technik eindeutig erkannt werden.

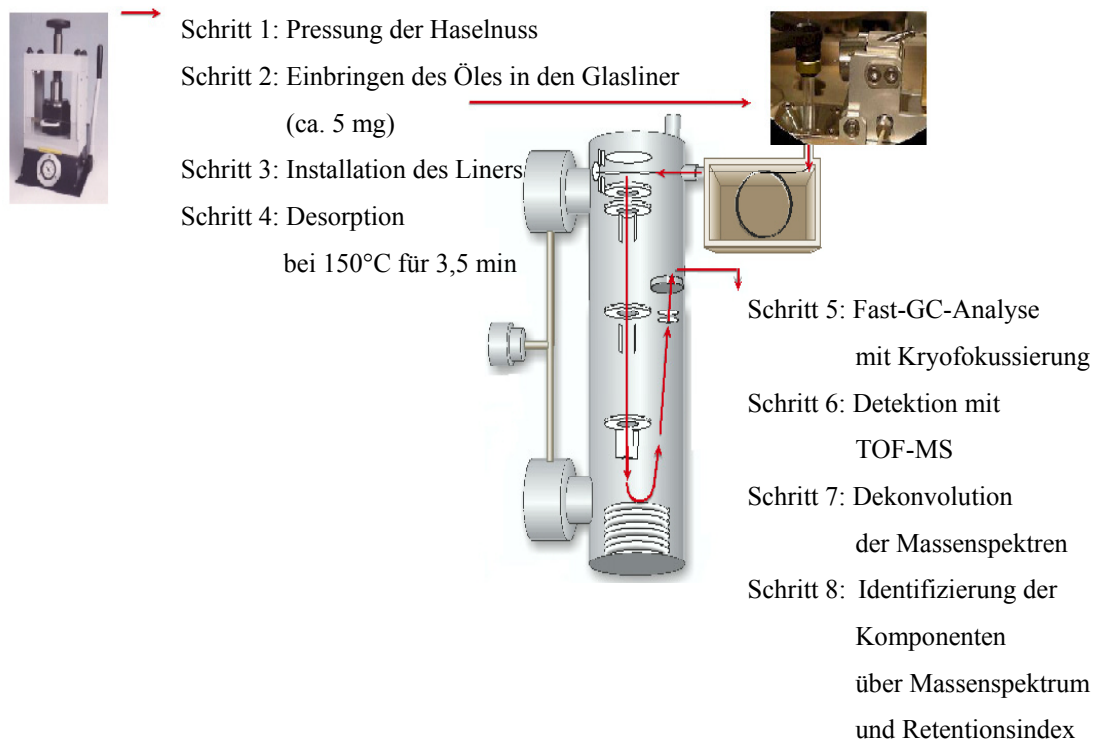
Insgesamt zeichnet sich die TCT-HRGC-O Methode durch eine einfache und schonende Probenvorbereitung aus und ist wenn möglich der AEVA vorzuziehen. Die Untersuchungen zur Bewertung der Aromarelevanz einzelner Verbindungen sind jedoch auf Verbindungen beschränkt, die in höheren Konzentrationen vorliegen.

### 3.3 Quantifizierung wichtiger Geruchsstoffe in Haselnusskernen

Zur Qualitätsabschätzung von Haselnusskernen wurden Bewertungskriterien aus Quantifizierungsergebnissen, der mittels AEVA und TCT-HRGC-O als wichtig erkannten Aromastoffe, erarbeitet.

Als Analysensystem wurde ein GC-System eingesetzt, welches mit einem Direct-Thermal-Desorption- (DTD) Injektor und einem Time-Of-Flight- Massenspektrometer (TOF-MS) ausgestattet war. Das Prinzip der Methode ist in Abb. 3.3 dargestellt.

**Abbildung 3.3 Prinzip der DTD/Fast-GC/TOF-MS Analyse**



Weiterhin wurden Quantifizierungsexperimente mittels Isotopenverdünnungsanalysen (IVA) durchgeführt (Kapitel 3.3.2).

### 3.3.1 DTD/Fast-GC/TOF- Massenspektrometrie

Die DTD/Fast-GC/TOF-Methode beruht auf der thermischen Desorption und Gasextraktion flüchtiger Verbindungen aus Haselnussölen über die direkte Injektion der Öle in einen als DTD-konzipierten PTV-Injektor. Mit einer Kryofokussierung werden aus der Lipidmatrix verdampfende Komponenten auf der Trennsäule ausgefroren und anschließend mit schneller Gaschromatographie (Fast-GC) getrennt. Die Detektion nach Elektronenstoßionisation (EI) erfolgt über das TOF-MS.

Der Vorteil der DTD-Injektion liegt in einem kurzen Transferweg der flüchtigen Komponenten aus der Ölmatrix zur GC-Säule und verringert somit Verluste durch Adsorption und Zersetzung. Eine wichtige Voraussetzung zum direkten Einsatz der Methode in der Routineanalytik bildet der automatisierbare Austausch des Insertliners. Über eine pneumatische Steuerung wird der Injektorkopf geöffnet und der Liner ausgetauscht. Beim Schließen penetriert die Trägergasleitung das Septum des Glasliners. Das zur Analyse eingesetzte Injektionsvolumen ist von der Aromaintensität des Öles, der Polarität der Aromakomponenten, der Trennsäulenkapazität und der Empfindlichkeit des Detektors abhängig. Die Reproduzierbarkeit der thermischen Desorption wird durch das Injektionsvolumen, die Desorptionszeit und Desorptionstemperatur sowie durch die Konstruktion des Liners bestimmt.

Durch den Einsatz der TOF-Technik als Detektionsmethode wird die Anwendung der chromatographischen Trennung als Fast-GC ermöglicht. Die nahezu diskriminierungsfrei erzeugten Massenspektren werden mit einem Dekonvolutionsalgorithmus der Software Chroma<sup>TOF</sup> von den Spektren koeluerender Verbindungen bereinigt. Hierdurch können Zielanalyten auch bei den in der Fast-GC auftretenden Koelution sehr sicher identifiziert werden. Die niedrige Nachweisgrenze des Detektors erlaubt die Injektion kleiner Ölvolumen von wenigen Mikrolitern, welche die Voraussetzung zu hohen Extraktionsausbeuten mit guten Reproduzierbarkeiten der Desorption bilden. Die Nachweisgrenze des Detektors ist auf 2 pg (absolut) Hexachlorbenzol spezifiziert (splitlose Lösungsmittelinjektion, Signal/Rausch-Verhältnis 10:1,  $m/z = 284$ ) und der Linearitätsbereich des Detektors über einen Konzentrationsbereich von ca. 6 Größenordnungen angegeben.

### 3.3.1.1 Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung umfasste eine Optimierung der Parameter:

Linerkonstruktion

Injektionsvolumen

Desorptionstemperatur

Desorptionszeit

Weiterhin wurde die Aromastabilität frisch gepresster Haselnussöle mit der Standzeit überprüft.

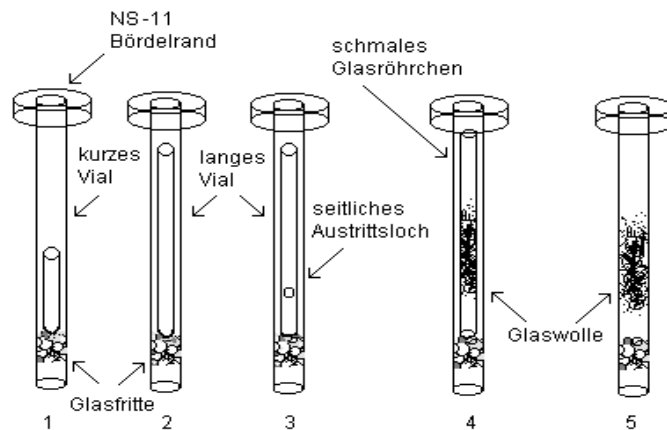
Die erhöhte Viskosität von Ölen erforderte bei der automatisierten Injektion niedrige Füllgeschwindigkeiten der Injektionsspritze. Die durch Reinigung der Spritze verursachten Kontaminationen organischer Lösungsmittel konnten über Penetration der Injektionsnadel in den Heizkörper eines zweiten Injektorkopfes (150 °C, 1 min.) bei gleichzeitigem Pumpen des Spritzenstempels entfernt werden.

Bei einer Injektion von 10 µl eines frisch gepressten Öles roher Haselnusskerne wurde die Trennsäule mit  $\alpha$ -Pinen überladen. Die Injektion von 5 µl Öl führte zu guten Peaksymmetrien. Durchschnittlich 150 Komponenten wurden mit einem Signal/Rausch-Verhältnis größer 20:1 bei einer Gesamtanalysenlaufzeit von 11,5 min detektiert.

Zur Optimierung der thermischen Desorption wurden zunächst verschiedene Liner-Konstruktionen getestet (Abb. 3.4). Als Modellmatrix wurde ein neutrales Pflanzenöl (raffiniertes Sonnenblumenöl, aromatisiert) und als Modellverbindungen  $\alpha$ -Pinen und Camphen eingesetzt. Die besten Ergebnisse wurden für die Glasliner Nr. 4 - 5 erhalten (Variationskoeffizient 7% für  $\alpha$ -Pinen). Die Chromatogramme (Massenspuren von sieben identisch durchgeführten Ölinjektionen) für diese beiden Liner-Typen sind in Abbildung 3.5 gezeigt. Die Liner Nr. 1 - 3 erwiesen sich wegen sehr hoher Variationskoeffizienten bis zu 50% bei Mehrfachinjektionen als ungeeignet.

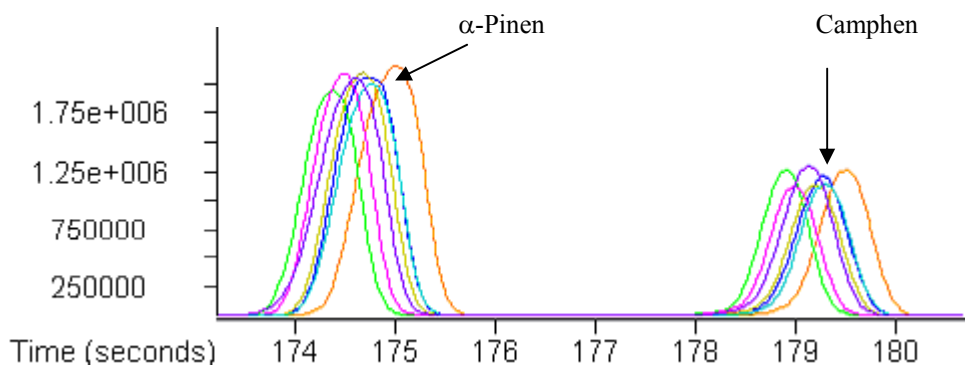
Bei einer thermischen Belastung der Öle können mögliche labile Aromastoffvorläufer (z. B. Hydroperoxide) zersetzt und neue Aromastoffe gebildet werden. Liegt bereits eine oxidative Schädigung des an ungesättigten Fettsäuren reichen Haselnussöls vor, tritt eine Verstärkung der Prozesse ein. Eine Optimierung der Desorption hinsichtlich einer Minimierung oxidativer Schädigungen wurde in Abhängigkeit von der Desorptionszeit und Desorptionstemperatur durchgeführt.

**Abbildung 3.4**      **Getestete Glaslinerkonstruktionen**



Glasliner mit Mikroviales verschiedener Länge und Durchmesser (Liner 1-3); Glaswolle in Liner 5; Glaswolle in Glasrohr als Insert (Liner 4); Desorptionszeit 3,5 min, Desorptionstemperatur 150 °C

**Abbildung 3.5**      **Reproduzierbarkeit von Ölinjektionen bei der dynamischen Thermodesorption (Modellverbindungen:  $\alpha$ -Pinen und Camphen)**



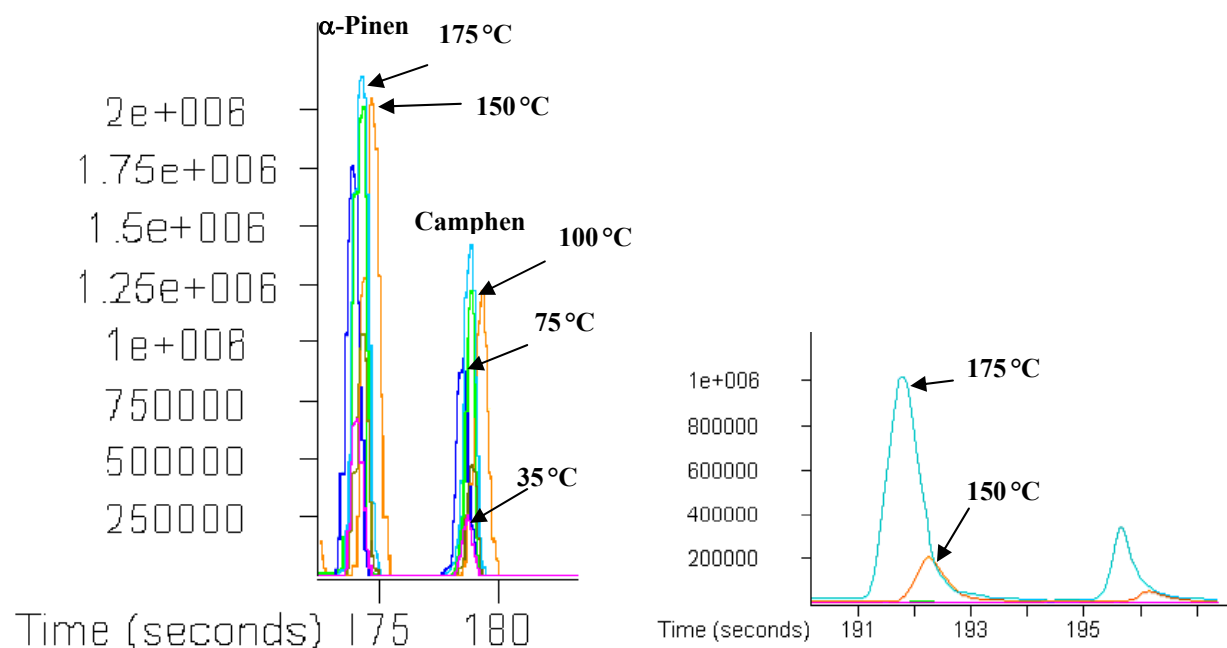
Die Desorptionstemperatur wurde zwischen 35 bis 175 °C variiert. Bei der Desorption mit Temperaturen von 100 bis 175 °C (Desorptionszeit 3,5 min) wurden erwartungsgemäß die besten Ausbeuten flüchtiger Verbindungen erzielt (Abbildung 3.6 A). Im Vergleich zu 150 sowie 175 °C sanken die Ausbeuten der Terpene bei 100 °C mit abnehmender Flüchtigkeit der Verbindungen. So wurde das  $\alpha$ -Pinen als originärer Inhaltstoff zwischen 100 bis 175 °C nahezu vollständig extrahiert, während das Monoterpen  $\alpha$ -Phellandren bei einer Temperatur von 100 °C nur noch ca. 60%, der mit 175 °C erzielten Ausbeuten erreichte.

Der Einfluss der Temperatur auf Peroxidationsprodukte wird bei einem Vergleich der Extraktionsausbeuten für 150 °C und 175 °C am Beispiel des (E,E)-2,4-Nonadienals deutlich. Die Konzentration des (E,E)-2,4-Nonadienals nimmt bei einer Desorptionstemperatur von 150 °C im Vergleich zu 175 °C um ca. 80 % ab (Abbildung 3.6 B).

**Abbildung 3.6** Temperaturabhängigkeit der DTD-Injektion bei konstanter Desorptionszeit (3,5 min)

**A**  $\alpha$ -Pinen und Camphen (93 m/z)

**B** (E,E)-2,4-Nonadienal (81 m/z)



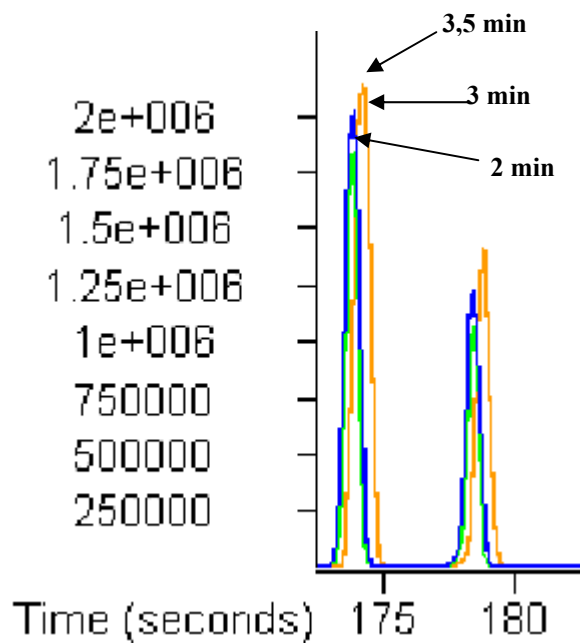
Die Optimierung der Desorptionszeit verfolgte ebenfalls die Zielsetzung der schonenden und vollständigen Extraktion der Analyten. Aus diesem Grunde wurde die Desorptionszeit zwischen 0,5 und 3,5 min bei einer Temperatur von 150 °C bzw. 175 °C variiert. Durch eine Verlängerung der Desorptionszeit wurde die Extraktionsausbeute der Komponenten erhöht (Abbildung 3.7).

Als Parameter für die weiteren Analysen wurden eine Desorptionstemperatur von 150 °C und eine Desorptionszeit von 3,5 min festgelegt.

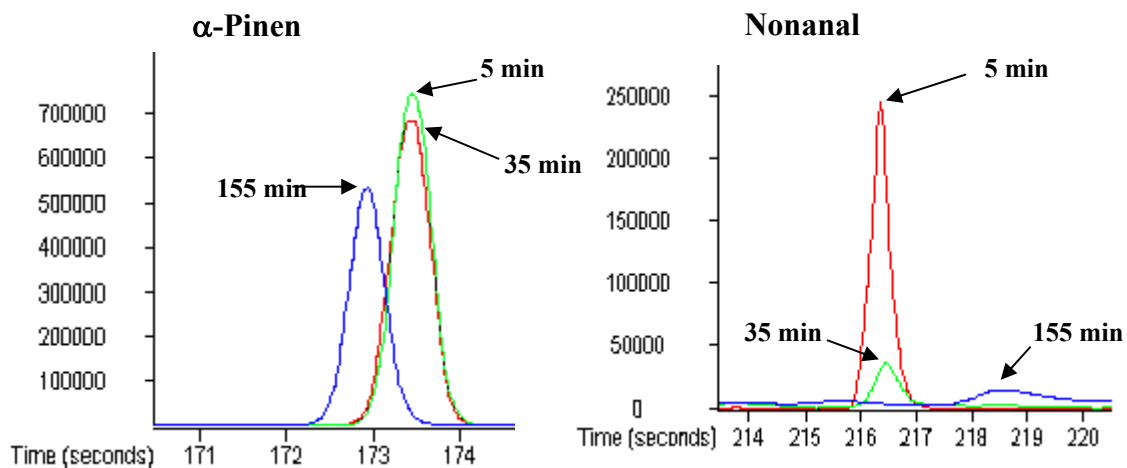
Aufgrund der während der Desorption stattfindenden Peroxidationen der Probenmaterialien ist die Bestimmung einer Wiederfindung der Einzelverbindungen nicht sinnvoll, zumal die Identifizierung von Qualitätsabweichungen zwischen einzelnen Haselnussqualitäten auf einer relativen Änderung der

Aromazusammensetzung beruht. Zur Überprüfung der Desorptionsausbeuten wurde daher lediglich eine wiederholte Desorption eines bereits analysierten Öles durchgeführt. Wurde ein Öl unter den oben beschriebenen Bedingungen extrahiert und nach der Analyse ein zweites Mal desorbiert, war das  $\alpha$ -Pinen und das Camphen nur noch mit  $>0,1\%$  der ursprünglichen Fläche nachweisbar. Für diese Verbindungen können somit Wiederfindungen von  $> 99\%$  angenommen werden.

**Abbildung 3.7** Zeitabhängigkeit der DTD-Injektion bei konstanter Desorptionstemperatur ( $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) für  $\alpha$ -Pinen und  $\beta$ -Pinen ( $93\text{ m/z}$ )



**Abbildung 3.8** Einfluss der Standzeiten von Haselnussöl nach der Pressung auf die Geruchsstoffkonzentrationen ausgewählter Verbindungen



Durch die Pressung roher Haselnusskerne werden intakte Zellen zerstört und Enzyme freigesetzt. In Abbildung 3.8 ist der Einfluss der Standzeit auf die Aromastoffkonzentrationen im Haselnussöl an ausgewählten Verbindungen gezeigt. Nach der Pressung und einer Standzeit von 35 min nehmen die Konzentrationen der Geruchsstoffe im Fall von  $\alpha$ -Pinen leicht, im Fall von Nonanal drastisch ab; nach einer Standzeit von 155 min lässt sich Nonanal nicht mehr eindeutig nachweisen. Die drastische Abnahme des Nonanals ist vermutlich auf eine enzymatische Reduktion mittels Alkoholdehydrogenase zurückzuführen (vgl. Diagramm 6.5 und Kapitel 3.2.4). Die Analysen der Proben wurden auf Basis dieser Ergebnisse sofort nach der Pressung durchgeführt. Die Quantifizierung ausgewählter Aromastoffe erfolgt über eine externe Kalibrierung.

### 3.3.1.2 Ergebnisse der DTD/Fast-GC/TOF-MS

Die Empfindlichkeit, mit der sensorische Abweichungen in Ölen analytisch erfasst werden können, wurde zunächst in Modellstudien untersucht. Als Probenmaterialien wurden raffinierte, aromatisierte Sonnenblumenöle der Firma Bestfood, Kleve (Deutschland) eingesetzt. Die bis zu 12 Monate bei Raumtemperatur gelagerten Öle wurden von einem ausgebildeten Panel der Firma Bestfood sensorisch geprüft und die Qualität in eine Skala von 1-5 (Abstufungen: ausgezeichnet, gut, genügend, bedingt verzehrfähig, nicht verzehrfähig) eingestuft.

Zwei qualitativ schwach voneinander abweichende Öle (Sonnenblumenöl I: Note 1-2, Sonnenblumenöl II: Note 3) wiesen in der Zusammensetzung ihrer Aromaspektren nur geringfügige Unterschiede auf. So wurde bei dem sensorisch schlechter bewerteten Öl ein leichter Anstieg sekundärer Peroxidationsprodukte und eine Abnahme in den Konzentrationen der Monoterpenen festgestellt (Diagramm 3.5).

Eine Gegenüberstellung ausgewählter Aromawerte (der Aromawert ist definiert als Quotient aus Konzentration eines Geruchsstoffes und seinem Geruchsschwellenwert, vgl. Kapitel 1) auf der Basis nasaler Geruchsschwellenwerte in Öl [Belitz et al., 2001] (Tab 3.9) zeigt, dass der über eine externe Kalibrierung ermittelte Konzentrationsanstieg des (E,E)-2,4-Decadienals, Hexanals und des Octanals mit Aromawerten  $> 1$  sensorisch wahrnehmbar waren (Diagramm 3.6). Die Ergebnisse demonstrieren, dass geringfügige sensorische Unterschiede sehr empfindlich über eine Verschiebung in den Aromaspektren der aromaaktiven Verbindungen (Aromawerte  $> 1$ ) nachgewiesen werden können.



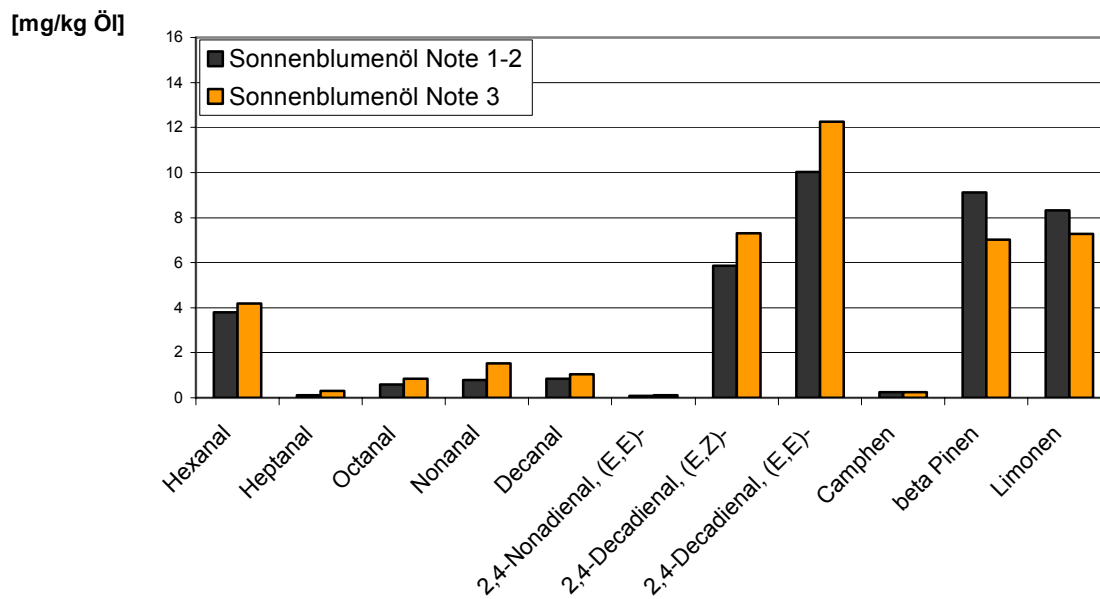
**Tabelle 3.9**

**Geruchsschwellenwerte ausgewählter Aromastoffe aus der Lipidperoxidation [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] in Öl nach Belitz et. al, 2001**

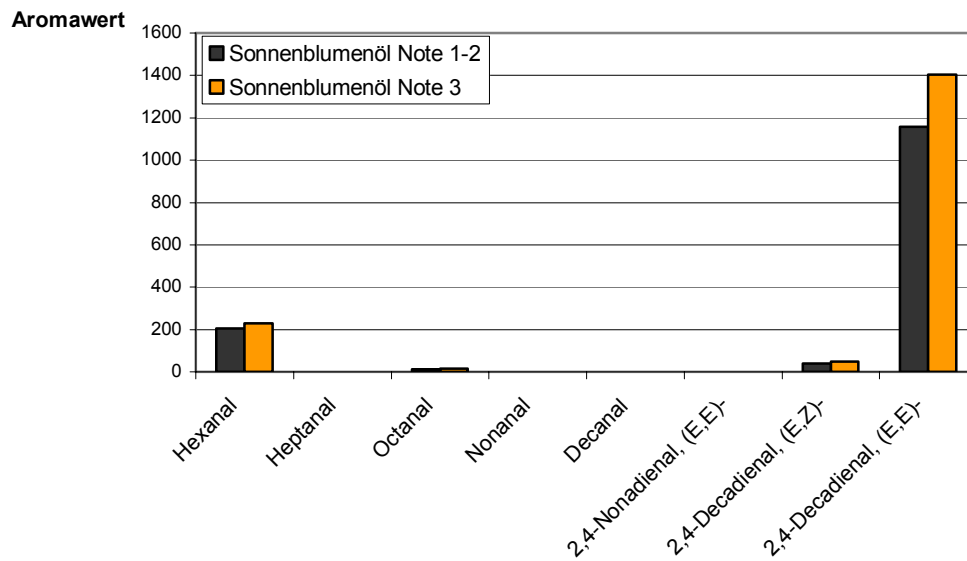
Verbindung	Geruchsschwellenwert nasal [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Geruchsschwellenwert retronasal [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Hexanal	320	75
Heptanal	3200	50
Octanal	320	50
Nonanal	13500	260
Decanal	6700	850
(E,E)-2,4-Nonadienal	2500	460
(E,Z)-2,4-Decadienal	10	-
(E,E)-2,4-Decadienal	180	40

**Diagramm 3.5**

**Konzentration ausgewählter Geruchstoffe für Sonnenblumenöle mit geringfügigen sensorischen Abweichungen**



**Diagramm 3.6 Aromawerte (nasal) ausgewählter Geruchsstoffe für Sonnenblumenöle mit geringfügigen sensorischen Abweichungen**



Die Übertragbarkeit der Methode auf Haselnusskerne wurde an sensorisch verkosteten Nusshälften der Erntejahre 1998 n und 2000 geprüft.

Eine Hälfte der Nuss wurde sensorisch bewertet und von der entsprechenden zweiten Hälfte das Öl mittels einer Presse isoliert und analysiert. Die sensorische Bewertung wurde von einem geschulten Prüfer mit industrieller Erfahrung in der praktischen Qualitätsprüfung von Haselnusskernen durchgeführt. Als Kriterium wurde eine Skalierung zwischen „Normal“ für „arteigen, einwandfreier roher Haselnusskern“ und „abweichend“ für einen nicht beschreibbaren, andersartigen Sinneseindruck eingeführt. Die Intensitäten der Abweichungen wurden zwischen kaum wahrnehmbar und stark wahrnehmbar eingestuft (Abstufungen: kaum, schwach, deutlich, stark wahrnehmbar).

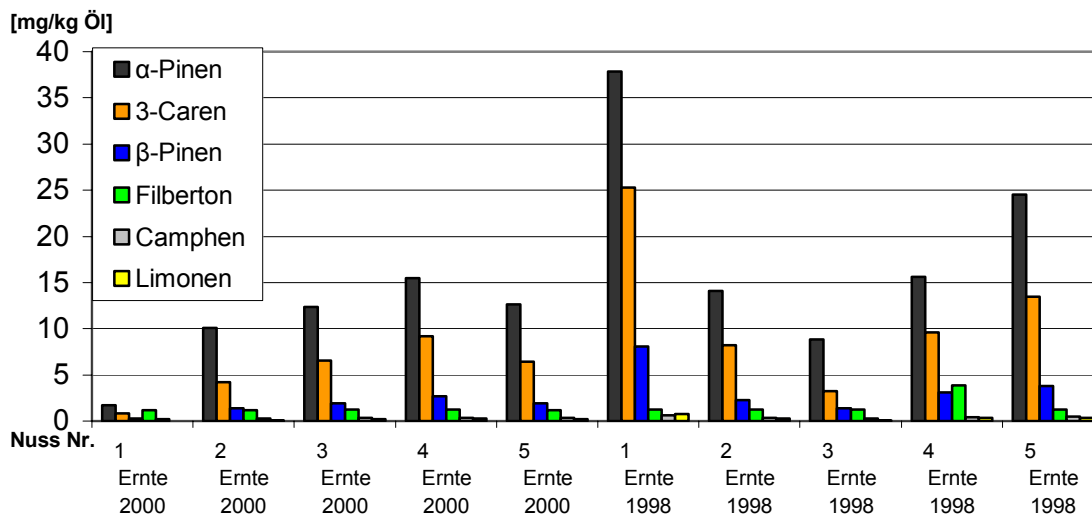
Insgesamt wiesen die Aromaspektren eine annähernd gleiche qualitative Zusammensetzung auf. Ausnahmen bildeten Variationen sekundärer Peroxidationsprodukte, insbesondere von Alkanen. Ein Vergleich mit den Identifizierungsergebnissen der TCT-Olfaktometrie und der AEVA zeigt weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse. Komponenten, welche bei den olfaktorischen Untersuchungen noch in sehr niedrigen Konzentrationen wahrnehmbar waren, wie z. B. das 2,5-Dimethyl-3-methoxypyrazin oder das 2-Isobutyl-3-methoxypyrazin, wurden aufgrund der geringen Injektionsmenge nicht identifiziert.

Deutliche Unterschiede in den quantitativen Zusammensetzungen zeigten sich sowohl innerhalb als auch zwischen den Probenchargen. Beispielhaft sind die über eine externe Kalibrierung ermittelten Konzentrationen ausgewählter Geruchsstoffe für jeweils fünf rohe Kerne der Ernte 2000 und Ernte 1998 n in Tabelle 3.10 und Tabelle 3.11 dargestellt.

Die geringen Konzentrationen der Monoterpene  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, Camphen,  $\Delta$ -3-Caren und Limonen korrelieren mit der sensorischen Beschreibung der Nuss 1 Ernte 2000 (spur abweichend) und zeigen eine verringerte Nussqualität an. So liegt die Konzentration des  $\alpha$ -Pinen für die Nuss 1 Ernte 2000 im Vergleich zur Nuss 4 Ernte 2000 (normal) um den Faktor 9 niedriger. Eine starke Zunahme der Monoterpene wurde bei den sensorisch abweichenden Haselnusskernen Nuss 1 Ernte 1998 n und 5 Ernte 1998 n festgestellt (Diagramm 3.7). Sensorisch unauffällige Kerne wiesen auch nach zwei Jahren Lagerung bei Normallagerung keine erhöhten Konzentrationen der Terpene auf. Eine erhöhte Konzentration der Monoterpene zeigt also nur dann eine gute Haselnussqualität an, wenn Peroxidationsprodukte nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Die Konzentration des Filbertons streute ohne erkennbare Tendenz mit Ausnahme der Nuss Nr. 4 Ernte 1998 n um ca. 1,2 mg/kg Öl. Ein Grund für die abweichende Konzentration in dieser Nuss konnte nicht festgestellt werden.

**Diagramm 3.7** Konzentration einiger Monoterpene und Filberton in sensorisch verkosteten Einzelnüssen der Ernte 2000 und Ernte 1998 n, Fraktion 11-13 mm  $\emptyset$



Für die Lipidperoxidationsprodukte Hexanal, (E,E)-2,4-Nonadienal und (E,E)-2,4-Decadienal wurden insgesamt höhere Gehalte in den Proben alter Ernte festgestellt. Eine Ausnahme bildet hierbei die Nuss 1 Ernte 1998 n (Tab. 3.11, Diagramm 3.8). Trotz starker sensorischer Abweichung konnten höhere Konzentrationen dieser Produkte nicht nachgewiesen werden. Eine nähere Untersuchung der Spektren zeigte eine leicht erhöhte Konzentration der n-Alkane Octan bis Decan sowie große Anteile nicht quantifizierter, verzweigter Alkane (Diagramm 3.9, Abb. 3.9). Auffällig sind ebenfalls hohe Konzentrationen zweier Komponenten, welche von der Nist-Datenbank mit großer Wahrscheinlichkeit als N-Ethyl-ethanamin (P = 93,2%) und N-Butyl-1-butanamin

(P = 84,1%) identifiziert wurde (Abb. 3.10). Die starke sensorische Abweichung der Nuss 1 Ernte 1998 n kann möglicherweise durch geruchsaktive Amine erklärt werden.

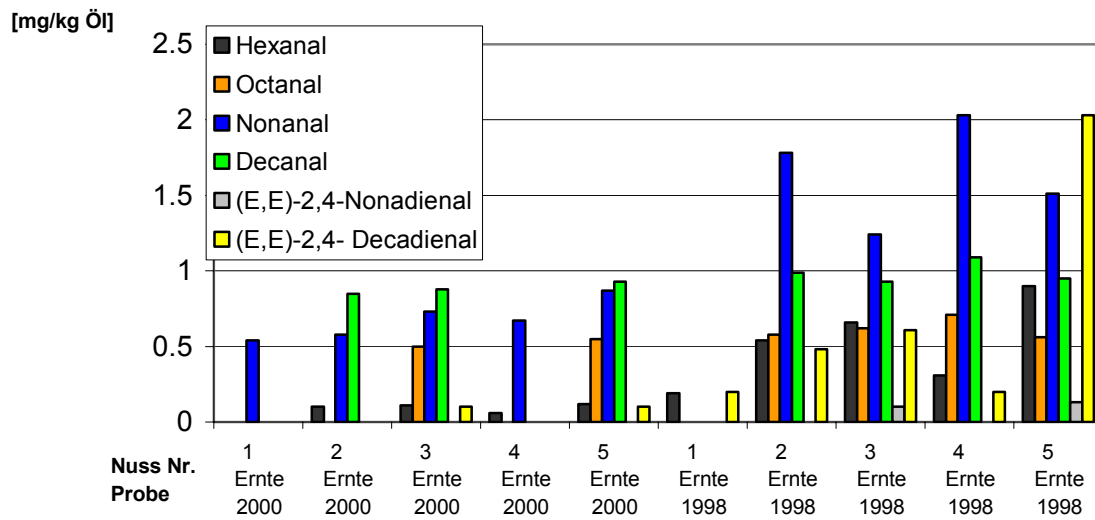
**Tabelle 3.10**                    **Konzentrationen [mg/kg Öl] ausgewählter Geruchstoffe in sensorisch verkosteten Einzelnüssen der Ernte 2000, Fraktion 11-13 mm Ø**

Nuss Nr.	1	2	3	4	5
Sensorik	kaum abweichend	normal	normal	normal	normal
$\alpha$ -Pinen	1.74	10.08	12.39	15.45	12.61
Camphen	0.24	0.31	0.34	0.36	0.34
Filberton	1.16	1.19	1.23	1.24	1.17
$\beta$ -Pinen	0.26	1.35	1.90	2.68	1.91
$\Delta$ -3-Caren	0.85	4.23	6.57	9.21	6.40
Limonen	<0.05	<0.05	0.18	0.29	0.18
Hexanal	<0.05	0.10	0.11	0.06	0.12
Octanal	<0.05	<0.05	0.50	<0.05	0.55
Nonanal	0.54	0.58	0.73	0.67	0.87
Decanal	<0.05	0.85	0.88	<0.05	0.93
(E,E)-2,4-Nonadienal	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
(E,E)-2,4-Decadienal	<0.05	<0.05	0.10	<0.05	0.10

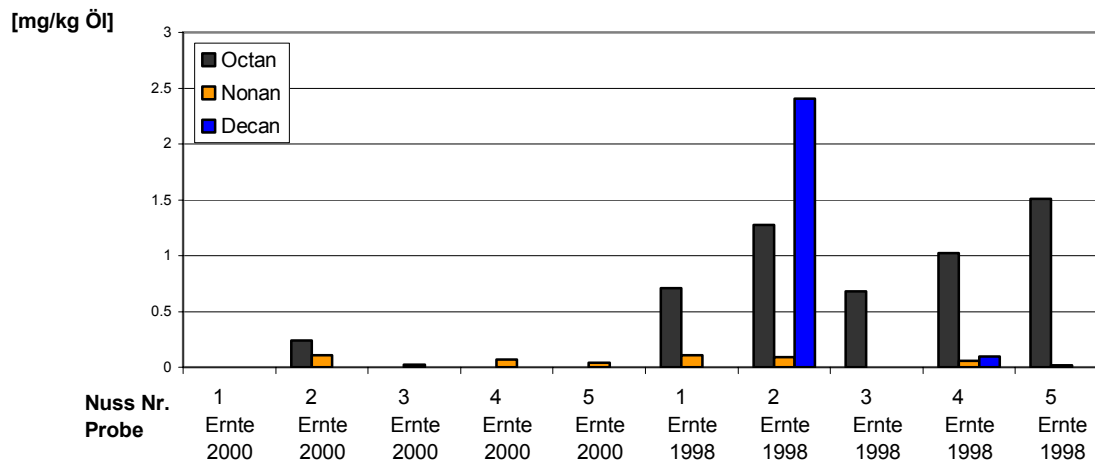
**Tabelle 3.11**                    **Konzentrationen [mg/kg Öl] ausgewählter Geruchstoffe in sensorisch verkosteten Einzelnüssen der Ernte 1998 n, Fraktionen 11-13 mm Ø**

Nuss Nr.	1	2	3	4	5
Sensorik	deutlich abweichend	leicht abweichend	normal	normal	stark abweichend
$\alpha$ -Pinen	37.85	14.12	8.81	15.61	24.53
Camphen	0.61	0.35	0.31	0.38	0.46
Filberton	1.25	1.21	1.22	3.86	1.25
$\beta$ -Pinen	8.09	2.26	1.40	3.09	3.83
$\Delta$ -3-Caren	25.31	8.19	3.28	9.62	13.46
Limonen	0.79	0.26	<0.05	0.37	0.37
Hexanal	0.19	0.54	0.66	0.31	0.90
Octanal	<0.05	0.58	0.62	0.71	0.56
Nonanal	<0.05	1.78	1.24	2.03	1.51
Decanal	<0.05	0.99	0.93	1.09	0.95
(E,E)-2,4-Nonadienal	<0.05	<0.05	0.10	<0.05	0.13
(E,E)-2,4-Decadienal	0.20	0.48	0.61	0.20	2.03

**Diagramm 3.8** Konzentration ausgewählter Peroxidationsprodukte in sensorisch verkosteten Einzelnüssen der Ernte 2000 und Ernte 1998 n, Fraktion 11-13 mm Ø

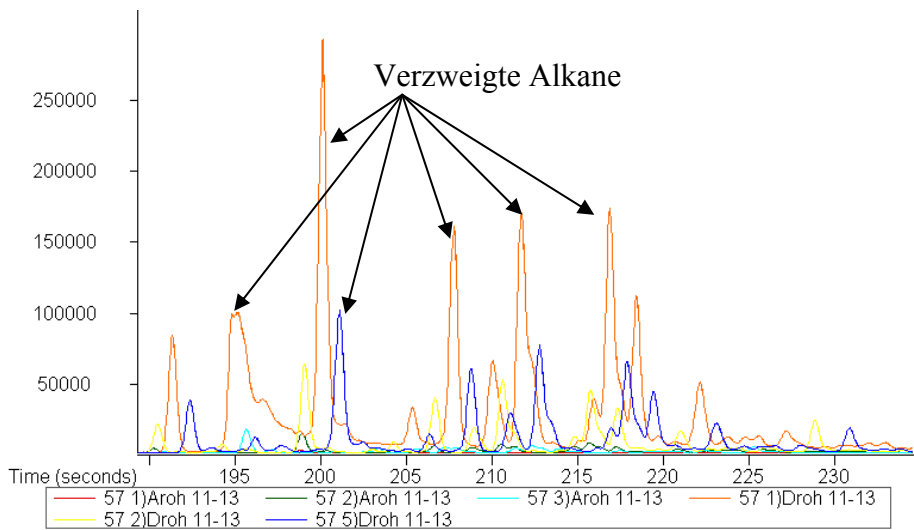


**Diagramm 3.9** Konzentration niedermolekularer n-Alkane in sensorisch verkosteten Einzelnüssen der Ernte 2000 und Ernte 1998 n, Fraktion 11-13 mm Ø



**Abbildung 3.9**

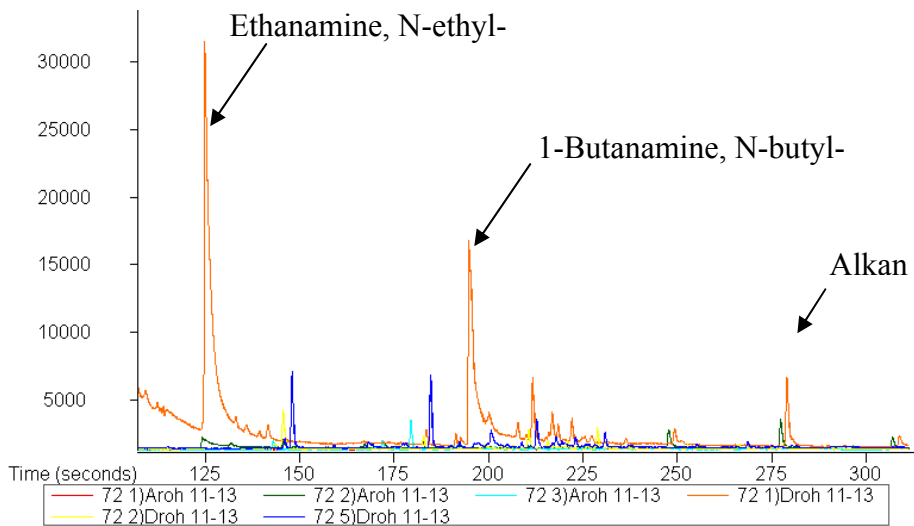
**Vergleich der Massenspur 57 für die sensorisch verkosteten Haselnusskerne Nr. 1-3 Ernte 2000 und Nr. 1, 2 und 5 der Ernte 1998 n**



Legende: 1 A - 5 A = Ernte 2000, 1 D - 5 D = Ernte 1998 n

**Abbildung 3.10**

**Vergleich der Massenspur 72 für die sensorisch verkosteten Haselnusskerne Nr. 1-3 Ernte 2000 und Nr. 1, 2 und 5 der Ernte 1998 n**



Legende: 1 A - 5 A = Ernte 2000, 1 D - 5 D = Ernte 1998 n

Während ein starker oxidativer Verderb von Haselnusskernen über den Nachweis des (E,E)-2,4-Nonadienals und (E,E)-2,4-Decadienals erfasst werden kann, ist eine Qualitätsbewertung bei geringfügiger sensorischer Abweichung nur durch eine differenzierte Untersuchung des Aromaspektrums möglich. So weisen niedrige Werte der Monoterpene auf eine mindere Qualität frischer Haselnusskerne hin (Nuss 1 Ernte 2000). Ein Anstieg in den Konzentrationen der Terpene weist in Kombination mit einem Anstieg von Kohlenwasserstoffen auf einen beginnenden Verderb durch Lagerung hin (Nuss Nr. 3 und 4 der Ernte 1998 n). Mikrobiologische Kontaminationen mit Hefen und Bakterien werden durch einen Anstieg von Stoffwechselprodukten wie z. B. Methylketone oder organische Säuren angezeigt. Insbesondere das Beispiel der Nuss 1 Ernte 1998 n demonstriert, dass eine allgemeine Qualitätsbewertung anhand der Konzentrationsbestimmungen typischer Oxidationsprodukte nicht ausreicht.

### **3.3.1.3 Einsatz chemometrischer Methoden zur Bewertung der Haselnussqualität**

Die Zusammenhänge zwischen der Qualität von Haselnusskernen und der Aromastoffkonzentration ausgewählter Verbindungen können mit Hilfe chemometrischer Verfahren erkannt und zur Interpretation der Aromaspektren ausgenutzt werden. Zu diesem Zweck wurden statistische Untersuchungen mit einer Stichprobengröße von 42 zufällig ausgewählten Einzelnusskernen (sensorisch nicht verkostet) unterschiedlicher Lagerzeiten und Lagerbedingungen durchgeführt:

Proben:

Ernte 2000 - Proben Nr. 1-13

Ernte 1999 k - Proben Nr. 14-21

Ernte 1999 n - Proben Nr. 22-26

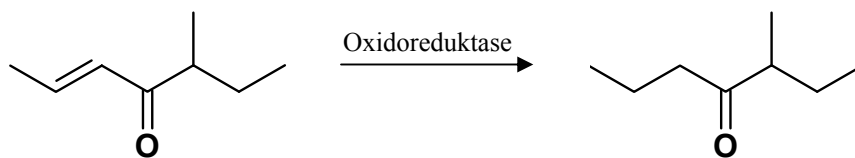
Ernte 1998 n - Proben Nr. 27-36

Ernte 1998 k - Proben Nr. 37-42

Die Proben wurden wie zuvor nach der in Kapitel 5.1.4 beschriebenen Methode analysiert. Der Vergleich der Proben erfolgte auf Basis der mittels TOF-MS ermittelten Flächenwerte.

Bei der Betrachtung der Konzentrationsverhältnisse einzelner Aromastoffe konnten die bisherigen Ergebnisse einer Konzentrationszunahme typischer Oxidationsprodukte bei der Lagerung, wie die des (E,E)-2,4-Nonadienals (Diagramm 3.11) und (E,E)-2,4-Decadienals, bestätigt werden. So wurde

das (E,E)-2,4-Nonadienal nur in den gelagerten Proben detektiert. In der Ernte 1998 n wurden z.B. von 11 untersuchten Nüssen in 5 Nüssen stark erhöhte Konzentrationen ermittelt. In der frischen Ernte 2000 bzw. in sensorisch unauffälligen Haselnusskernen (Diagramm 3.8) war dieser Geruchsstoff nicht nachweisbar. Hexanal, ein Indikator des oxidativen Fettverderbs in Haferextrudaten [Guth und Grosch, 1994], wurde nur vereinzelt in gelagerten Kernen in signifikant hohen Konzentrationen nachgewiesen (Diagramm. 3.12). Das von Barthel et al., 1974 in gelagerten Haselnusskernen nachgewiesene Octanal, wurde in den kühl gelagerten Ernten (1999 k und 1998 k) der vorliegenden Proben in höheren Konzentrationen nachgewiesen als im Vergleich zu den normal gelagerten Proben (1999 n und 1998 n) (Diagramm 3.13). Darüber hinaus wurde das 3-Methyl-4-heptanon als wichtiger Indikator für den Verderb von rohen Haselnüssen bei der Lagerung erkannt (Diagramm 3.10). Als möglicher Bildungsweg kann eine enzymatische Reduktion des Filbertons nach folgendem Reaktionsschema vermutet werden:



**Diagramm 3.10** Konzentrationsunterschiede des 3-Methyl-4-heptanon in den Ernten 2000 - 1998 (n, k), Fraktion < 11 mm

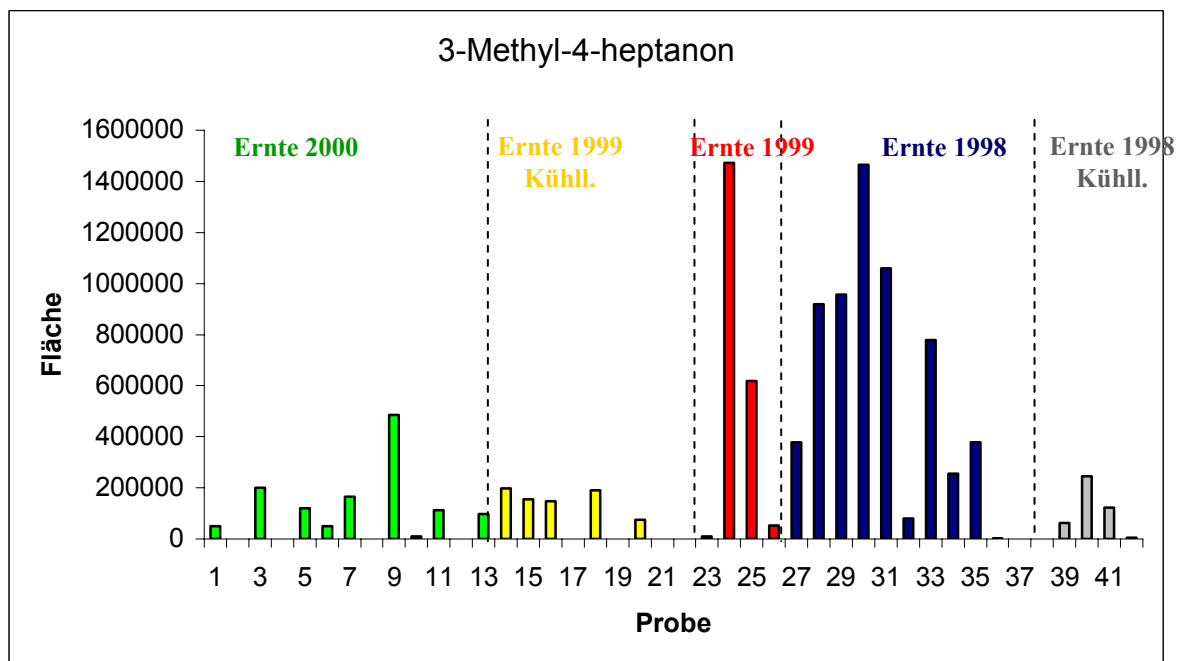




Diagramm 3.11

Konzentrationsunterschiede des (E,E)-2,4-Nonadienal  
in den Ernten 2000 - 1998 (n, k), Fraktion < 11 mm

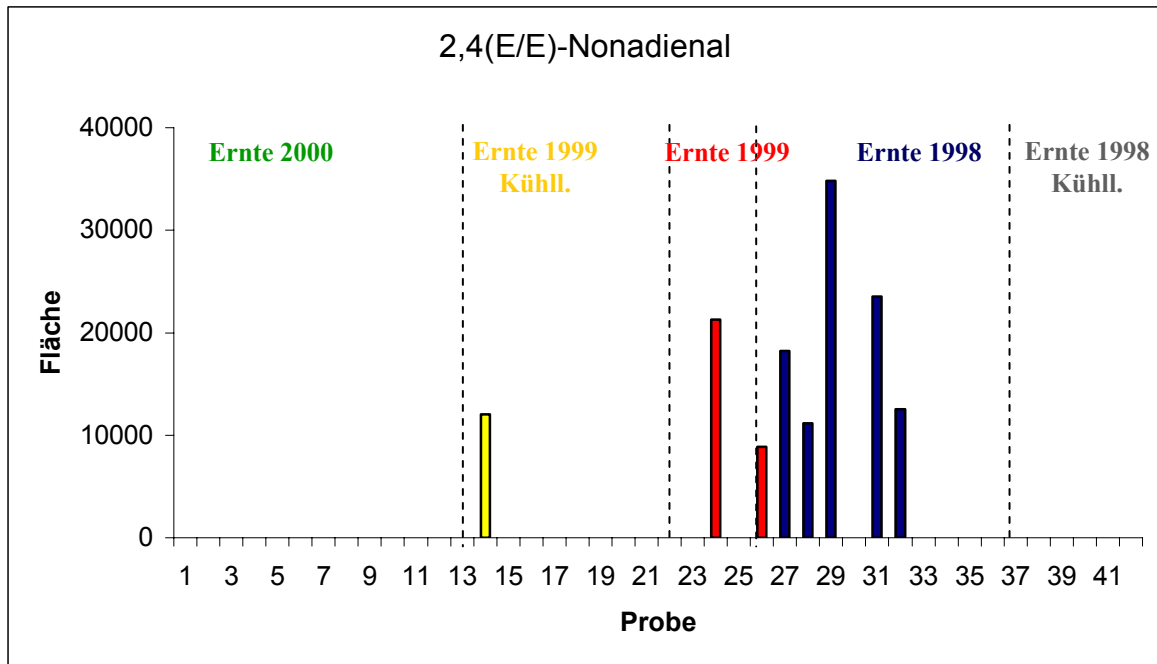
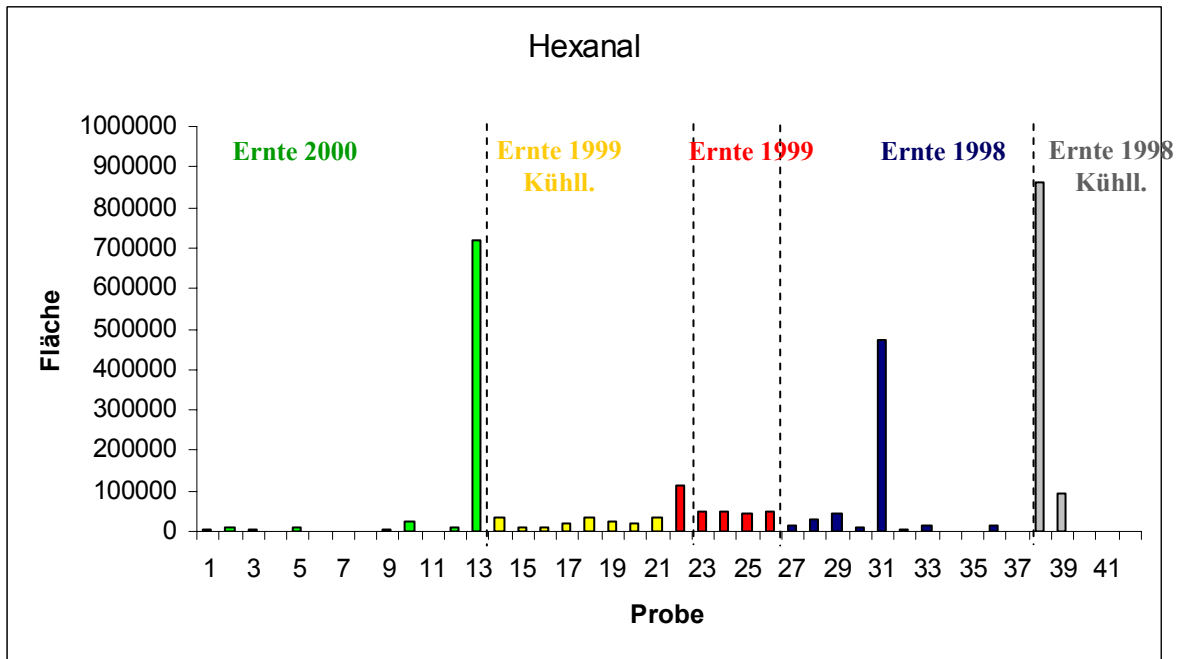
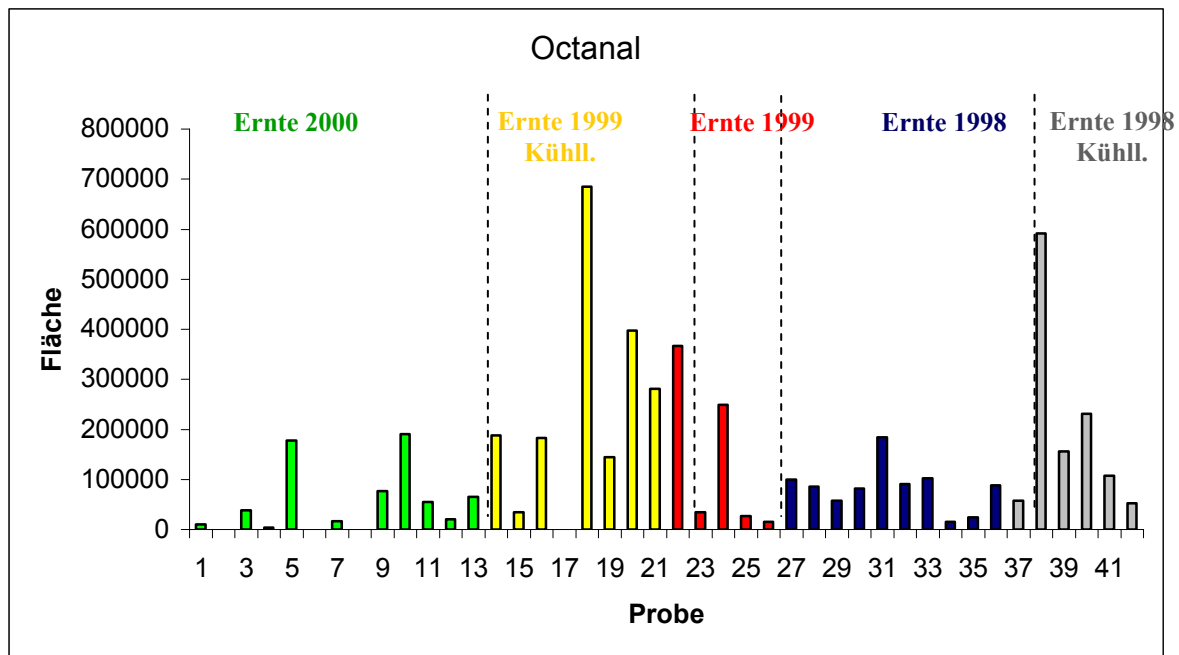


Diagramm 3.12

Konzentrationsunterschiede des Hexanal  
in den Ernten 2000 - 1998 (n, k), Fraktion < 11 mm



**Diagramm 3.13****Konzentrationsunterschiede des Octanal  
in den Ernten 2000 - 1998 (n, k), Fraktion < 11 mm****Diskriminanzanalyse**

Zur Durchführung der Diskriminanzanalyse wurden die unterschiedlichen Lagerbedingungen als Klassifizierungsmerkmal der Gruppenbildung zugrunde gelegt. Als Merkmalsausprägung wurden die Flächenwerte der in Tabelle 3.12 aufgeführten Substanzen eingesetzt. Die Verbindungen  $\alpha$ -Pinen und  $\beta$ -Pinen blieben bei der Diskriminanzanalyse unberücksichtigt. Der Ausschluss erfolgte aufgrund der Mehrdeutigkeit einer Konzentrationszunahme der Verbindungen. Während ein Anstieg der Verbindungen bei gleichzeitiger Abwesenheit von Peroxidationsprodukten eine gute Haselnussqualität anzeigt, wird bei paralleler Konzentrationszunahme der Peroxidationsprodukte eine Verschlechterung der Nussqualitäten angezeigt. Dieser Sachverhalt bleibt bei der Linearkombination der kanonischen Diskriminanzanalyse unberücksichtigt und führt zu einer größeren Streuung der Einzelklassen um den Gruppenmittelpunkt.

Die beiden ersten Funktionen der Diskriminanzanalyse beschreiben 77% der kumulierten Varianz. Die Gruppierung der unterschiedlichen Lagerbedingungen ist im Scatterplot (Abb. 3.11) abgebildet.

Mit einer Kreuzvalidierung wurden 92% der Proben aus der Ernte 2000 korrekt klassifiziert (Tab. 3.13). Die Abgrenzung der Proben voneinander und die zentrale Lage der Gruppenmittelpunkte verdeutlichen, dass eine gute Unterscheidung zwischen den Erntejahren und Lagerbedingungen

möglich ist. Sensorisch nicht wahrnehmbare Qualitätsverluste und die damit verbundenen nicht signifikanten Änderungen der Aromastoffkonzentrationen können mit der Diskriminanzanalyse sicher erkannt werden.

Anzumerken ist, dass bei einer echten, unabhängigen Validierung im Vergleich zur Kreuzvalidierung eine erhöhte Fehlklassifizierung zu erwarten ist. Eine Erhöhung der Probenzahl führt zu einer Verbesserung der Klassifikation.

**Tabelle 3.12 Als Variablen eingesetzte Geruchsverbindungen der Diskriminanzanalyse**

<b>Verbindung (RI RTX-5)</b>
Hexanal (801), Heptanal (906), Octanal (1004), Nonanal (1103), Decanal (1207), Undecanal (1307), Dodecanal (1407), Tridecanal (1507), (E,E)-2,4-Nonadienal (1215), (E/Z)-2,4-Decadienal (1294), (E,E)-2,4-Decadienal (1318), (E)-2-Decenal (1262), (E)-2-Nonenal (1161), (E)-2-Undecenal (1361), $\Delta$ -3-Carene (1022), Camphen (949), 3-Methyl-4-heptanon (923), 2-Undecanon (1294), 1-Octanol (1072), Dodecensäureethylester (1594), Hexansäure (1019), Nonansäure (1319), Pyrrol (750), 1-Methyl-2-pyrrolidinon (1083), Unbekannt (846)

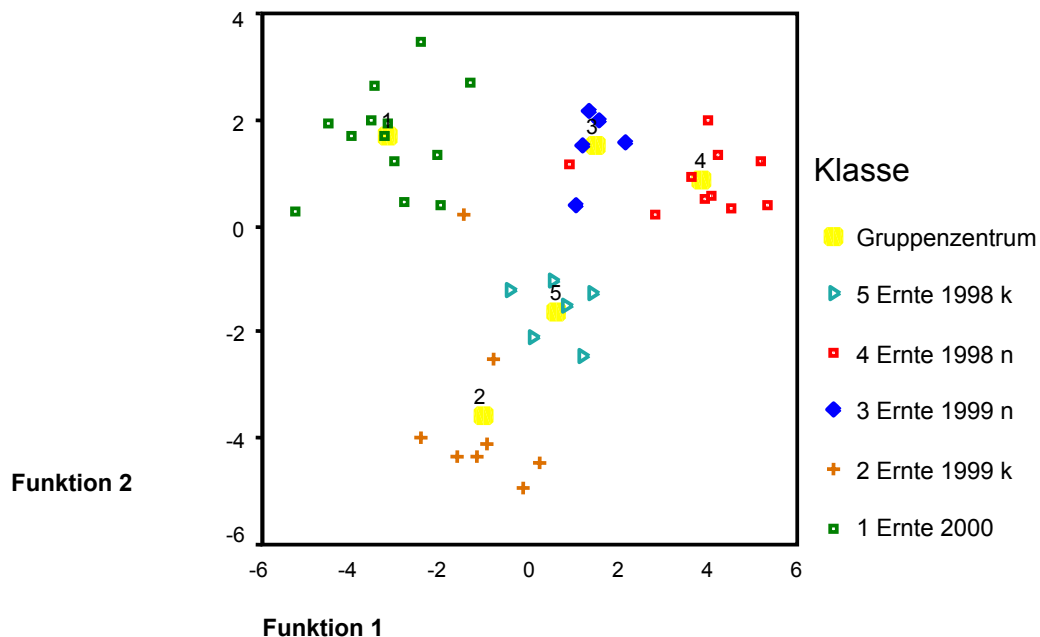
**Tabelle 3.13 Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse**

	KLASSEN	Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit					Gesamt	
		1.00	2.00	3.00	4.00	5.00		
Original	Anzahl	1.00	13	0	0	0	0	13
		2.00	1	7	0	0	0	8
		3.00	0	0	5	0	0	5
		4.00	0	0	0	10	0	10
		5.00	0	0	0	0	6	6
	%	1.00	100.0	.0	.0	.0	.0	100.0
		2.00	12.5	87.5	.0	.0	.0	100.0
		3.00	.0	.0	100.0	.0	.0	100.0
		4.00	.0	.0	.0	100.0	.0	100.0
		5.00	.0	.0	.0	.0	100.0	100.0
Kreuzvalidier <sup>a</sup>	Anzahl	1.00	12	0	1	0	0	13
		2.00	2	3	0	1	2	8
		3.00	0	2	1	2	0	5
		4.00	0	1	1	6	2	10
		5.00	1	1	1	1	2	6
	%	1.00	92.3	.0	7.7	.0	.0	100.0
		2.00	25.0	37.5	.0	12.5	25.0	100.0
		3.00	.0	40.0	20.0	40.0	.0	100.0
		4.00	.0	10.0	10.0	60.0	20.0	100.0
		5.00	16.7	16.7	16.7	16.7	33.3	100.0

a. Die Kreuzvalidierung wird nur für Fälle in dieser Analyse vorgenommen. In der Kreuzvalidierung ist jeder Fall durch die Funktionen klassifiziert, die von allen anderen Fällen außer diesem Fall abgeleitet werden.

Klasse 1: Ernte 2000; Klasse 2: Ernte 1999 k; Klasse 3: Ernte 1999 n; Klasse 4: Ernte 1998 n; Klasse 5: Ernte 1998 k

**Abbildung 3.11 Ergebnis der Diskriminanzanalyse von frischen und unterschiedlich gelagerten rohen Haselnüssen**



Eine zuverlässige Qualitätsbewertung kann bei Stückwaren wie Haselnusskernen erst ab einer Mindestmenge von 200 g Untersuchungsmaterial durchgeführt werden [Vermarktungsnorm der EG Nr. 1284/2002]. Die Voraussetzung zum Einsatz der Methode in der Routineuntersuchung bedingt eine erhebliche Reduzierung des Probenaufkommens, d. h. die Einzelnussanalyse muss durch eine Analyse von Durchschnittsproben aus vereinigten, frisch gepressten Haselnussölen ersetzt werden.

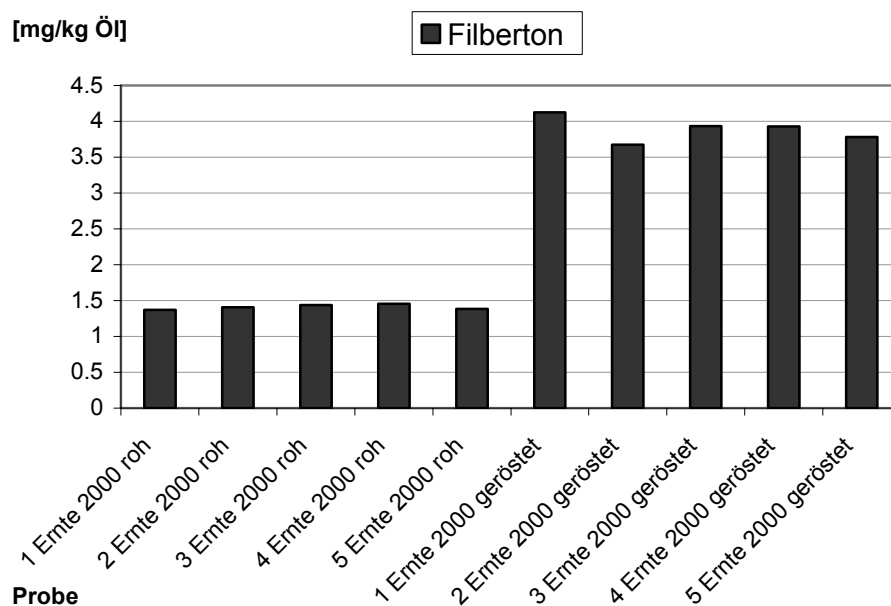
### 3.3.1.4 Qualitätsbewertung von Haselnusskernen über die Korrelation organoleptischer Eigenschaften von Aromastoffen mit quantitativen Daten

Die direkte Korrelation zwischen dem Aromastoffgehalt und der sensorischen Wahrnehmung legt nahe, die organoleptischen Eigenschaften der Aromastoffe bei der Auswertung zu berücksichtigen. In Anlehnung an die von Engen und Pfaffman, 1959 beschriebene Wahrnehmungsfähigkeit des Menschen, in einem komplexen Aromenspektrum nur wenige Geruchseindrücke zu differenzieren, wurden für die sensorisch verkosteten rohen Haselnusskerne der Ernte 2000 (vgl. Tab. 3.10) und Ernte 1998 n (vgl. Tab. 3.11) drei Faktoren für die Attribute ARTEIGEN (Flavour), RANZIG

(Off-Flavour) und ANDERSARTIG (Off-Flavour) gebildet. Die jeweiligen Faktoren setzen sich aus der Summe der Flächenwerte ausgewählter Aromastoffe zusammen:

Als originärer Inhaltstoff repräsentiert das  $\alpha$ -Pinen den Frischezustand der Haselnusskerne und wurde als positiv zu bewertender Aromastoff in dem Faktor ARTEIGEN berücksichtigt. Weitere Terpene blieben aufgrund der nahezu konstanten Flächenverhältnisse zum  $\alpha$ -Pinen unberücksichtigt (vgl. Diagramm 3.7). Komponenten, deren Bildungswege nicht eindeutig auf den Reifungsprozess am Haselnussbaum zurückzuführen sind, wurden trotz z. T. nussartiger Attribute nicht in die Auswertung einbezogen. Zum Beispiel wurde das Filberton, das nach Silberzahn, 1988 aus der Kondensation von 2-Methylbuttersäure und 3-Hydroxybuttersäure sowie aus thermolabilen Vorstufen bei der Röstung gebildet wird, ausgeschlossen. Die bei der Röstung zunehmende Konzentration des Filbertons bestätigt die Annahme, dass die Komponente durch thermische Prozesse und während der Lagerung gebildet wird (Diagramm 3.7 und Diagramm 3.14).

**Diagramm 3.14**      **Konzentration des Filbertons in rohen und gerösteten Haselnusskernen der Ernte 2000**



Im Faktor RANZIG sind die Flächenwerte der Peroxidationsprodukte der homologen Reihen der Alkanale ( $C_6$ - $C_{10}$ ), (E)-2-Alkenale ( $C_6$ - $C_{10}$ ) und (E,E)-2,4-Dienale ( $C_9$ - $C_{10}$ ) sowie das 3-Methyl-4-heptanon kumuliert.

Der Faktor ANDERSARTIG berücksichtigt n-Alkane ( $C_8$ - $C_{10}$ ) und die Flächenwerte der beiden als Amine identifizierten Komponenten (Abb. 3.10).

Werden die Summenflächen der einzelnen Faktoren von ihren konstanten Beiträgen bereinigt, d.h. wird der für die guten Nussqualitäten gemittelte Wert eines Faktors als fester Betrag von den jeweiligen Faktor aller Einzelproben subtrahiert, werden die Differenzen zu schlechten Nussqualitäten maximiert (Tabelle 3.14):

$$\text{Faktor } x^i = \sum_j y_j^i - \bar{z}_j \text{ für alle } i \text{ mit } \bar{z}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n z_j^i \quad (\text{Formel 3.1})$$

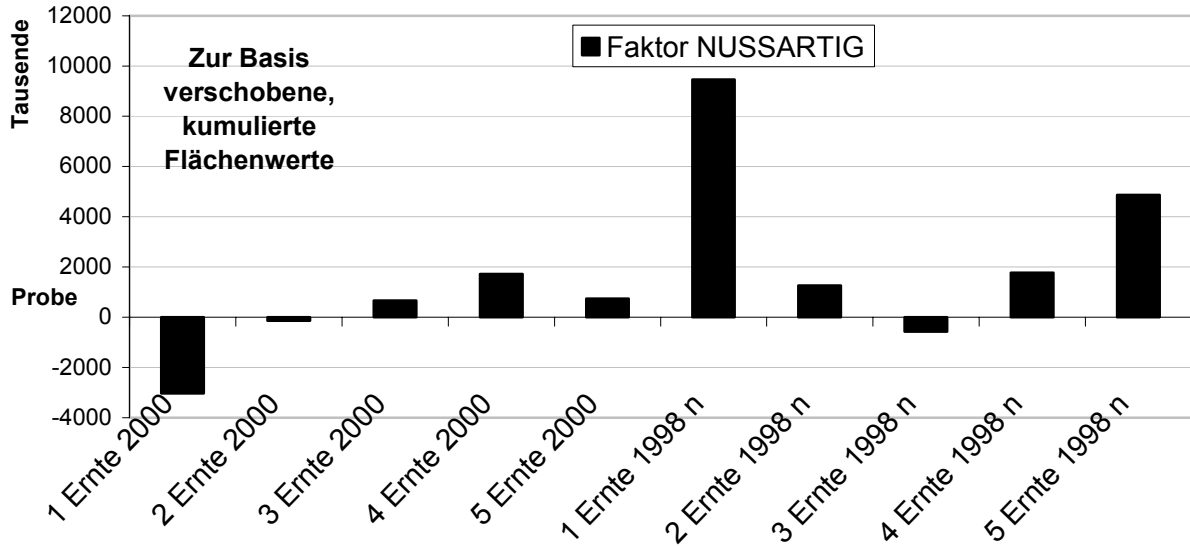
- $y_j^i$  Flächenwert der j-ten Komponente der i-ten Probe  
 $z_j^i$  Flächenwert der j-ten Komponente der i-ten Referenzprobe  
 $\bar{z}_j$  mittlerer Flächenwert der j-ten Komponente der Referenzproben

**Tabelle.3.14 Kumulierte Flächenwerte und Faktoren der Attribute NUSSARTIG, RANZIG und ANDERSARTIG der sensorisch verkosteten Einzelnüsse der Ernte 2000 und Ernte 1998 n**

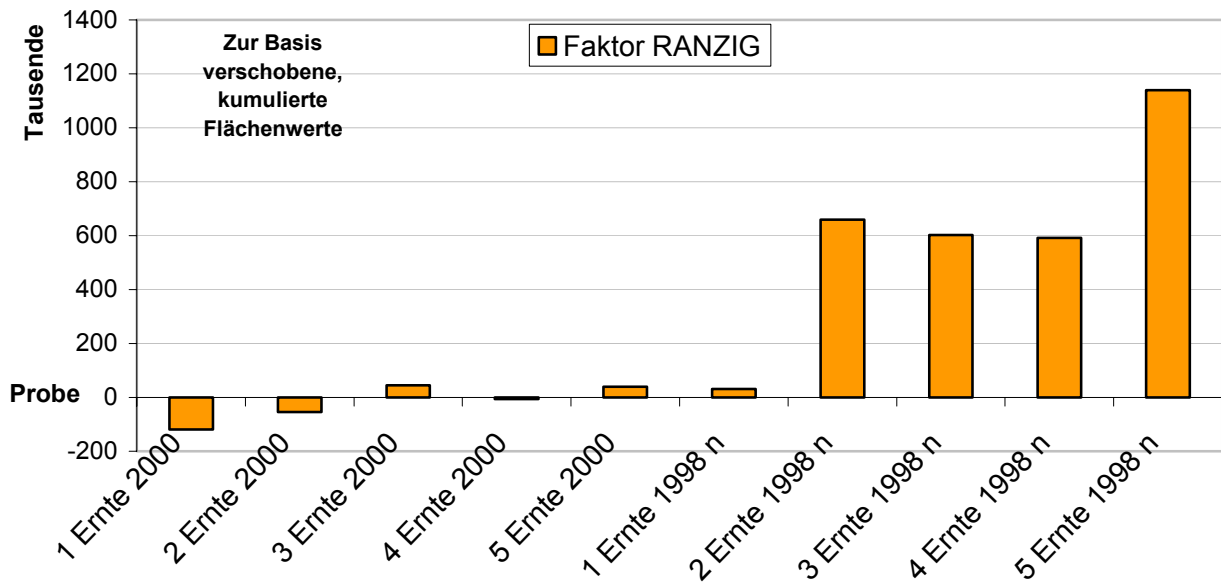
	$\Sigma$ Fläche NUSSARTIG	$\Sigma$ Fläche RANZIG	$\Sigma$ Fläche ANDERS- ARTIG	Faktor NUSSARTIG	Faktor RANZIG	Faktor ANDERS- ARTIG
1 Ernte 2000	626250	17612	1	-3017080	-130806	-49787
2 Ernte 2000	3514900	207357	130624	-128430	58939	80836
3 Ernte 2000	4314900	173709	25037	671570	25291	-24751
4 Ernte 2000	5372100	121155	46455	1728770	-27263	-3333
5 Ernte 2000	4388500	222258	46825	745170	73840	-2963
1 Ernte 1998 n	13122000	367804	217623	9478670	219386	167835
2 Ernte 1998 n	4913000	1157152	377252	1269670	1008734	327464
3 Ernte 1998 n	3075800	897243	169191	-567530	748825	119403
4 Ernte 1998 n	5428800	972770	260528	1785470	824351.8	210740
5 Ernte 1998 n	8514400	1518635	328718	4871070	1370218	278930
Mittelwert Ernte 2000	3643303	148418	49788			

Die Modellrechnungen, basierend auf den Mittelwerten der Faktoren ARTEIGEN, RANZIG und ANDERSARTIG für die Ernte 2000, demonstrieren die Empfindlichkeit, mit der Änderungen in den Haselnussqualitäten bei Durchschnittsproben erfasst werden können (Diagramm 3.15 - Diagramm 3.17). Werden für den Faktor NUSSARTIG Grenzbereiche bzw. für die Faktoren RANZIG und ANDERSARTIG Grenzwerte definiert, kann die Qualität der Ware einfach und effizient kategorisiert werden.

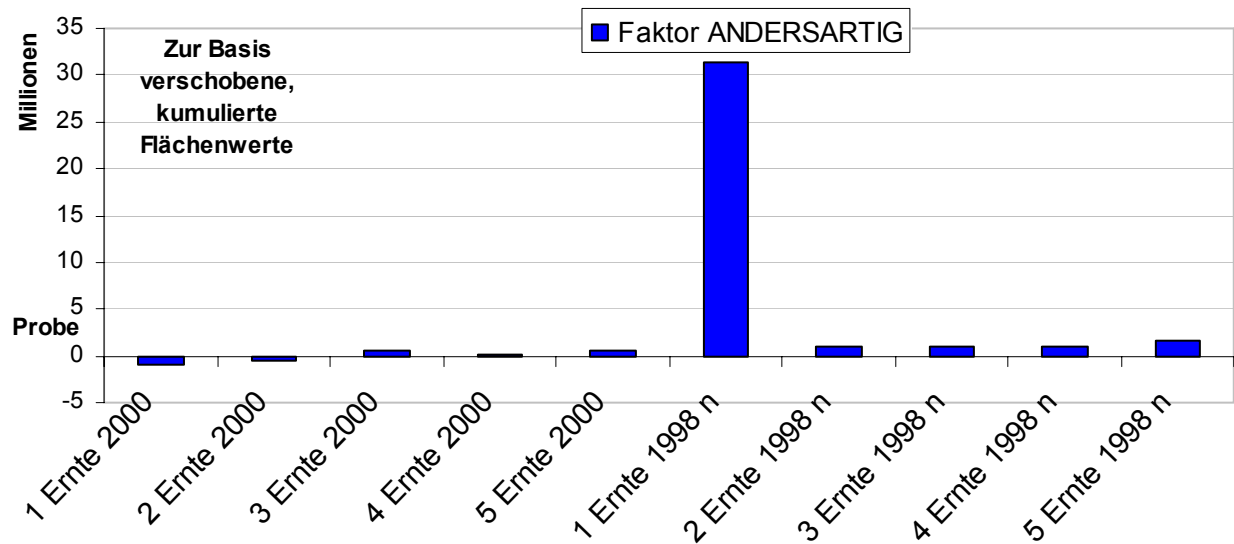
**Diagramm 3.15**      **Qualitätsfaktor NUSSARTIG für sensorisch verkostete Einzelnüsse der Ernte 2000 und Ernte 1998 n (Modellrechnung)**



**Diagramm 3.16**      **Qualitätsfaktor RANZIG für sensorisch verkostete Einzelnüsse der Ernte 2000 und Ernte 1998 n (Modellrechnung)**



**Diagramm 3.17 Qualitätsfaktor ANDERSARTIG für sensorisch verkostete  
Ezelnüsse der Ernte 2000 und Ernte 1998 n (Modellrechnung)**

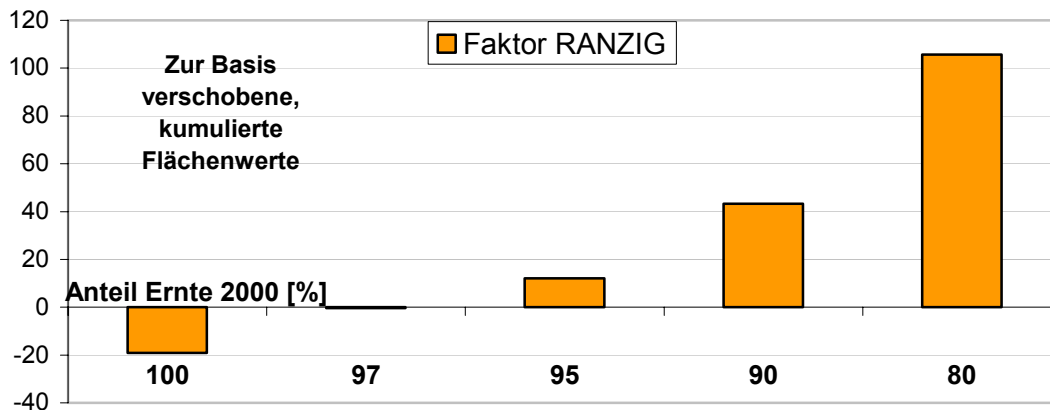


Nach der Vermarktungsnorm der EG Nr. 1284/2002 darf der Anteil ranziger, schimmeliger, fauliger und von Insekten befallener Haselnusskerne nicht mehr als 3 % für die Klassifikation „Extra“ bzw. 5 % für Klasse I sowie 6 % für die Klasse II betragen. In den dargestellten Diagrammen 3.18 und 3.19 wurde für Verschneidungen der Ernte 2000 mit gelagerten Ernten eine Verschiebung der Faktoren zur Basis so gewählt, dass der in der Vermarktungsnorm geforderte Maximalwert von 3 % Anteilen schlechter Nussqualitäten in der Klasse Extra um den Grenzwert Null streut. Diese Festlegung führt zu einem vereinfachten Entscheidungskriterium.

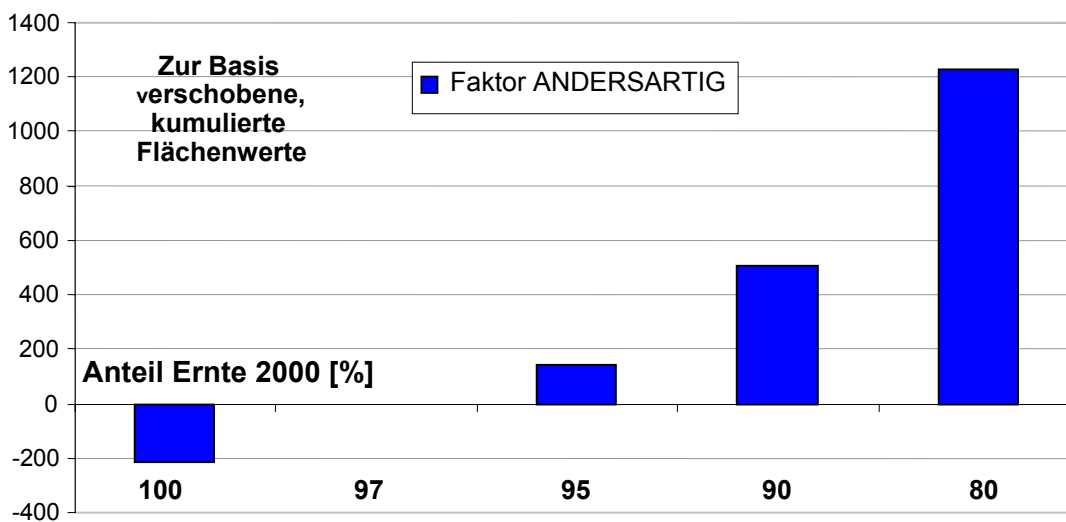
Schäfer, 2002 konnte über den 2-Thiobarbitursäure -Schnelltest (2-TBA Farbreaktion) bei der Untersuchung von jeweils 200 Einzelnüssen (das Probenmaterial der Studie entspricht dem hier vorliegenden Untersuchungsmaterial, vgl. Kapitel 3.1) keine ranzigen Haselnusskerne in der Ernte roh 2000 und Ernte roh 1999 10°C nachweisen. In der bei 10°C gelagerten Ernte 1998 wies er 2%, in der bei RT gelagerten Ernte 4% (Ernte 1999) bzw. 10% (Ernte 1998) ranzige Haselnusskerne nach. D.h., dass die Modellrechnung eine höhere Anforderung erfüllt, als in der Vermarktungsnorm EG Nr. 1284/2002 zur Klassifizierung „Extra“ festgelegt wurde.



**Diagramm 3.18** Qualitätsfaktor RANZIG für Verschneidungen der Ernte 2000 mit der Ernte 1998 n (Modellrechnung)



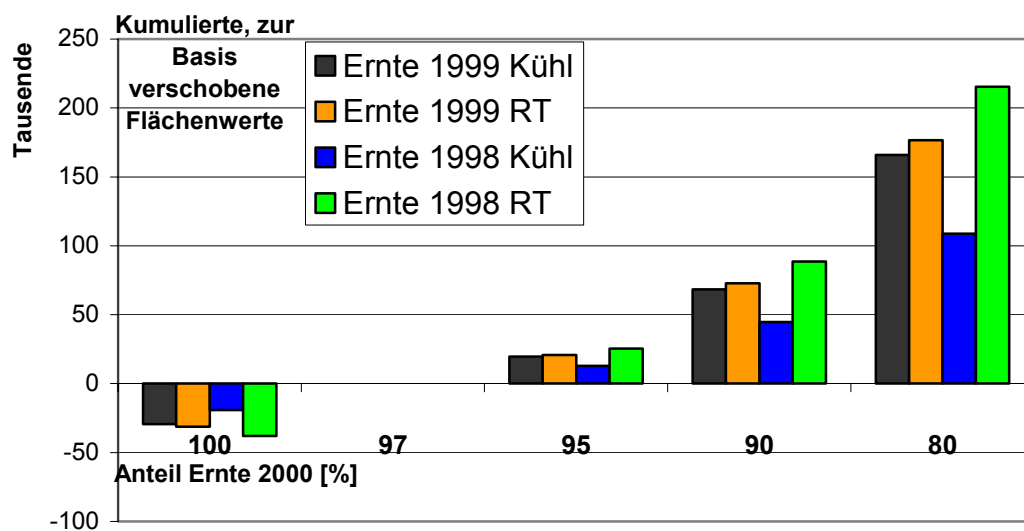
**Diagramm 3.19** Qualitätsfaktor ANDERSARTIG für Verschneidungen der Ernte 2000 mit der Ernte 1998 n (Modellrechnung)



Die Beurteilung der Empfindlichkeit, mit der Verschneidungen frischer Ernten mit gelagerten Ernten nachgewiesen werden können, wurde für die 42 Einzelnussanalysen überprüft. Anhand einer Modellrechnung wurde der gemittelte Faktor RANZIG für die jeweiligen Erntejahre und Lagerbedingungen aus den Flächenwerten der Oxidationsprodukte zur Basis von 97 % Anteilen guter Nussqualitäten bestimmt. In Diagramm 3.20 sind die Erwartungswerte für den Faktor RANZIG bei Verschneidungen von 3-20 % der unterschiedlich gelagerten Ernten mit frischer Ernte abgebildet. Die Klassifizierung der Aromastoffe und Summierung unsignifikanter Abweichungen zwischen

verschiedenen Nussqualitäten führt bereits bei einer Verschneidung der frischen Ernte 2000 mit 3-5 % gelagerter Ernten zu einem signifikanten Anstieg des Faktors RANZIG. Dabei steigt der Faktor RANZIG erwartungsgemäß stärker für die bei RT gelagerten Haselnüsse als für die der gekühlt gelagerten Ware an. Ein geringer Qualitätsabfall von Haselnusskernen wird somit durch eine signifikante Änderung des Faktors RANZIG angezeigt.

**Diagramm 3.20**      **Qualitätsfaktor RANZIG für Verschneidungen der Ernte 2000 mit der Ernte 1999 k, Ernte 1999 n, Ernte 1998 k und Ernte 1998 n (Modellrechnung)**

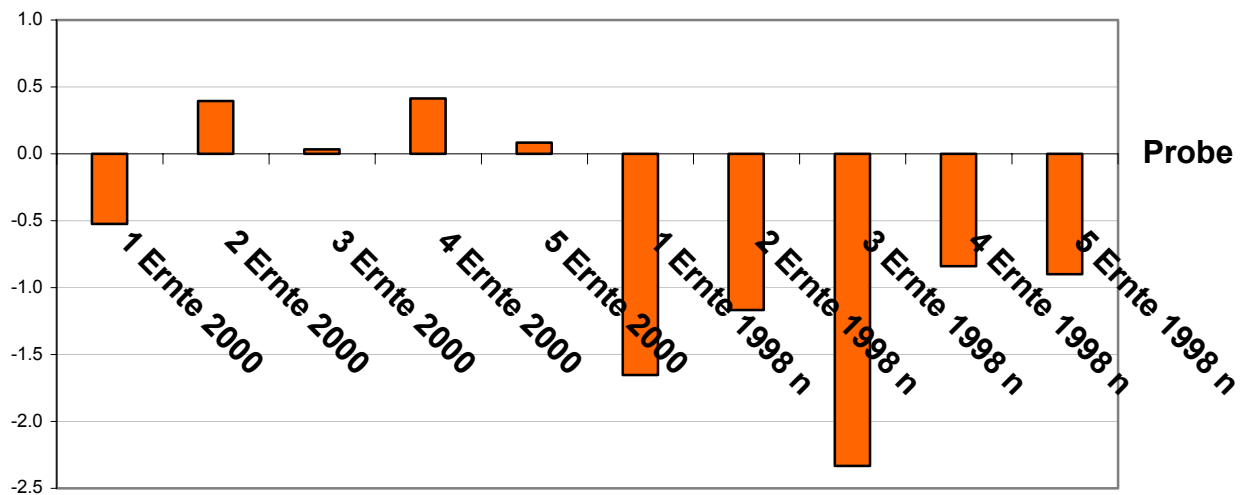


Eine andere Möglichkeit der Auswertung wird durch die Einführung eines inneren Standards (INSTD) gegeben. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Zusammensetzung von Haselnusskernen unterschiedlicher Kultivare geringe Variationen aufweisen [Açkurt et al., 1999; Bonvehí, 1993; Parcerisa et al., 1998; Scherz und Senser, 2000]. Gertz, 2002 konnte zeigen, dass die Aromastoffzusammensetzung von Haselnusskernen keine großen Variationen aufweisen. Der Einsatz originärer Inhaltstoffe als INSTD ist prinzipiell möglich. Insbesondere das  $\alpha$ -Pinen als Monoterpen, das in vergleichsweise hoher Konzentration in Haselnüssen vorkommt, eignet sich zum Einsatz als INSTD. Werden die zwei Faktoren RANZIG und ANDERSARTIG durch Summierung der mit dem INSTD korrigierten Flächenwerte gebildet und von 1 als normierter Faktor ARTEIGEN abgezogen, werden schlechte Nussqualitäten durch negative Werte angezeigt:

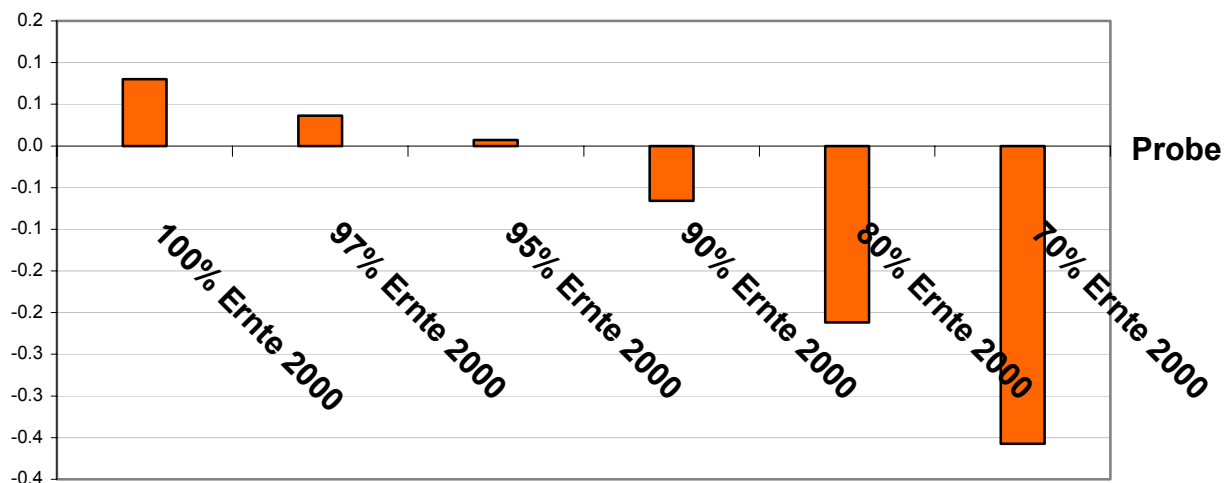
$$\text{Faktor } x_k^i = 1 - \sum_j y_{j,k}^i \quad \text{mit } y_{j,k}^i = y_j^i / y_k^i \quad (\text{Formel 3.2})$$

In Diagramm 3.21 sind die Ergebnisse für die Untersuchungen der zehn sensorisch verkosteten Haselnusskerne der Ernte 2000 und Ernte 1998 n und in Diagramm 3.22 die Modellrechnungen für Mischungen der beiden Ernten abgebildet. Ein wesentlicher Vorteil zu der vorherigen Berechnungsmethode ergibt sich aus der Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen, welche nur noch vom jeweiligen Extraktionsverfahren abhängig sind.

**Diagramm 3.21 Faktor NUSSQUALITÄT über  $\alpha$ -Pinen als interner Standard (Modellrechnung)**



**Diagramm 3.22 Faktor NUSSQUALITÄT über  $\alpha$ -Pinen als interner Standard für Verschneidungen der Ernte 2000 mit der Ernte 1998 n (Modellrechnung)**



Mit den Überlegungen einer Subsummierung sensorischer Eigenschaften durch das Zusammenfassen quantitativer Abweichungen einzelner Aromastoffe ergibt sich die Möglichkeit einer sehr guten Qualitätseinschätzung von Haselnusskernen. Dabei führt die thermische Desorption durch die Bildung von Geruchstoffen zu Veränderungen in den Aromaspektren. Zur Bewertung des Einflusses der thermischen Desorption auf das Aromaspektrum der isolierten Haselnussöle, wurde die DTD/Fast-GC/TOF-MS Methode mit der TCT-HRGC-MS und der schonenden Quantifizierung über Isotopenverdünnungsanalysen (IVA) verglichen.

### **3.3.1.5 Quantitative Bestimmung von Haselnussproben mittels Isotopenverdünnungsanalyse (IVA)**

Die IVA bietet die Möglichkeit der Quantifizierungen von labilen Aromastoffen in Lebensmitteln. Unter Ausnutzung der guten Übereinstimmung physikalischer und chemischer Eigenschaften werden stabile Isotope bei den Bestimmungen als interne Standards (ISTD) eingesetzt. Dabei werden durch die Probenaufarbeitung auftretende Verluste der Zielanalyten kompensiert. Zu beachten ist, dass Anreicherungen durch chemische Prozesse während der Probenaufarbeitung nicht erfasst werden.

Als wichtige Indikatorverbindungen des Verderbs von Haselnusskernen wurden die Aromastoffe [<sup>2</sup>H]-(E,E)-2,4-Nonadienal und [<sup>2</sup>H]-(E,E)-2,4-Decadienal nach der Vorschrift von Lin et al., 1999 und das [<sup>2</sup>H]-3-Methyl-4-heptanon nach der Vorschrift von Reetz und Haning, 1993 zum Einsatz als INSTD synthetisiert (vgl. Kapitel 5.2). Zur Quantifizierung des Hexanals wurde nach Guth, 1993 synthetisiertes [<sup>2</sup>H]-Hexanal verwendet. Filberton wurde mittels [<sup>2</sup>H]-3-Methyl-4-heptanon als internem Standard quantifiziert.

Die Korrekturfaktoren zur Erfassung des Deuterierungsgrades und der Signaldifferenzen des Detektors wurden aus Mischungen der deuterierten und undeuterierten Verbindungen mittels HRGC-MS bestimmt. Das unmarkierte 3-Methyl-4-heptanon war kommerziell nicht erhältlich und wurde durch Oxidation des 3-Methyl-4-heptanols mit Pyridiniumdichromat hergestellt [Becker et. al, 1993] (vgl. Kapitel 5.2).

### **3.3.2 Ergebnisse der Isotopenverdünnungsanalyse**

Die Aromastoffe 3-Methyl-4-heptanon, Hexanal, (E,E)-2,4-Nonadienal und (E,E)-2,4-Decadienal wurden in Ölen aus frisch gepressten Haselnusshälften sensorisch verkosteter Einzelnüsse sowie in Durchschnittsproben aus 1,2-1,5 kg gepressten, rohen Haselnusskernen der Ernte 2000, Ernte 1998 k und Ernte 1998 n quantifiziert.

Für die Pressung von Durchschnittsproben wurde eine hydraulische Presse verwendet, die pro Pressgang Portionen von ca. 100 g Haselnusskernen verarbeitet. Die Öle aus den jeweiligen Ernten wurden gesammelt und vereinigt. Zur Verifizierung der mit dem DTD/Fast-GC/TOF-MS-System ermittelten Ergebnisse (Kapitel 3.3.1) wurden Verschneidungen aus dem Öl der Ernte 2000 mit denen der Ernte 1998 k und Ernte 1998 n hergestellt.

In Tabelle 3.15 und Tabelle 3.16 sind die Ergebnisse der Quantifizierungen für die sensorisch verkosteten rohen Einzelnüsse der Ernte 2000 und Ernte 1998 n zusammengestellt.

Der durchschnittliche Gehalt des Filbertons, 3-Methyl-4-heptanons und des Hexanals stieg für die sensorisch stark abweichenden Haselnusskerne um das 2-3fache im Vergleich zur frischen Ernte 2000. Der höhere Gehalt des 3-Methyl-4-heptanons in der Nuss Nr. 10 der Ernte 1998 n lässt vermuten, dass die mit der DTD/Fast-GC/TOF-MS Analyse als Indikatorverbindung des Verderbs von Haselnusskernen erkannte Komponente, auf mikrobiologischen Verderb zurückzuführen ist (vgl. Kapitel 3.3.1.2 und Tab. 3.16). Die Peroxidationsprodukte (E,E)-2,4-Nonadienal und (E,E)-2,4-Decadienal wiesen in den gelagerten Nüssen die 2 fache Konzentration der Ernte 2000 auf (ausgenommen Nuss Nr. 10 Ernte 1998 n).

**Tabelle 3.15** Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$  Öl] ausgewählter Aromastoffe in sensorisch verkosteten Haselnusskernen der Ernte 2000, Fraktion 11-13 mm  $\varnothing$

	Nuss Nr. 1 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]	Nuss Nr. 2 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]	Nuss Nr. 3 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]	Nuss Nr. 4 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]
Sensorik	normal, arteigen	normal, arteigen	normal, arteigen	normal, arteigen
(E,E)-2,4-Nonadienal	3,7	3,3	2,3	2,3
(E,E)-2,4-Decadienal	5,5	4,3	4,9	3,0
3-Methyl-4-heptanon	178	203	164	148
Filberton	297	354	287	261
Hexanal	34	39	58	29

**Tabelle 3.16** Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$  Öl] ausgewählter Aromastoffe in sensorisch verkosteten Einzelnüssen der Ernte 1998 n, Fraktion 11-13 mm  $\varnothing$

	Nuss Nr. 5 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]	Nuss Nr. 6 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]	Nuss Nr. 7 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]	Nuss Nr. 8 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]	Nuss Nr. 9 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]	Nuss Nr. 10 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]
Sensorik	abweichend	abweichend, ranzig	stark abweichend, ranzig	stark abweichend, ranzig	stark abweichend	trockenes Mycel in der Kernhöhle
(E,E)-2,4-Nonadienal	8,9	1,9	9,8	16	7,0	73
(E,E)-2,4-Decadienal	9,1	5,5	7,9	19	16	145
3-Methyl-4-heptanon	137	121	326	490	296	569
Filberton	667	287	803	1845	495	891
Hexanal	106	175	153	186	85	42

Die Quantifizierungsergebnisse der Durchschnittsproben für die Ernte 2000, Ernte 1998 n und Ernte 1998 k sind in Tabelle 3.17 dargestellt. Der höhere Hexanal-Gehalt der Ernte 2000 (Durchschnittsprobe) im Vergleich zu den Ergebnissen der Einzelnussanalysen ist vermutlich auf eine Enzymreaktion bzw. Lipidoxidation während des Pressvorganges zurückzuführen. Im Vergleich zur Einzelnussanalytik, führen die gemittelten Qualitätsunterschiede der Einzelnüsse in der Durchschnittsprobe zu geringeren Gehalten an (E,E)-2,4-Nonadienal und (E,E)-2,4-Decadienal.

**Tabelle 3.17**      **Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$  Öl] ausgewählter Aromastoffe in Durchschnittsproben aus 1,2-1,5 kg Haselnusskernen der Ernte 2000, Ernte 1998 k und Ernte 1998 n, Fraktion 11-13 mm  $\varnothing$**

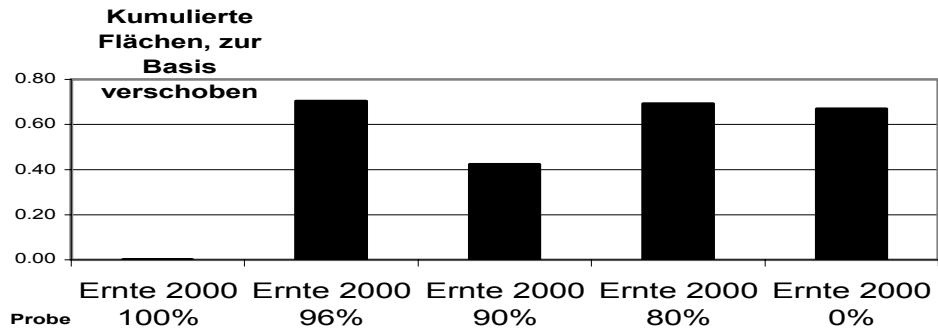
	Ernte 2000 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]	Ernte 1998 n [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]	Ernte 1998 k [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Öl]
(E,E)-2,4-Nonadienal	0,9	13	19
(E,E)-2,4-Decadienal	7,3	12	12
3-Methyl-4-heptanon	212	311	521
Filberton	281	448	990
Hexanal	71,2	133	129

### 3.3.3 Vergleich der TCT-HRGC-MS mit der DTD/Fast-GC/TOF-MS

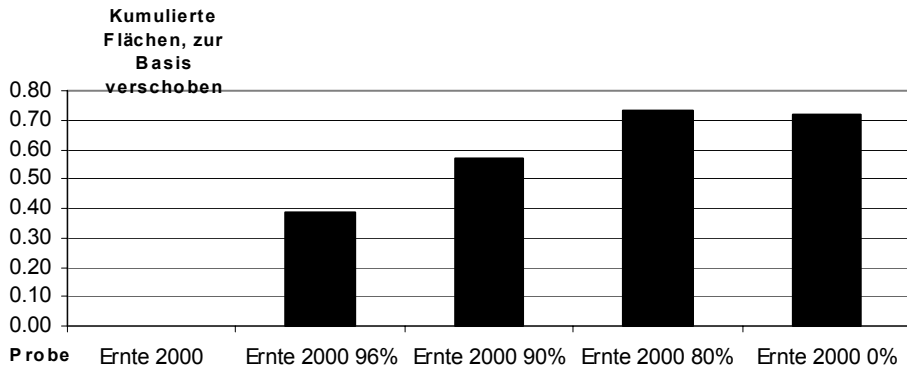
Zur Überprüfung des in Kapitel 3.3.1.4 beschriebenen Verfahrens zum Nachweis von Verschneidungen frischer Ernten mit gelagerten Ernten wurden Mischungen aus dem Öl der Ernte 2000 mit den Ölen der Ernte 1998 n und der Ernte 1998 k (4-20%) hergestellt. Beispielhaft wurde der Faktor RANZIG für die einzelnen Mischungen mit den Verbindungen der Alkanale ( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{10}$ ), (E)-2-Heptenal, (E,E)-2,4-Dienale ( $\text{C}_9$ - $\text{C}_{10}$ ), Essigsäure und 3-Methyl-4-heptanon in Anlehnung an die beschriebene Bildung der kumulierten Flächenwerte bestimmt (Diagramm 3.23 und Diagramm 3.24).

Bei der Bildung des Faktors NUSSQUALITÄT wurde das  $\alpha$ -Pinen als INSTD eingesetzt und der kumulierte Quotient des Faktors RANZIG vom Quotienten des  $\alpha$ -Pinen abgezogen (Diagramm 3.25 und Diagramm 3.26).

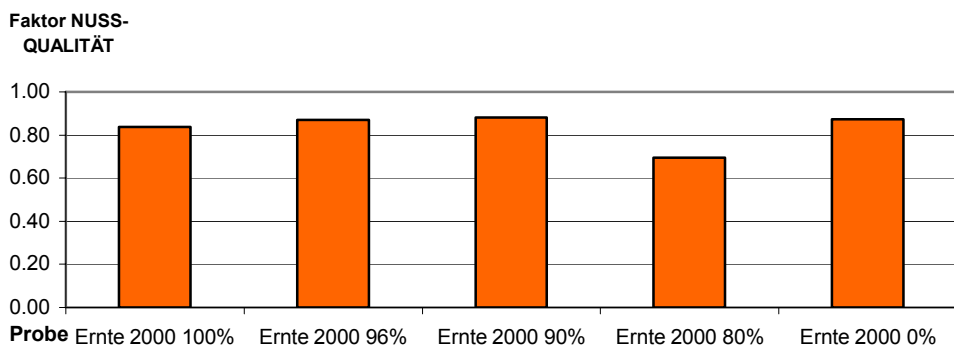
**Diagramm 3.23**      **Qualitätsfaktor RANZIG für Verschneidungen der Ernte 2000 mit der Ernte 1998 k**



**Diagramm 3.24**      **Qualitätsfaktor RANZIG für Verschneidungen der Ernte 2000 mit der Ernte 1998 n**

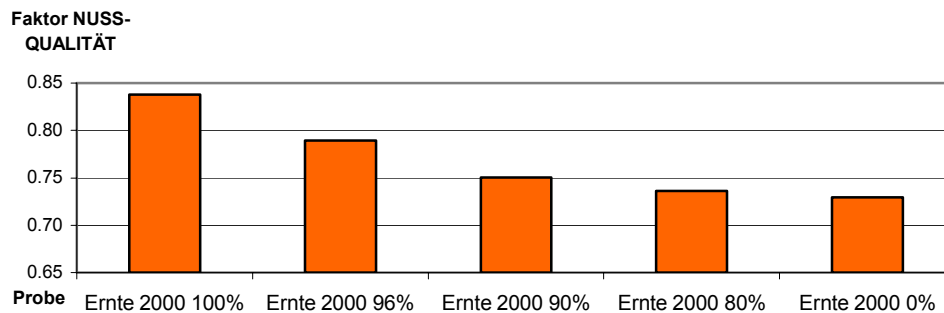


**Diagramm 3.25**      **Faktor NUSSQUALITÄT über  $\alpha$ -Pinen als INSTD für Verschneidungen der Ernte 2000 mit der Ernte 1998 k**





**Diagramm 3.26 Faktor NUSSQUALITÄT über  $\alpha$ -Pinen als INSTD für Verschneidungen der Ernte 2000 mit der Ernte 1998 n**



Auffällig sind die annähernd gleich hohen Faktoren RANZIG (Diagramm 3.23) bzw. NUSSQUALITÄT (Diagramm 3.25) der mit 4%, 10% und 20% der Ernte 1998 k verschnittenen Ernte 2000 sowie der unverschnittenen Ernte 1998 k. Im Gegensatz zu den Verschneidungen mit der kühl gelagerten Ernte konnten bei den Verschneidungen mit der normal gelagerten Ernte leichte Anstiege der Faktoren RANZIG (Diagramm 3.24) bzw. Abnahmen der Faktoren NUSSQUALITÄT (Diagramm 3.26) nachgewiesen werden. Nach den in Kapitel 3.3.1.4 postulierten Ergebnissen wäre ein deutlich signifikanter Anstieg der Faktoren RANZIG bzw. eine signifikante Abnahme der Faktoren NUSSQUALITÄT mit dem prozentualen Anstieg der Ernte 1998 k bzw. 1998 n zu erwarten.

Wie bereits bei den Untersuchungen mit dem DTD/Fast-GC/TOF-MSD System festgestellt wurde, führt eine verlängerte Standzeit zu Veränderungen im Aromenspektrum (vgl. Abb. 3.8 Kapitel 3.3.1.1). Die zeitaufwendigere Durchführung der Pressung und Probenvorbereitung sowie die verlängerten Standzeiten der einzelnen Proben bis zur Analyse, einschließlich einer Tiefkühlphase, lassen auf Veränderungen in den Aromaspektren durch enzymatische und peroxidative Prozesse schließen. Ferner entfallen aufgrund der milden Extraktionstemperatur der TCT-Desorption die durch die DTD-Extraktion induzierten peroxidativen Prozesse bereits geschädigter Öle und somit die Signalverstärkung schlechter Nussqualitäten. Wie sich jedoch zeigte, konnte eine Wiederholung der Messungen mit programmierter Injektortemperatur nicht durchgeführt werden, da die Ansprechzeiten des Heizblockes nicht den Anforderungen der Desorption genügen. Eine Desorption bei erhöhten Injektortemperaturen ohne Programmierung führte aufgrund der manuellen Installation des Glasliners zu nicht reproduzierbaren Messergebnissen.

### 3.3.4 Diskussion

Insgesamt wurden niedrigere Konzentrationen für die Aromastoffe mit der IVA als mit der DTD/Fast-GC/TOF-MS Analyse ermittelt. So liegen die Konzentrationen des Filbertons mit durchschnittlich 0,3 mg/kg Öl unter denen mit der DTD-Analyse gefundenen Konzentrationen von ca. 1 mg/kg Öl. Der Anstieg ist auf die thermische Belastung des Öles während der Desorptionsphase der DTD-Analyse zurückzuführen. Pfner et al., 1999 fand in kommerziell erhältlichen Haselnussölen aus ungerösteten Kernen für das Filberton 6,4 µg/kg Öl (bzw. 1,2 µg/kg Öl für selbst hergestelltes Öl) und 315,8 µg/kg Öl für geröstete Kerne mittels IVA und Hochvakuum-Destillation. Silberzahn, 1988 quantifizierte Filberton über eine Likens und Nickerson-Destillation mit anschließender Säulenchromatographie und fand in rohen Haselnusskernen frischer Ernten 1,0 mg/kg und in gerösteten Kernen 1,9 mg/kg. Über die Steam Distillation-Solven Extraction (SDE) und Supercritical Fluid Extraction (SFE) quantifizierte Blanch et al., 1998 mit 25-30 mg/l Öl die höchsten Werte für kommerzielle Haselnussöle (nicht spezifiziert).

Das 3-Methyl-4-heptanon wurde von Silberzahn, 1988 mit 0,1 mg/kg in rohen Haselnusskernen quantifiziert. Dieser Gehalt wurde für stark beschädigte Haselnusskerne mit der IVA bestätigt. Bei einwandfreien Haselnusskernen wurde nur das 0,25 bis 0,5 fache der Konzentration nachgewiesen.

Die geringeren Werte der Peroxidationsprodukte Hexanal, (E,E)-2,4-Nonadienal und (E,E)-2,4-Decadienal der TCT-Analyse lassen sich ebenfalls auf das Extraktionsverfahren zurückführen. Schäfer, 2002 quantifizierte Hexanal mittels SPME-GC-FID Analysen in einwandfreien Haselnusskernen mit einem durchschnittlichen Gehalt von 0,3 mg/kg und in ranziger Ware mit einem Gehalt von >2,0 mg/kg. Ziegler und Rieblinger, 1999 quantifizierten über Headspace-GC-MS Analysen für rohe, frische Haselnusskerne 0,2 mg/kg Hexanal, in gerösteten und extrem ranzigen Haselnusskernen 15 mg/kg Hexanal, während sie in gerösteten und sensorisch einwandfreien Haselnusskernen kein Hexanal nachwiesen. Kinderlerer und Johnson, 1992 ermittelten mit der Likens und Nickerson-Destillation Konzentrationen von 1 mg/kg Hexanal für frische Haselnusskerne und 5,5 mg/kg für Kerne nach 2 Jahren Lagerung bei RT.

Unter Berücksichtigung der angewandten Extraktionsverfahren und der damit z. T. verbundenen thermischen Belastung der Probenmaterialien, bestätigen die in der Literatur beschriebenen Konzentrationen ausgewählter Geruchstoffe von Haselnusskernen, die ermittelten Gehalte der TCT/GC/MSD-Analyse.

Insgesamt belegen die Ergebnisse aus den TCT/GC/MSD-Untersuchungen der Einzelnusskerne und Ölmischungen die gefundenen Ergebnisse der DTD/Fast-GC/TOF-MS-Analyse. Es zeigte sich, dass ein schneller Pressvorgang der Haselnusskerne und eine direkt an die Pressung anschließende Untersuchung, die thermische Induktion peroxidativer Prozesse bei der Desorption reduzieren bzw. verhindern.

Während die Säurezahl (SZ), die Peroxidzahl (POZ) oder der Glyceringehalt erst bei starken Abweichungen der Haselnusskerne signifikant ansteigen und mithin Qualitätsminderungen einer frischen Ware nur bei Vermischungen mit extrem abweichenden Haselnusskernen nachgewiesen werden können [Züricher und Hadorn, 1975; Sturm, 1979; Schäfer 2003], werden mit der beschriebenen Methode bereits geringfügige, nicht signifikante Änderungen in den Haselnussqualitäten sehr sensitiv erfasst (Kapitel 3.3.1.2).

Mit der Auswertung über die Faktoren NUSSARTIG, RANZIG und ANDERSARTIG werden die wesentlichen sensorischen Eigenschaften von Haselnusskernen beschrieben, wodurch eine erschöpfende Bewertung der Nussqualitäten ermöglicht wird. Verschneidungen frischer Haselnusskerne mit minderen Qualitäten können bis zu ca. 5% sicher nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.3.1.4). Darüber hinaus zeichnet sich die Methode durch eine flexible Anpassungsmöglichkeit der Qualitätskriterien an die jeweiligen Bedürfnisse des Anwenders aus. Der Vorteil einer Bewertung der Haselnussqualität mit dem dimensionslosen Faktor NUSSQUALITÄT ergibt sich aus der praktischen Größenordnung des Faktors und der nahezu systemunabhängigen Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen.

Als weiterer wichtiger Grund für die hohe Empfindlichkeit der Methode ist die nach Pfannkoch, 2000 im Vergleich zur statischen Headspace und SPME-Methode um die 100-500fache bzw. 50-100fache größere Ausbeute der DTD-Injektion (modifiziertes Injektionssystem) zu nennen [Pillonel, 2002].

### **3.4 Aromavorstufen in Haselnusskernen**

Aufgrund der direkten Korrelation zwischen der sensorischen Bewertung und der Zusammensetzung der Aromaspektren kann die Qualität von Haselnusskernen sehr gut bewertet werden (Kapitel 3.3). Die Ursache des Qualitätsabfalls kann jedoch nur teilweise aus den Ergebnissen abgeleitet werden.

Die Identifizierung von Aromavorläufern soll zur Klärung der Ursache des oxidativen Verderbs der Haselnüsse beitragen.

Hydroperoxyfettsäuren, die aus einer Peroxidation von Fettsäuren hervorgehen, beeinflussen als Vorstufen von Fehl aromastoffen maßgeblich die Haltbarkeit und Aromazusammensetzung lipidhaltiger Lebensmittel. Dabei nimmt die Art der Peroxidation einen entscheidenden Einfluss auf das Hydroperoxyfettsäurespektrum. So ergibt die enzymatische Peroxidation ein anderes Spektrum als die Autoxidation oder Photooxygenierung bei gleicher Lipidmatrix [Belitz et al., 2001].

Zunächst wurden die Isomerengemische der Hydroperoxyfettsäuren von Durchschnittsproben aus Haselnusskernen unterschiedlicher Erntejahre und Lagerbedingungen mit der Reversed-Phase Flüssigchromatographie (RP-HPLC) untersucht [Melchior, 2001; Melchior und Gäb, 2002]. Eine weitere Auftrennung der Isomerengemische wurde mit der Kapillarelektrophorese (CE) durchgeführt [Schmitz und Gäb, 1997; Schmitz et. al, 1998; Heitkamp, 1999].

#### **3.4.1 Hydroperoxydbestimmungen mittels HPLC**

Die Bestimmung der Fettsäurehydroperoxide erfolgte nach dem Vermahlen der Haselnüsse, der Fettextraktion mit Lösungsmittel und anschließender enzymatischer Hydrolyse der Triglyceride mittels Pankreaslipase durch RP-HPLC nach der von Melchior, 2001 beschriebenen Vorschrift. Als Detektoren kamen der Ultraviolett (UV)-Detektor sowie ein Chemolumineszenzdetektor zum Einsatz. Durch eine Post-Derivatisierung mittels einer Mikroperoxidase-Reaktion können die Hydroperoxid-Verbindungen über die Luminol-Reaktion durch Chemolumineszenz-Detektion sehr empfindlich nachgewiesen werden [Boddenberg, 1998]. Die Methodik wurde im Hinblick auf die eingesetzte Probenmenge, die Inkubation mit den Enzymen, die Zusammensetzung des Detektionsreagenzes (Luminol im Vergleich zu Isoluminol) und die Variation des Methanol-Anteils optimiert. Die Referenzverbindungen wurden durch Photooxygenierung der entsprechenden Fettsäuren nach der Methode von Schmitz, 1997 hergestellt (vgl. Kapitel 5.3).

### 3.4.1.1 Ergebnisse der Hydroperoxydbestimmung mittels HPLC

Optimierungsversuche ergaben, dass bei einer Einwaage von 3 mg/ml Öl nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 37 °C die enzymatische Hydrolyse der Triacylglyceride durch eine Pankreaslipase vollständig erfolgte. Die Überprüfung fand mit einem Linolensäuretriacylglycerid-Standard statt. Der Methanol-Anteil im Detektionsreagenz wurde optimiert und auf 30 % eingestellt.

Ein Vergleich der Chemolumineszenz-Detektion gegenüber einer UV-Detektion zeigte für die Hydroperoxide eine um den Faktor 12 höhere Nachweisempfindlichkeit der Chemolumineszenz-Methode.

Die Identifizierung der Fettsäurehydroperoxide erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen der Referenzverbindungen an der HPLC-Phase sowie durch Dotierungen der Probe mit den Standardverbindungen. Eine Reduktion der in den Haselnussproben anwesenden Hydroperoxide mit NaBH<sub>4</sub> zu den entsprechenden Hydroxyfettsäuren und anschließender HPLC-Trennung mit UV-Detektion bestätigten die oben beschriebenen Identifizierungsexperimente auf das Vorhandensein der entsprechenden Fettsäurehydroperoxide der Öl- bzw. Linolsäure.

Die Konzentrationen der Hydroperoxide wurden über eine Kalibrierung des Systems mit Standard-Lösung als Doppelbestimmung aus den Ergebnissen der Chemolumineszenz ermittelt (Tab. 3.19). Die Bestimmung der Nachweisgrenze (NWG), der Erfassungsgrenze (EG) und der Bestimmungsgrenze (BG) erfolgte nach DIN 32645, modifiziert (Tab. 3.18).

**Tabelle 3.18 Kalibrierung der Hydroperoxide**

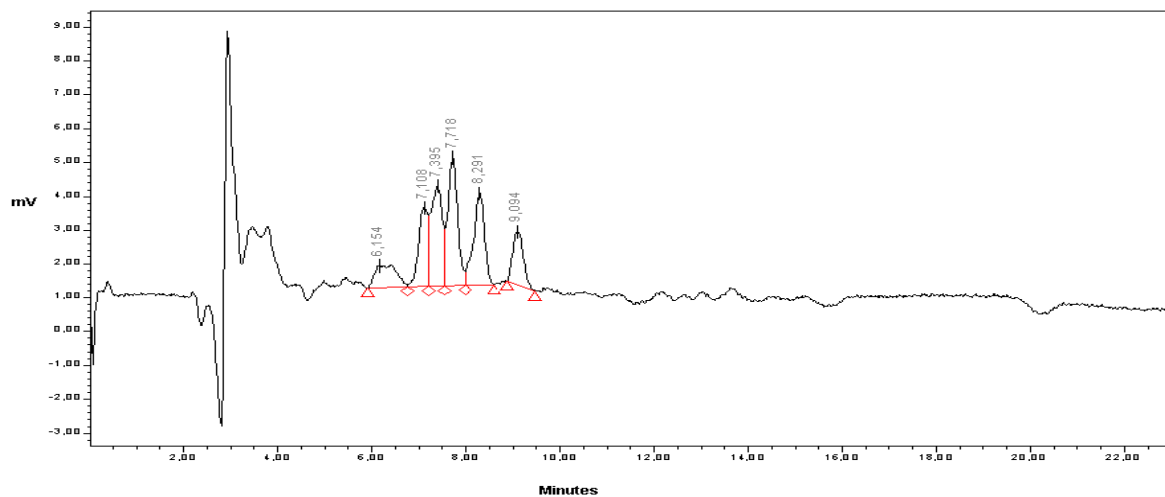
	<b>NG (einseitiger Prognosebereich, 99 % Wahrsch.)</b>	<b>EG (einseitiger Prognosebereich, 99 % Wahrsch.)</b>	<b>BG (zweiseitiger Prognosebereich, 99 % Wahrsch.)</b>
Kalibrierung HPOE $y = 36196x - 25387$ $R = 0,9998$	7,9 µM bzw. 8,3 µg/100 mg Öl	15,9 µM bzw. 16,7 µg/100 mg Öl	32,5 µM bzw. 34,2 µg/100 mg Öl
Kalibrierung HPODE $y = 34472x + 3796$ $R = 0,9999$	3,3 µM bzw. 3,5 µg/100 mg Öl	6,6 µM bzw. 7,0 µg/100 mg Öl	13,8 µM bzw. 14,6 µg/100 mg Öl
Kalibrierung HPOTE $y = 51993x + 60053$ $R = 0,9991$	20,2 µM bzw. 21,2 µg/100 mg Öl	40,4 µM bzw. 42,4 µg/100 mg Öl	88,6 µM bzw. 93,0 µg/100 mg Öl

Exemplarisch ist ein HPLC-Chromatogramm der Ernte 2000 im Chemolumineszenz-Modus gezeigt (Abb. 3.12). Eindeutig ließen sich Hydroperoxide der Ölsäure (HPOE) und Linolsäure (HPODE) zuordnen. Hydroperoxide der Linolensäure (HPOTE, Nachweisgrenze 21,2 µg/100 mg Öl; Tab. 3.18)

wurden in den Proben nicht gefunden. Im Chromatogramm finden sich weitere Substanzen, welche nicht identifiziert wurden.

Die Ergebnisse der Identifizierungs- und Quantifizierungsexperimente von Hydroperoxiden, welche aus der Öl- bzw. aus der Linolsäure der untersuchten Haselnussproben hervorgegangen sind, sind in Tabelle 3.19 zusammengefasst. Die in der Tabelle angegebenen Werte sind in Diagramm 3.27 graphisch dargestellt.

**Abbildung 3.12 HPLC-Chromatogramm der Ernte 2000 im Chemolumineszenz-Modus (9.094 min, HPOE; 7.718 min, HPODE)**

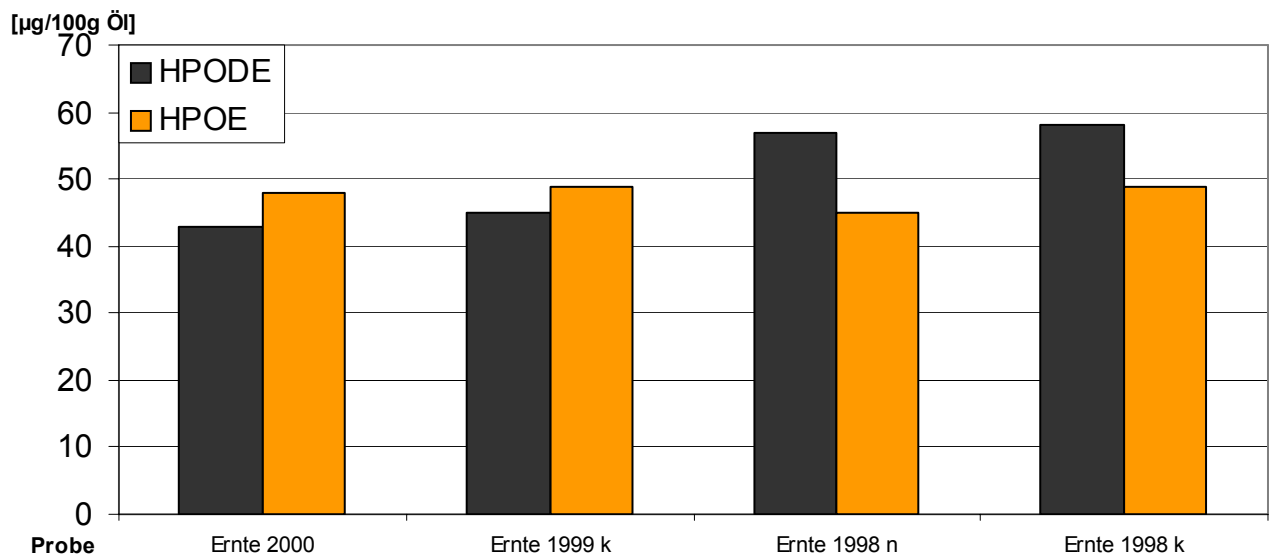


**Tabelle 3.19 Konzentrationen von Öl (HPOE)- und Linolsäurehydroperoxide (HPODE) in Haselnussproben**

Probenbezeichnung	HPODE (µg/100 mg Öl)	HPOE (µg/100 mg Öl)	HPODE (mg/100 g Haselnüsse)	HPOE (mg/100 g Haselnüsse)
Ernte 2000	43	48	27	30
Ernte 1999 k	45	49	30	32
Ernte 1998 n	57	45	37	29
Ernte 1998 k	58	49	38	32

Die höchsten Gehalte an Linolsäurehydroperoxiden (HPODE) wurden in der Ernte 1998 k mit 58 µg/100 mg Öl bzw. 38 mg/100 g Haselnüsse ermittelt, gefolgt von der Ernte 1999 n mit 57 µg/100 mg Öl bzw. 37 mg/100 g Haselnüsse. Die Ernte 2000 zeigte Gehalte von 43 µg HPODE/100 mg Öl. Die Konzentrationen an Ölsäurehydroperoxiden (HPOE) lagen in einem Bereich von 45 µg HPOE/100 mg Öl bis 49 µg HPOE/100 mg Öl.

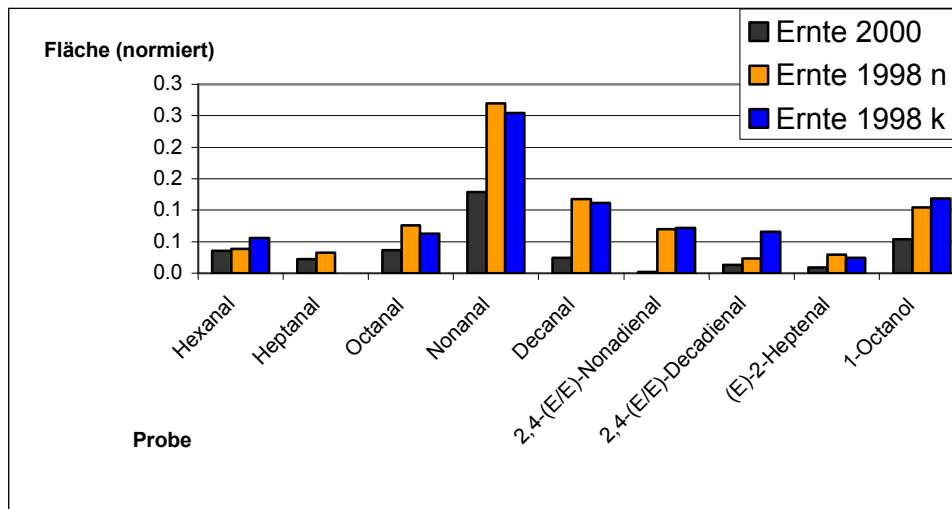
**Diagramm 3.27**                      **Graphische Auftragung von Öl (HPOE)- und Linolsäurehydroperoxide (HPODE) in Haselnussproben**



Eine Vergleich der Ergebnisse mit den in Kapitel 3.3.1.2. ermittelten Gehalten sekundärer Peroxidationsprodukte korrespondierender Durchschnittsproben bestätigt, dass trotz der geringeren relativen Oxidationsgeschwindigkeit der Ölsäure [Belitz et al., 2001] die Bildung der in Diagramm 3.28 dargestellten Verbindungen auf die Peroxidation der Öl- und Linolsäure zurückzuführen sind. So leitet sich der in Kapitel 3.2 als aromarelevant erkannte und in Kapitel 3.3 nachgewiesene Aldehyd Octanal in erster Linie von der Peroxidation der Ölsäure ab, welche mit ca. 80 %, bezogen auf den Gesamtfettgehalt, den Hauptanteil der Fettsäuren ausmacht (vgl. Tab. 6.5 und Tab. 6.6). Die beiden im Weiteren als wichtige Indikatorverbindungen des Haselnussverderbs identifizierten Aldehyde (E,E)-2,4-Nonadienal und (E,E)-2,4-Decadienal können auf die mit durchschnittlich 12 % enthaltene Linolsäure zurückgeführt werden.

Die Hydroperoxide der Linolensäure wurden nicht nachgewiesen. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen des IVV, welche in Tab. 6.6 aufgeführt sind. Die Linolsäure lag im Produkt unterhalb der Nachweisgrenze.

**Diagramm 3.28** Flächenwerte der mit der TCT-Methode untersuchten Aromastoffe der Durchschnittsproben Ernte 2000 und Ernte 1998 n/k



Signifikante Unterschiede in den Konzentrationen der Hydroperoxide wurden nicht festgestellt. Insgesamt wurde ein leichter Anstieg der Linolsäurehydroperoxide bei der Lagerung der Haselnusskerne beobachtet (Ernte 1998 n > Ernte 1998 k > Ernte 1999 k > Ernte 2000).

### 3.4.2 Hydroperoxidbestimmungen mittels CE

Das Prinzip der Kapillarelektrophorese (CE) erläutert Schmitz, 1997 in seinen Arbeiten zum Thema der kapillarelektrophoretischen Methoden zur Analyse von Fettsäurehydroperoxiden. Er beschreibt die Trennung der Isomere von Hydroperoxyfettsäuren sowie ihrer korrespondierenden Fettsäuren mittels der micellaren elektrokinetischen Chromatographie (MEKC). Fortführende Arbeiten wurden von Melchior, 2001 dargestellt.

Die von Melchior, 2001 beschriebene Methode wurde im Folgenden zur Untersuchung der isomeren Hydroperoxyfettsäuren von Haselnusskernen eingesetzt.

#### 3.4.2.1 Ergebnisse der Hydroperoxydbestimmung mittels CE

Melchior, 2001 beschreibt die kapillarelektrophoretische Trennung von Fettsäurehydroperoxid- und Fettsäurehydroxyverbindungen der Linolen-, Linol- und Ölsäure mit einem Eluenten, der 2,4% Acetonitril als organischen Modifier, eine SDS-Konzentration von 15mM und 10mM Borax als Puffer enthält. Aufgrund des hohen Überschusses an freien Fettsäuren (Fettsäurehydroperoxid/freie



Fettsäure ~ 1/1000) in den Haselnusskernen konnte mit dem von Melchior, 2001 beschriebenen Elektrolyten unter Einhaltung der Systemparameter keine ausreichende Trennung der Hydroperoxyfettsäuren von den freien Fettsäuren erreicht werden. Der Elektrolyt wurde dem Trennproblem angepasst und optimiert (vgl. Kapitel 5.1.7). Mit einer Erhöhung des organischen Modifiers auf 15 % Acetonitril und einer gleichzeitigen Erhöhung des SDS-Anteils von 15 mM auf 30 mM sowie durch den Austausch des Boraxpuffers gegen einen Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer wurde eine Verbesserung der Trennung erreicht.

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Hydroperoxyfettsäuren wurden die benötigten Referenzverbindungen enzymatisch und über Photooxygenierung synthetisiert (vgl. Kapitel 5.3). Die Migrationszeiten der aufgereinigten Referenzsubstanzen betragen (Mittelwert aus 11 Injektionen): 9-HPOE 13,4 min, 10-HPOE 12,91 min, 13-S-HPODE 10,07 min, 13-S-HPOTE 8,42 min. Die Migrationszeiten der Standards schwankten bis zu 3,8 min. Die Schwankungsbreite der Proben wurde durch die Einflüsse der Probenmatrix weiter erhöht, so dass bei den Fettsäuren bis zu 6,4 min Differenzen in den Migrationszeiten festgestellt wurden. Aus diesem Grunde erfolgte eine Normierung der Migrationszeiten der Hydroperoxide auf Basis des EOF Wertes und der zuletzt migrierenden Fettsäuren. Mit der Formel 3.3 wurden die Migrationszeiten der Analyten über alle Proben hinweg normiert und die Elektropherogramme der jeweiligen Einzelanalysen zwischen der Migrationszeit der Linolsäure und der Migrationszeit des EOF aufgespannt:

$$t_{x_{korr}}^{(i)} = t_1^i + \frac{(t_x^{(y)} - t_1^y) * (t_2^i - t_1^i)}{(t_2^y - t_1^y)} \quad (\text{Formel 3.3})$$

mit

$$t_x^{(y)} = t_x^y - (t_1^y - t_1^i) \quad (\text{Formel 3.4})$$

$t_1^y$  = Migrationszeit der Referenzverbindung 1 des Referenzlauf y (EOF)

$t_2^y$  = Migrationszeit der Referenzverbindung 2 des Referenzlauf y (Säure)

$t_1^i$  = Migrationszeit der Referenzverbindung 1 der i-ten Probe (EOF)

$t_2^i$  = Migrationszeit der Referenzverbindung 2 der i-ten Probe (Säure)

$t_x^y$  = Migrationszeit Analyt x des Referenzlauf y

Mit dieser Normierung wurden die Differenzen der Migrationszeiten für das 13-S-HPOTE von 3,5 min auf 0,1 min reduziert. In Tabelle 3.20 sind die Mittelwerte der Migrationszeiten und ihre Standardabweichungen für das 13-S-HPOTE von 5 Proben abgebildet.

**Tabelle 3.20 Mittelwerte und Standardabweichungen der Migrationszeiten des 13-S-HPOTE für 5 Proben**

	Migrationszeit t [min]	Migrationszeit $t_{\text{korr}}$ [min]
Mittelwert	10,0	8,9
Standardabweichung	1,5	0,1

Im Weiteren erfordert die Abhängigkeit der Konzentrationsbestimmung von der Migrationsgeschwindigkeit eine Korrektur der Quantifizierungsergebnisse. Mit dem stempelförmigen Strömungsprofil kann eine vereinfachte Annahme einer zweidimensionalen Signalaufnahme gemacht werden. Mit dieser Annahme ändert sich die Signalfläche annähernd proportional zur Migrationszeit des Zielanalyten mit  $k = t^2$ . Üblicherweise wird die Signalfläche mit  $k = 1/t$  korrigiert, bei der t aufgrund der konstanten Wegstrecke proportional zur Geschwindigkeit gesetzt wird.

Unter Berücksichtigung der großen Schwankungsbreite der Migrationszeiten mit  $t_{\text{korr}}$  wurden für die Korrekturen der Signalwerte mit  $k = t^2/t_{\text{korr}}$  die besten Ergebnisse erzielt. So wurde bei einer dreifachen Bestimmung eines Standards der Variationskoeffizienten z. B. für das Ölsäurehydroperoxid ( $c = 750 \text{ mg/l}$ ) von 15% (nicht normiert) auf 6% (mit  $k = t^2/t_{\text{korr}}$  normiert) reduziert.

Die Nachweisgrenzen der CE-Bestimmung lagen für die einzelnen Hydroperoxy- und Hydroxyfettsäuren bei ca.  $5 \mu\text{g}/100 \text{ mg Öl}$  (NG nach Kaiser u. Specker)[Kaiser und Specker, 1956].

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen einzelner Haselnüsse sind in der Tabelle 3.21 zusammengefasst.

Tabelle 3.21

**Sensorische Untersuchungen und kapillarelektrophoretische Bestimmung von Hydroperoxy- und Hydroxyfettsäuren in ausgewählten Einzelnüssen**

<b>Probe</b>	<b>Sensorik</b>	<b>13-HPODEa) (µg/100 mg ÖL)</b>	<b>13-HODEa) (µg/100 mg ÖL)</b>
1 Ernte 1998 k Fraktion <11	nicht abweichend	<0.5	<0.5.
2 Ernte 1998 k Fraktion <11	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.
3 Ernte 1998 k Fraktion <11	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.
4 Ernte 1998 k Fraktion <11	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.
5 Ernte 1998 k Fraktion <11	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.
1 Ernte 1998 n Fraktion 11-13	deutlich abweichend, herb, nicht ranzig	<0.5.	<0.5.
2 Ernte 1998 n Fraktion 11-13	leicht abweichend, schwach säuerlich	<0.5.	<0.5.
3 Ernte 1998 n Fraktion 11-13	nicht abweichend	5.8	<0.5.
4 Ernte 1998 n Fraktion 11-13	nicht abweichend	3.7	6.9
5 Ernte 1998 n Fraktion 11-13	stark abweichend, nicht ranzig	<0.5.	33.8
1 Ernte 1998n Fraktion <11	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.
2 Ernte 1998 n Fraktion <11	nicht abweichend	35.2	5.0
3 Ernte 1998 n Fraktion <11	leicht abweichend	<0.5.	<0.5.
4 Ernte 1998 n Fraktion <11	leicht abweichend	20.9	<0.5.
1 Ernte 1999 n Fraktion <11	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.
2 Ernte 1999 n Fraktion <11	leicht abweichend	<0.5.	<0.5.
1 Ernte 1999 k Fraktion <11	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.
2 Ernte 1999 k Fraktion <11	stark abweichend, ranzig	5.2	61.2
1 Ernte 2000 Fraktion 11-13	leicht abweichend	<0.5.	<0.5.
2 Ernte 2000 Fraktion 11-13	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.
3 Ernte 2000 Fraktion 11-13	leicht abweichend	<0.5.	<0.5.
4 Ernte 2000 Fraktion 11-13	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.
5 Ernte 2000 Fraktion 11-13	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.
1 Ernte 2000 Fraktion <11	leicht abweichend, leicht bitter	<0.5.	<0.5.
2 Ernte 2000 Fraktion <11	nicht abweichend	5.4	<0.5.
3 Ernte 2000 Fraktion <11	leicht abweichend	<0.5.	<0.5.
4 Ernte 2000 Fraktion <11	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.
5 Ernte 2000 Fraktion <11	nicht abweichend	<0.5.	<0.5.

a) 13-HPODE: 13-Hydroperoxy-cis-9,trans-11-octadecadiensäure, 13-HODE: 13-Hydroxy-cis-9,trans-11-octadecadiensäure.

In allen untersuchten rohen Haselnussproben (Tab. 3.21) wurde nur das 13-Hydroperoxid (13-HPODE) oder die 13-Hydroxyverbindung (13-HODE) der Linolsäure nachgewiesen. Das 9-Hydroperoxid der Linolsäure wurde nicht detektiert. Aus diesem Grund wird für die Bildung der Hydroperoxide in Haselnusskernen eine enzymatische Peroxidation, z.B. durch eine Lipoxygenase Typ I Reaktion, angenommen.

In den Nüssen Nr. 1-5, Fraktion 11-13 mm und <11 mm der Ernte 2000 konnte nur in einer Probe ein Linolsäurehydroperoxid nachgewiesen werden, dagegen waren in den neun untersuchten Proben der Ernte 1998 n die Hydroperoxy- bzw. Hydroxyverbindungen in 4 Proben feststellbar.

Bei den beiden sensorisch stark abweichenden Proben (Haselnuss 5 Ernte 1998 n Fraktion 11-13 mm und Haselnuss 2 Ernte 1999 k Fraktion <11 mm) wurden hohe Gehalte an 13-Hydroxylinolsäure (13-HODE) nachgewiesen, während bei der Haselnuss Nr. 1 Ernte 1998 n, Fraktion 11-13 mm trotz einer sensorischen Abweichung Hydroperoxide nicht nachgewiesen wurden. Die Haselnusskerne der Fraktionen 11-13 mm waren die gleichen Kerne, die mit der DTD/Fast-GC/TOF-MS Analyse untersucht wurden (Kapitel 3.3.1.2, Tabelle 3.10 und Tabelle 3.11). Die Ergebnisse der CE korrelieren mit den Ergebnissen der DTD/Fast-GC/TOF-MS Analyse insofern, dass bei der Nuss Nr. 1 Ernte 1998 n sekundäre Peroxidationsprodukte nur in geringen Konzentrationen ermittelt wurden wohingegen bei der Nuss Nr. 5 Ernte 1998 n ein starker Anstieg der Produkte zu verzeichnen war.

### **3.4.3 Diskussion**

In Mischproben von Haselnusskernen unterschiedlicher Lagerbedingungen wurden Hydroperoxide der Öl- und Linolsäure mittels HPLC identifiziert. Die Konzentrationen betragen durchschnittlich ca. 50 µg/100 mg Haselnussöl, signifikante Unterschiede zwischen frischer und gelagerter Haselnussware wurden nicht festgestellt (vgl. Kapitel 3.4.1).

Mit der Modifikation der Probenaufarbeitung wurde durch den direkten Einsatz frisch gepresster Öle die Durchführung von Einzelnussanalysen ermöglicht. Eine Trennung der Isomergemische der mit der HPLC-Methode identifizierten Hydroperoxide erfolgte durch den Einsatz der MEKC.

Während mit der HPLC-Methode die Peroxide der Öl- und Linolsäure in Durchschnittsproben nachgewiesen wurden, waren in den mittels MEKC untersuchten Einzelnusskernen nur die Hydroperoxide sowie die Hydroxyverbindungen der Linolsäure in einigen Kernen nachweisbar. Die

ermittelten Konzentrationen in den Einzelnussanalysen lagen mit ca. 5 - 60 µg/100 g z. T. deutlich unter den gefundenen Gehalten der Mischproben.

In der Literatur wurde von Züricher und Hadorn, 1975 und von Belitz et al., 2001 beschrieben, dass die Peroxidzahl (POZ) erst bei stark bitteren, muffigen und ungenießbaren Haselnusskernen ansteigt. Auch die von Sturm, 1979 dargestellte Farbvertiefung des wesentlich empfindlicheren Eisen(III)-thiocyanat-Tests führte erst bei deutlich abweichenden Haselnusskernen zu signifikanten Ergebnissen. Insofern bestätigt der Nachweis der Hydroperoxylinolsäure und Hydroxylinolsäure mit der MEKC die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse eines Anstieges von Hydroperoxyverbindungen in sensorisch stark abweichenden Haselnusskernen.

Die Qualitätsabweichungen können auf die Bildung sekundärer Oxidationsprodukte der 13-S-Isomere der HPODE und HODE zurückgeführt werden. Es zeigte sich, dass die Qualitätsreduzierung fast ausschließlich durch Lipoxygenaseaktivitäten, vermutlich der Lipoxygenase Typ I, verursacht wird. Autoxidative Prozesse wurden auch in der gelagerten Ware mit der MEKC nicht festgestellt.

Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der HPLC und MEKC können auf die Probenvorbereitung und die Probennahme zurückgeführt werden. Wie bereits bei den Untersuchungen der flüchtigen Verbindungen in Haselnusskernen festgestellt wurde, führt die Lipidextraktion mit Lösungsmitteln zu einer Belastung der Probenmaterialien durch Peroxidationen, während mit der einfachen Pressung eine sehr schonende Gewinnung der Öle möglich ist. Zusätzlich werden bei der Analyse von Durchschnittsproben die Unterschiede zwischen den Einzelnusskernen gemittelt (vgl. Kapitel 3.3.3). Die in der Literatur beschriebene Zunahme der POZ für stark geschädigte Haselnusskerne bestätigt ebenfalls den auf einzelne, sensorisch abweichende Haselnusskerne reduzierten Nachweis der Hydroperoxyfettsäuren mittels MEKC [Züricher und Hadorn, 1975; Sturm, 1979; Belitz et al., 2001].

Aufgrund der mit beiden Methoden gefundenen geringfügigen Konzentrationsunterschiede der Hydroperoxide roher Haselnusskerne der Erntejahre 1998-2000 und der Stabilität der Haselnusskerne gegenüber einer Autoxidation, ist eine Qualitätsbeurteilung sowie der Nachweis einer Verschneidungen von Haselnusskernen aus neuer Ernte mit denen alter Ernten, mit diesen Methode nicht möglich.

## 4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein effizientes analytisches Verfahren zur Qualitätsbewertung von Haselnusskernen entwickelt. Das Prinzip des Verfahrens basiert auf einer Quantifizierung der qualitätsrelevanten Aromastoffe in den Ölen frisch gepresster Haselnusskerne. Die Aromastoffe werden durch eine direkte Injektion der Öle (5 $\mu$ l) in einen PTV-Injektor mit einer sich daran anschließenden thermischen Desorption isoliert und nach einer gaschromatographischen Analyse mit einem Time-of-Flight Detektor nachgewiesen (DTD/Fast-GC/TOF-MS Analyse).

Die in der Schnellmethode zur Auswertung der Aromaspektren herangezogenen Verbindungen wurden mittels vergleichender Aromaextraktverdünnungsanalysen (AEVA) sowie olfaktorischer Untersuchungen thermisch desorbierter Öle (TCT-HRGC-Olfaktometrie) als potente Aromastoffe von Haselnusskernen eindeutig identifiziert.

Sensorische Qualitätsabweichungen von Haselnusskernen konnten mit der DTD/Fast-GC/TOF-MS Analyse durch Änderungen der Zusammensetzung der Geruchsstoffe äußerst empfindlich nachgewiesen werden. So nahmen die Konzentrationen der Lipidperoxidationsprodukte Hexanal, Octanal, (E,E)-2,4-Nonadienal und (E,E)-2,4-Decadienal in gelagerten Haselnusskernen zu. Der Anstieg der Verbindungen war nur für sensorisch stark abweichende Haselnusskerne signifikant. Ein mikrobiologischer Verderb wurde über den Anstieg methylverzweigter Ketone und Amine angezeigt. In minderen Nussqualitäten frischer Ernte wurden geringere Konzentrationen an den Monoterpenen  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, Camphen und  $\Delta$ -3-Caren gefunden als in einwandfreien Haselnusskernen.

Zur Auswertung der Aromaspektren wurden verschiedene Verfahren angewendet. Neben der einfachen visuellen Bewertung wurden die Spektren statistisch mittels einer Diskriminanzanalyse ausgewertet. Mit diesem Verfahren konnten frische Haselnusskerne von gelagerten Haselnusskernen sicher unterschieden werden. Die Auswertung erfordert eine hohe Stichprobenzahl, zeichnet sich jedoch durch die Möglichkeit einer präzisen Klassifizierung der Handelsware aus.

Eine andere Möglichkeit der Auswertung ergibt sich durch die Einordnung der Aromastoffe in sensorische Attribute wie ARTEIGEN, RANZIG und ANDERSARTIG. Durch Summierung der Flächenwerte aller Aromastoffe eines Attributes mit anschließender Bereinigung von konstanten Beiträgen konnten mit dieser Methode gute Nussqualitäten sehr empfindlich von minderen Nussqualitäten unterschieden werden.

Durch die Zusammenfassung der drei Faktoren ARTEIGEN, RANZIG und ANDERSARTIG und der Einführung eines inneren Standards (INSTD) wurde mit dem dimensionslosen Faktor NUSSQUALITÄT eine nahezu systemunabhängige Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen erreicht.

Die DTD/Fast-GC/TOF-MS Analyse ermöglicht eine Qualitätsbewertung, mit der peroxidative oder mikrobiologische Verderbnisreaktionen erfasst werden können. Die Qualität erntefrischer Ware kann ebenso beurteilt werden wie ein durch Verschneidung von Haselnüssen neuer Ernte mit alter Ernte hergestelltes Produkt. Der hohe Informationsgehalt der Aromaspektren erlaubt zudem Rückschlüsse auf die Ursache der Qualitätsabweichung.

Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der im Vergleich zur Bestimmung von Einzel- bzw. Summenparametern hohen Empfindlichkeit der Methode durch die Vielzahl der berücksichtigten Verbindungen mit indirekter Korrelation zur sensorischen Qualität.

Die Untersuchungen zu raffinierten Sonnenblumenölen haben gezeigt, dass die Methode der Qualitätsbewertung leicht auf andere Probenmaterialien übertragen werden kann.

Durch die automatisierte Probeninjektion, die einfache Probenvorbereitung, die Schnelligkeit und die hohe Empfindlichkeit der DTD/Fast-GC/TOF-MS Analyse eignet sich die Methode in besonderem Maße zur Routineanalyse.

Zur Ursachenklärung des peroxidativen Verderbs von Haselnusskernen wurden Hydroperoxyfettsäuren als Aromavorläufer von Peroxidationsprodukten mittels Reversed-Phase Flüssigchromatographie und micellarer elektrokinetischer Chromatographie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der peroxidative Verderb von Haselnusskernen fast ausschließlich auf Lipoxygenaseaktivitäten, vermutlich der Lipoxygenase Typ I, zurückzuführen ist.

## **5 Experimenteller Teil**

### **5.1 Methoden und Gerätesysteme**

#### **5.1.1 AEVA**

Es werden 400 g der Haselnussproben 2 min in einer IKA-Universalmühle M 20 unter Wasserkühlung vermahlen. Anschließend eine Extraktion der Aromastoffe aus dem Probenmaterial mit Lösungsmittel (2 x 200 ml, Pentan/Diethylether 1:1 v/v) unter zweistündigem Rühren im Dunkeln durchführen. Danach das Lösungsmittel abdekantieren und mit dem Extrakt eine Hochvakuum-Destillation (ca.  $1 \times 10^{-3}$  mbar, Sumpf 35 °C) durchführen (Guth und Grosch, 1989). Den gewonnenen Aromaextrakt durch Destillation an einer Vigreux-Kolonnen (50 x 1 cm) und Mikrodestillation auf 100 µl konzentrieren. Originalextrakt und daraus hergestellte Verdünnungsstufen mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (HRGC-O) und HRGC-MS untersuchen:

#### **HRGC-O:**

Gaschromatograph: Carlo Erba Instruments HRGC 5160, Injektor: On Column Injektion, Injektionsvolumen: 0,5 µl, Säulen: DB-FFAP 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, 30 m Länge; DB-5 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, 30 m Länge, Detektor: FID, Sniffing-Port (200 °C), Trägergas: Helium (Säulenvordruck 80 kPa), Brenngase: Wasserstoff (100 kPa), Luft (100 kPa), Make-up Gas: Stickstoff (50 kPa), Integrator: Merck Hitachi D-7000 gekoppelt mit elektronischem Signalgeber für die Sniffing-Analyse.

#### **HRGC-MS:**

Gaschromatograph: HP 5890 Series II, Injektor: On Column Injektion, Injektionsvolumen: 0,5 µl, Säulen: DB-FFAP 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, 30 m Länge; DB-5 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, 30 m Länge, Detektor: MSD HP 5971 Series, Trägergas: Helium (Säulenvordruck 80 kPa).



**Tabelle 5.1 Ergebnisse der AEVA der flüchtigen Verbindungen der Ernte 2000 und der Ernte 1998 n**

Verbindung <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	RI (DB-FFAP)	RI (DB-5)	Ernte 2000 FD-Faktor	Ernte 1998 n FD-Faktor
2,5-Dimethyl-3-methoxy-pyrazin	nussartig, röstig	1417	1057	1000	1000
1-Octen-3-on	metallisch, pilzartig	1295	980	300	300
2-Acetyl-1-pyrrolin	röstig	1336	915	300	300
Octanal	seifig	1280	1004	300	300
Methional	kartoffel-artig	1461	904	100	300
Filberton	nussartig	1295	973	100	100
2-Isobutyl-3-methoxypyrazin <sup>c)</sup>	erdig	1533	1190	100	50
(E)-2-Nonenal	fettig	1527	1161	100	100
2-Methylpropionsäure	schweiß-artig	1563	-	100	50
(E,E)-2,4-Nonadienal	frittiertes Fett	1704	1213	100	300
2-/3-Methylbuttersäure	schweiß-artig	1662	873	50	100
Buttersäure	schweiß-artig	1619	821	50	100
Hexanal	grün	1079	801	20	50
$\alpha$ -Pinen	terpenartig	1020	940	50	10
Essigsäure	säuerlich	1450	-	10	10
(Z)-2-Nonenal	fettig	1520	1143	10	10
Nonanal	seifig	1380	1102	10	10
3-Methyl-4-heptanon	fruchtig, nussartig	1159	928	10	10
2-Phenylethanol	blumig, süß	1920	1116	10	1
(E)-2-Decenal	fettig	1755	1167	10	10
o-Aminoacetophenon	aminartig	2200	1314	10	10
Vanillin	vanilleartig	2564	1400	10	10
(E,E)-2,4-Decadienal	frittiertes Fett	1805	1314	10	10
(E,Z)-2,4-Decadienal	fettig	1760	1292	1	10
(E,Z)-2,4-Nonadienal	fettig	1655	1194	1	10
(E)-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal <sup>c)</sup>	metallisch	2017	1385	1	5

- a) Die Verbindungen wurden identifiziert durch Vergleich mit der Referenzsubstanz auf der Basis folgender Kriterien: RI-Wert auf 2 Kapillarsäulen (DB-FFAP und DB-5), Massenspektren (EI) und Geruchsqualität am Sniffing-Port.
- b) Geruchsbeschreibung während der HRGC-O
- c) Die MS-Signale waren für eine Interpretation zu schwach, die Identifizierung erfolgte auf der Basis der in a) angegebenen Kriterien.

Tabelle 5.2

**Ergebnisse der AEVA der flüchtigen Verbindungen der Ernte 2000 g  
und der Ernte 1998 n g**

Verbindung <sup>a)</sup>	Geruchs- qualität <sup>b)</sup>	RI (DB-FFAP)	RI (DB-5)	Ernte 2000 g FD-Faktor	Ernte 1998 n g FD-Faktor
3-Methylbutanal	malzartig	927	652	1000	1000
3-Methyl-4-heptanon	fruchtig, nussartig	1159	925	1000	1000
Filberton	haselnuss- artig, fruchtig	1295	968	1000	1000
Octanal	seifig, citrusartig	1286	1004	1000	1000
Methional	kartoffel- artig	1449	905	1000	100
2-Furfurylthiol	röstig	1432	911	100	1000
Nonanal	seifig	1388	1093	100	100
Hexanal	grün	1079	801	100	1000
$\alpha$ -Pinen	terpenartig	1007	940	100	100
2,5-Dimethyl-3-methoxy- pyrazin <sup>c)</sup>	röstig	1417	1057	100	100
(E,E)-2,4-Decadienal	frittiertes Fett	1804	1318	100	100
Unbekannt	röstig	-	1020	100	10
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	nussig	1449	1083	100	10
(E,Z)-2,4-Nonadienal	fettig	1647	1194	10	100
(E)-2-Decenal	fettig	1615	1261	10	100
$\Delta$ -3-Caren	terpenartig	1135	1020	10	100
(E,E)-2,4-Nonadienal	frittiertes Fett	1707	1222	10	100
(Z)-2-Nonenal	seifig, fettig	1488	1143	10	10
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin <sup>c)</sup>	erdig	1517	1184	10	10
Ethylhexanoat	fruchtig	1218	997	10	10
1-Octen-3-on	metallisch, pilzartig	1295	980	10	10
2-Methyl-3- (2-propenyl)-pyrazin	süß	-	1051	10	10
o-Aminoacetophenon	aminartig	2200	1314	10	10
(E)-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	metallisch	2006	1385	10	10
(E)-2-Nonenal	fettig	1527	1161	1	10
$\gamma$ -Terpinen	terpenartig	-	1062	1	100
2-/3-Methylbuttersäure	schweiß- artig	1662	873	1	10
Buttersäure	schweiß- artig	1619	821	1	10

- a) Die Verbindungen wurden identifiziert durch Vergleich mit der Referenzsubstanz auf der Basis folgender Kriterien: RI-Wert auf 2 Kapillarsäulen (DB-FFAP und DB-5), Massenspektren (EI) und Geruchsqualität am Sniffing-Port.
- b) Geruchsbeschreibung während der HRGC-O
- c) Die MS-Signale waren für eine Interpretation zu schwach, die Identifizierung erfolgte auf der Basis der in a) angegebenen Kriterien.

### 5.1.2 TCT-HRGC-O

Haselnusskerne mit einer Handpresse pressen und das daraus gewonnene Öl direkt zur Analyse einsetzen. Jeweils 0,1-100 µl des Öles in den mit Glaswolle bestückten Liner der Desorptionseinheit einspritzen und den Liner in den TCT-Injektor installieren. Bei 60 °C mit einem Desorptionsfluss von 25 ml/min das Öl 60 min mit Helium spülen und die verdampfenden Komponenten auf einer unpolaren Trap (CP-Sil 5 CB, Chrompack, 5 µm Filmdicke, 40 cm Länge, 0,5 mm ID) kryofokussieren. Durch schnelles Aufheizen der Kühlfalle mit einer Aufheizrate von 375 °C/min auf 240 °C die Komponenten auf die Trennsäule überführen und mittels HRGC-O und HRGC-MS untersuchen:

#### HRGC-O:

Gaschromatograph: HP 5890 Series II, Injektor: TCT/PTICP 4010/4020 Chrompack, Injektionsvolumen: 0,1-100 µl, Retentionsgab: Fused Silica, deaktiviert 0,32 mm ID, 15 cm Länge, Trennsäulen: DB-FFAP 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, 30 m Länge; DB-5 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, 30 m Länge, Detektor: FID, Sniffing-Port (200 °C), Trägergas: Helium (Säulenvordruck 60 kPa), Brenngase: Wasserstoff (100 kPa), Luft (100 kPa), Make-up Gas: Stickstoff (50 kPa), Integrator: Merck Hitachi D-7000 gekoppelt mit elektronischem Signalgeber für die Sniffing-Analyse.

#### HRGC-MS:

Gaschromatograph: HP 5890 Series II, Injektor: TCT/PTI CP 4010/4020 Chrompack, Injektionsvolumen: 0,1-100 µl, Retentionsgab: Fused Silica, deaktiviert 0,32 mm ID, 15 cm Länge, Trennsäulen: DB-FFAP 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, 30 m Länge; DB-5 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, 30 m Länge, Detektor: MSD HP 5971 Series, Trägergas: Helium (Säulenvordruck 60 kPa).

Tabelle 5.3

**Ergebnisse der TCT- Olfaktometrie der flüchtigen Verbindungen in  
Haselnusskernen der Ernte 2000 (10 Einzelnusshälften)**

Verbindung <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	RI (DB-FFAP)	RI (DB-5)	FD-Faktor Ernte 2000
2-Butanon	ätherisch	870	-	50
Camphen	campherartig	1065	949	50
3-Methylbutanal	malzig	927	652	50
2-Pentanon	fruchtig, nach Banane	972	-	50
$\alpha$ -Phellandren	terpenartig, medizinisch	1209	1007	50
$\beta$ -Pinen	terpenartig, harzig	1102	985	50
Unbekannt	-	783	-	50
2-Methylbutanal	malzig	907	663	10
$\alpha$ -Pinen	terpenartig	1013	940	10
1-Octen	grün	830	768	10
Unbekannt	-	724	-	10
Hexanal	grün	1074	801	5
3-Methyl-4-heptanon	fruchtig, nussartig	1156	925	5
6-Methyl-5-hepten-2-on	grün, fettig, stechend	1322	985	5
2-Pentylfuran	butterartig, grüne Bohnen, Süßholz	1222	977	5
2,3,5-Trimethylfuran	röstig	1049	730	5
Unbekannt	malzig, nussig	<500	-	5
Benzaldehyd	bittermandelartig	1496	963	1
$\Delta$ -3-Caren	terpenartig	1141	1020	1
2-Methylpropanal	malzig	822	552	1
2-Nonanon	blumig, fettig	1388	1093	1
Unbekannt	malzig, nussig	641	-	1
Unbekannt	-	736	-	1
Unbekannt	-	899	-	1
Aceton	lösungsmittelartig, fruchtig	780	-	0,5
Ethylacetat	Nagellack, lösungsmittelartig	857	830	0,5
Limonen	ätherisch, nach Zitrone	1193	1030	0,5
Myrcen	krautig, metallisch	1172	989	0,5
Toluol	nach Anstrichfarbe	1029	-	0,5

- a) Die Verbindungen wurden identifiziert durch Vergleich mit der Referenzsubstanz auf der Basis folgender Kriterien: RI-Wert auf 2 Kapillarsäulen (DB-FFAP und DB-5), Massenspektren (EI) und Geruchsqualität am Sniffing-Port.
- b) Geruchsbeschreibung während der HRGC-O

Tabelle 5.4

**Ergebnisse TCT-Olfaktometrie der flüchtigen Verbindungen in gelagerten Haselnusskernen der Ernte 1998 n (10 Einzelnusshälften)**

Verbindung <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	RI (DB-FFAP)	RI (DB-5)	FD-Faktor Ernte 1998 n
$\Delta$ -3-Caren	terpenartig	1141	1020	50
4-Heptanol	fruchtig	1310	-	50
Limonen	ätherisch, citrusartig	1193	1030	50
Octanal	seifig, citrusartig	1280	1004	50
1-Octen-3-on <sup>c)</sup>	pilzartig, metallisch	1300	980	50
Unbekannt	fruchtig	1560	-	50
Unbekannt	erdig, kellerartig	1589	-	50
Benzaldehyd	bittermandelartig	1496	963	10
2-Butanon	ätherisch	870	-	10
$\beta$ -Pinen	terpenartig, harzig	1102	985	10
Camphen	campherartig	1065	949	10
Decanal	seifig, blumig	1477	1207	10
Essigsäure	sauer, scharf	1450	-	10
Filberton	nussartig	1295	968	10
1-Octen	grün	830	-	10
2-Pentylfuran	butterartig, grüne Bohnen, Süßholz	1222	977	10
$\alpha$ -Phellandren	terpenig, medizinisch	1209	1007	10
Unbekannt	petroleumartig	1460	-	10
Aceton	lösungsmittelartig, fruchtig	780	-	5
$\Delta$ -4-Caren	terpenartig	1258	1075	5
4-Heptanon	fruchtig, annanasartig	1110	890	1
Hexanal	grün	1074	801	1
Nonan	lösungsmittelartig	900	900	1
Nonanal	seifig	1385	1103	1
2-Methylbutanal	malzig	907	663	1
3-Methylbutanal	malzig	927	652	1
3-Methyl-4-heptanon	fruchtig, nussartig	1156	925	1
2-Pentanon	fruchtig, nach Banane	972	-	1
$\alpha$ -Pinen	terpenartig	1013	940	1
Toluol	nach Anstrichfarbe	1029	-	1
Unbekannt	-	1234	-	1

- a) Die Verbindungen wurden identifiziert durch Vergleich mit der Referenzsubstanz auf der Basis folgender Kriterien: RI-Wert auf 2 Kapillarsäulen (DB-FFAP und DB-5), Massenspektren (EI) und Geruchsqualität am Sniffing-Port.
- b) Geruchsbeschreibung während der HRGC-O
- c) Die MS-Signale waren für eine Interpretation zu schwach, die Identifizierung erfolgte auf der Basis der in a) angegebenen Kriterien.

Tabelle 5.5

**Ergebnisse der TCT-Olfaktometrie der flüchtigen Verbindungen in  
Haselnusskernen der Ernte 2000 g (10 Einzelnusshälften)**

Verbindung <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	RI (DB-FFAP)	RI (DB-5)	FD-Faktor Ernte 2000 g
β-Pinen	terpenartig, harzig	1102	985	100
3-Methylbutanal	malzig	927	652	100
Octanal	seifig, citrusartig	1268	1004	100
Pentanal	stechend, bittermandelartig	968	722	100
Propanal	fruchtig, stechend	796	450	100
Acetaldehyd	stechend, ätherisch,	647	-	50
2-Butanon	ätherisch	870	-	50
2,5-Dimethylpyrazin	nussartig	1390	906	50
Filberton	haselnussartig	1295	968	50
3-Methyl-4-heptanon	fruchtig, nussartig	1159	925	50
6-Methyl-5-hepten-2-on	grün, fettig, stechend	1332	985	50
Myrcen	krautig, metallisch	1172	989	50
2-Pentylfuran	butterartig, grüne Bohnen, Süßholz	1222	977	50
α-Phellandren	terpenig, medizinisch	1209	1007	50
2-Pentanon	fruchtig, nach Banane	972	-	50
α-Pinen	terpenartig	1013	950	50
Unbekannt	-	1150	-	50
Δ-3-Caren	terpenartig	1135	1020	10
Camphen	campherartig	1065	949	10
Ethylbutanoat	fruchtig	1030	803	10
(Z)-2-Heptenal	grün, fettig	1319	957	10
Hexanal	grün	1082	801	10
3-Isobutyl-3-methoxy- pyrazin <sup>c)</sup>	erdig	1517	1184	10
Limonen	ätherisch, citrusartig	1180	1030	10
Nonanal	seifig	1388	1102	10
2,3,5-Trimethylfuran	röstig	1050	730	10
Unbekannt	-	1092	-	10
2,3-Butanedion	butterartig	979	<600	5
2-Ethyl-3,6-dimethyl- pyrazin	nussig, kartoffelartig	1449	1083	5
2-Ethyl-3,5-dimethyl- pyrazin	nussig, kartoffelartig	1465	1088	5
Ethylbenzol	lösungsmittelartig	1124	844	5
2-(Z)-Nonenal	fettig, grünes Blatt	1502	1148	5
Octan	lösungsmittelartig	800	800	5
(E)-2-Octenal	fettig, nussartig	1423	1059	5
Trimethylpyrazin	erdig	1400	1233	5

Verbindung <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	RI (DB-FFAP)	RI (DB-5)	FD-Faktor Ernte 2000 g
Unbekannt	süß	939	-	5
Unbekannt	-	1148	-	5
2-Acetyl-1-pyrrolin <sup>c)</sup>	röstig	1336	915	1
Cyclopentan	lösungsmittelartig	636		1
Butanal	fruchtige, bananenartige Note	872	596	1
2,3-Diethyl-5-methyl- pyrazin	gebratene Kartoffel	1482	1158	1
2-Methylbutanal	malzig	914	663	1
2-Methylpropanal	malzig	822	552	1
3-Methylpentanal	malzig	1081	652	1
Nonan	lösungsmittelartig	900	900	1
1-Octen-3-on <sup>c)</sup>	metallisch, pilzartig	1300	980	1
Toluol	nach Anstrichfarbe	1039	-	1
p-Xylol	lösungsmittelartig	1117		1
Unbekannt	-	659		1
Unbekannt	-	672		1
Unbekannt	-	752		1
Unbekannt	-	842		1
Unbekannt	-	964		1
Unbekannt	-	1104		1
Unbekannt	-	1151		1
Unbekannt	-	1188		1

- a) Die Verbindungen wurden identifiziert durch Vergleich mit der Referenzsubstanz auf der Basis folgender Kriterien: RI-Wert auf 2 Kapillarsäulen (DB-FFAP und DB-5), Massenspektren (EI) und Geruchsqualität am Sniffing-Port.
- b) Geruchsbeschreibung während der HRGC-O
- c) Die MS-Signale waren für eine Interpretation zu schwach, die Identifizierung erfolgte auf der Basis der in a) angegebenen Kriterien.

### 5.1.3 Flash-Chromatographie

Haselnusskerne wie in Kapitel 5.1.1. beschrieben aufarbeiten und eine Hochvakuum-Destillation (ca.  $1 \cdot 10^{-3}$  mbar, Sumpf 35 °C) durchführen. Das Destillat mit 200 ml HCl (0,1 N) ausschütteln. Die wässrige Phase nach dem Alkalisieren ( $\text{NaOH}_{\text{konz.}}$ , pH = 12-13) mit Ether extrahieren und die Ether-Phase mit gesättigter NaCl-Lösung waschen. Die Ether-Fraktion aus der HCl-Extraktion mit  $\text{NaHCO}_3$  (0,1 N) ausschütteln und anschließend über Flash-Chromatographie fraktionieren. Die wässrige Phase der Carbonat-Extraktion sauer stellen (pH = 2-3) und ebenfalls mit Ether ausschütteln.

Flash-Chromatographie: Merck System Superformance Säule 31 cm Länge, 16 mm Innendurchmesser, Kieselgel 60 Korngröße 0,04-0,063 mm, Pumpe: LC Kontron 414-T; Eluent: Pentan/Ether je 2 x 100 ml (97,5/2,5; v/v, 95/5; v/v, 90/10; v/v, 80/20; v/v, 50/50; v/v)

Die Ether-Extrakte und die einzelnen Fraktionen der Flash-Chromatographie durch Destillation an einer Vigreux-Kolonnen (50 x 1 cm) und Mikrodestillation auf 100  $\mu\text{l}$  einkonzentrieren [Bemelmans, 1979] und mit HRGC-O und HRGC-MS untersuchen:

#### **HRGC-O:**

Gaschromatograph: Carlo Erba Instruments HRGC 5160, Injektor: On Column Injektion, Injektionsvolumen: 0,5  $\mu\text{l}$ , Säulen: DB-FFAP 0,32 mm ID, 0,25  $\mu\text{m}$  Filmdicke, 30 m Länge; DB-5 0,25 mm ID, 0,25  $\mu\text{m}$  Filmdicke, 30 m Länge, Detektor: FID, Sniffing-Port (200 °C), Trägergas: Helium (Säulenvordruck 80 kPa), Brenngase: Wasserstoff (100 kPa), Luft (100 kPa), Make-up Gas: Stickstoff (50 kPa), Integrator: Merck Hitachi D-7000 gekoppelt mit elektronischem Signalgeber für die Sniffing-Analyse.

#### **HRGC-MS:**

Gaschromatograph: HP 5890 Series II, Injektor: On Column Injektion, Injektionsvolumen: 0,5  $\mu\text{l}$ , Säulen: DB-FFAP 0,25 mm ID, 0,25  $\mu\text{m}$  Filmdicke, 30 m Länge; DB-5 0,25 mm ID, 0,25  $\mu\text{m}$  Filmdicke, 30 m Länge, Detektor: MSD HP 5971 Series, Trägergas: Helium (Säulenvordruck 80 kPa).



### 5.1.4 DTD/Fast-GC/TOF- Massenspektrometrie

Neutrale Pflanzenöle können direkt zur Analyse eingesetzt werden; das aus rohen Haselnüssen durch Pressung isolierte Öl wird zur Abtrennung von Trübstoffen zentrifugiert (2 min bei 6000 U/min). Die Öle (1-5  $\mu$ l) werden über einen automatisierten Probengeber in den Glasliner des auf 5 °C gekühlten DTD-Injektorkopf injiziert. Durch das Aufheizen des Injektors (35-175 °C, Splitless) werden die flüchtigen Komponenten der Öle mittels Gasextraktion (He) desorbiert.

**Tabelle 5.6** Zur Auswertung herangezogene Massen für die Quantifizierung über Massenspektrometrie (QM)

Verbindung	QM (m/z)
$\alpha$ -Pinen	93
Camphen	93
5-Methyl-2-hepten-4-on	69
$\beta$ -Pinen	93
$\Delta$ -3-Caren	93
Limonen	93
$\gamma$ -Terpinen	93
Hexanal	56
Heptanal	57
Ocanal	55
Nonanal	57
Decanal	112
(E,E)-2,4-Nonadienal	81
(E,E)-2,4-Decadienal	81

Mit Hilfe einer CO<sub>2</sub>-Kühlung werden die desorbierenden Verbindungen am Anfang der Trennsäule fokussiert. Nach der Desorption wird der Injektor zur Minimierung von Nachelutionen in den Split-Modus (20 ml/min) umgestellt und auf 25 °C gekühlt bzw. werden die mit Öl beladenen Glasliner durch einen frischen Liner ersetzt. Anschließend erfolgt die Trennung der flüchtigen Komponenten über Fast-GC an einer DB-5 bzw. DB-1701 Kapillare. Die Identifizierung der Komponenten erfolgt über einen Vergleich der Retentionsindizes und Massenspektren von Referenzverbindungen aus Datenbanken. Zur Quantifizierung relevanter Aromastoffe wurde eine externe Kalibrierung mit den Referenzverbindungen, gelöst in Pentan, durchgeführt. In Tabelle 5.6 sind die zur Quantifizierung herangezogenen Massen angegeben.

## Gerätesystem:

Probengeber: Combi Pal CTC; Injektor: DTD-Injektionssystem Optic2 ATAS; Temperaturprogramm Injektor: 5 °C (0 s) 16 °C/s 150 °C (710 s), Splitless (230 s); Gaschromatograph: 6890 Agilent; Kryofokussierung: CO<sub>2</sub>-Cryogenic Cold Trap SGE; Detektor: TOF-MS LECO Pegasus II®; Aquisitionsrate: 20 Spektren/Sekunde (35-350 u); Trägergas: Helium 5.0; Säule: DB-1701 (20 m x 0,18 mm ID, 0,4 µm Filmdicke) und RTX-5 (20 m x 0,18 mm ID, 0,2 µm Filmdicke); Gasfluss: 1 ml/min; Temperaturprogramm GC: 20 °C (3,5 min) 40 °C/min 290 °C (1 min).

### 5.1.5 Isotopenverdünnungsanalyse

Haselnusskerne mit einer Handpresse bzw. hydraulischen Presse quetschen und das daraus gewonnene Öl direkt zur Analyse einsetzen. Jeweils 100 µl des Öles in den mit Glaswolle bestückten Liner der Desorptionseinheit einspritzen. Zu dem Öl 5 µl einer Stammlösung der deuterierten Verbindungen (Konzentrationen der einzelnen Verbindungen zwischen 0.5-6.5 ng/µl in Pentan) einspritzen und das Lösungsmittel vorsichtig mit Luft abblasen. Den Liner in den TCT-Injektor installieren. Bei 60 °C mit einem Desorptionsfluss von 25 ml/min das Öl 60 min mit Helium spülen und die verdampfenden Komponenten auf einem Retentionsgab kryofokussieren. Durch schnelles Aufheizen der Kühlfalle mit einer Aufheizrate von 375 °C/min auf 240 °C die Komponenten auf die Trennsäule überführen und mittels HRGC-MS untersuchen:

**Tabelle 5.7 Zur Auswertung herangezogene Massen für die Quantifizierung über Massenspektrometrie (QM)**

Verbindung	QM (m/z)
[ <sup>1</sup> H]-Hexanal	82
[ <sup>2</sup> H]-Hexanal	86
[ <sup>1</sup> H]-5-Methyl-2-hepten-4-on	69
[ <sup>1</sup> H]-3-Methyl-4-heptanon	85
[ <sup>2</sup> H]-3-Methyl-4-heptanon	88
[ <sup>1</sup> H]-(E,E)-2,4-Nonadienal	81
[ <sup>2</sup> H]-(E,E)-2,4-Nonadienal	83
[ <sup>1</sup> H]-(E,E)-2,4-Decadienal	81
[ <sup>2</sup> H]-(E,E)-2,4-Decadienal	83

Tabelle 5.8

## Bei der Auswertung berücksichtigte Korrekturfaktoren (K)

Verbindung	K
[ <sup>2</sup> H]-Hexanal / [ <sup>1</sup> H]-Hexanal	0,96
[ <sup>2</sup> H]-5-Methyl-2-hepten-4-on / [ <sup>2</sup> H]-3-Methyl-4-heptanon	1,04
[ <sup>2</sup> H]-3-Methyl-4-heptanon / [ <sup>1</sup> H]-3-Methyl-4-heptanon	0,90
[ <sup>2</sup> H]-(E,E)-2,4-Nonadienal / [ <sup>1</sup> H]-(E,E)-2,4-Nonadienal	0,75
[ <sup>2</sup> H]-(E,E)-2,4-Decadienal / [ <sup>1</sup> H]-(E,E)-2,4-Decadienal	0,73

**HRGC-MS:**

Gaschromatograph: HP 5890 Series II, Injektor: TCT/PTI CP 4010/4020 Chrompack, Injektionsvolumen: 100 µl, Retentionsgab: Fused Silica, deaktiviert 0,32 mm ID, 15 cm Länge, Trennsäulen: DB-FFAP 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, 30 m Länge; Detektor: MSD HP 5971 Series, Trägergas: Helium (Säulenvordruck 60 kPa).

**5.1.6 Hydroperoxydbestimmung mittels HPLC**

20-25 g der entsprechenden Haselnussproben 2 min in der IKA-Universalmühle M20 unter Wasserkühlung vermahlen und mit Lösungsmittel (2 x 25 ml, Pentan/Diethylether 1:1, v/v) unter Stickstoffatmosphäre im Dunkeln unter Rühren 30 min extrahieren. Danach das Lösungsmittel abdekantieren und mit Stickstoff abblasen. Ca. 50-150 mg des gewonnenen Öles in 50 ml Chloroform lösen, 1 ml Aliquote in Eppendorf-Cups pipettieren und das Lösungsmittel mit Stickstoff abblasen. 200 µl eines Glycylglycin-Puffer (400 mM Glycylglycin, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 7,5-7,6), 10 µl Lipase und 50 µl Esterase zupipettieren und 30-60 min bei 37 °C inkubieren. Die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Chloroform stoppen und anschließend mit Chloroform (5 x 1 ml) die Extraktion der freien Hydroperoxyfettsäuren und der freien Fettsäuren aus der wässrigen Lösung durchführen. Das Lösungsmittel durch Abblasen mit Stickstoff entfernen und den Rückstand in 1 ml bzw. 0,1 ml Methanol aufnehmen. Jeweils 20 µl der methanolischen Lösung mittels eines automatischen Probengeber injizieren. Die UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 195 nm durchführen. Als Derivatisierungsreagenz für die Chemolumineszenz-Detektion 2,5 mg Mikroperoxidase-11 und 6 mg Isoluminol bzw. Luminol in 10-100 ml Methanol lösen und mit 150 ml Borax-Puffer (pH = 10,2) versetzen.

## **HPLC-System:**

Waters alliance® Separation Module 2690 mit He-Entgaser, Autosampler und Eluentenpumpe; Trennsäule: Neos Fluofix-RP-Säule (temperiert auf 40°C); Injektionsvolumen: 20 µl; Eluent: 55 % Acetonitril, 45 % Phosphorsäure (0,1 %); Flussrate: 1 ml/min, Reagenzienpumpe: La Chrom Pumpe Merck Hitachi L7110, UV/VIS-Detektor: La Chrom Merck Hitachi UV Detektor und Chemolumineszenzdetektor: Jasco 825-Cl. Auswertesoftware: Millennium 32.

### **5.1.7 Hydroperoxidbestimmung mittels CE**

Zufällig ausgewählte einzelne rohe Haselnüsse halbieren. Mit einer Hälfte der Nuss eine sensorische Bewertung durchführen und von der entsprechenden zweiten Hälfte das Öl mittels einer Presse isolieren. Ca. 4-6 mg des gewonnenen Öles in Eppendorf-Cups genau einwiegen und mit 200 µl eines Glycylglycin-Puffer (400 mM Glycylglycin, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 7,5-7,6), 10 µl Lipase und 50 µl Esterase versetzen und 120 min bei 37 °C inkubieren. Die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml Chloroform stoppen und anschließend mit Chloroform (3 x 0,3 ml) die Extraktion der freien Hydroperoxyfettsäuren und der freien Fettsäuren aus der wässrigen Lösung durchführen. Das Lösungsmittel durch Abblasen mit Stickstoff entfernen und den Rückstand in 30 µl Methanol aufnehmen und mittels Kapillarelektrophorese (CE) untersuchen.

#### **Kapillarelektrophoretische Bedingungen:**

P/ACETM MDQ Kapillar Elektrophorese System, Beckman Coulter; Detektor: Dioden Array Detektor Beckman Coulter; Software: 32 Karat Software; Säule: CS Fused-Silica, unbelegt ID 50 µm, Länge 50 cm, Länge zum Detektorfenster 40 cm; Elektrolyt: wässrige Lösung von 30 mM SDS und 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9.3), 15 % Acetonitril

Konditionierung:	1 Spülschritt:	1,0 min Methanol (20 psi),
	2 Spülschritt:	0,5 min SDS 200mM (20 psi);
	3 Spülschritt:	1,5 min NaOH, 1M (20 psi);
	4 Spülschritt:	0,5 min tridest. H <sub>2</sub> O (20 psi);
	5 Spülschritt:	2,0 min Elektrolyt
Injektion:		5,0 Sec. (0.5 psi)
Spannung:		18 kV, 35 min

## 5.2 Synthesevorschrift der Aromastoffe

### 5.2.1 3-Methyl-4-heptanon

Das unmarkierte 3-Methyl-4-heptanon wurde nach der Vorschrift von Becker et al., 1993 durch Oxidation des 3-Methyl-4-heptanols mit PDC hergestellt.

#### Methode

50 mmol des Alkohols in 5 ml Dichlormethan lösen und bei RT zu einer Lösung von 70 mmol PDC in 70 ml unter Rühren langsam zutropfen. Nach 24 h wird mit 100 ml Diethylether verdünnt und filtriert. Die Lösung wird mit einem Rotationsverdampfer einkonzentriert über die Flash-Chromatographie gereinigt. Mit einem Rotationsverdampfer werden die vereinigten, mit  $\text{MgSO}_4$  getrockneten Fraktionen der Flashchromatographie vorsichtig einkonzentriert und über erneute Destillation wird an der Vigreux-Kolonnen das Lösungsmittel vollständig entfernt.

#### Flash-Chromatographie

Elution mit jeweils 200 ml 97,5/2,5 (v/v), 95/5 (v/v), 90/10 (v/v), 80/20 (v/v), 70/30 (v/v) und 50/50 (v/v) Pentan/Diethylether

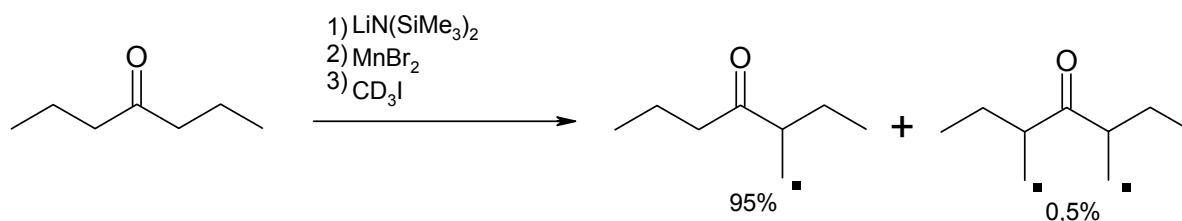
Kieselgelsäule: 31 cm Länge, 16 mm ID, Kieselgel 60 Korngröße 0,04-0,063 mm, Pumpe: Kontron 414-T, Fraktionssammler: Pharmacia LKB RediFrac, UV Kontrolle: LKB 2138 UVICORD 5

Das Edukt wurde zu 98 % oxydiert. Nach der Reinigung mit der Flash-Chromatographie konnte das Pyridin vollständig abgetrennt werden. Das 3-Methyl-4-heptanol eluierte in der 2. Fraktion (95/5 (v/v)). Die Reinheit des Produktes wurde chromatographisch über das in Kapitel 5.1.1 beschriebene GC-MSD und GC-FID System kontrolliert. In Abbildung 5.2 ist das Massenspektrum der unmarkierten Verbindung der markierten Verbindung gegenübergestellt.

## 5.2.2 [<sup>2</sup>H]-3-Methyl-4-heptanon

Das [<sup>2</sup>H]-3-Methyl-4-heptanon wurde nach der Methode von Reets und Haning, 1993 über eine  $\alpha$ -Alkylierung des 4-Heptanons synthetisiert. Die beschriebene Methode eignet sich insbesondere aufgrund der Unterdrückung doppelter Alkylierungen des Ketons. Hierbei führt die Transmetallierung von Lithiumenolaten über  $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$  mit  $\text{MnBr}_2$  zu einem Mangan-Enolat unbekannter Struktur und  $\text{CH}_3\text{I}$  als Alkylierungsreagenz zu guten Ausbeuten des  $\alpha$ -alkylierten Ketons.

Abbildung 5.1 Reaktionsmechanismus zur Synthese des [<sup>2</sup>H]-3-Methyl-4-heptanon



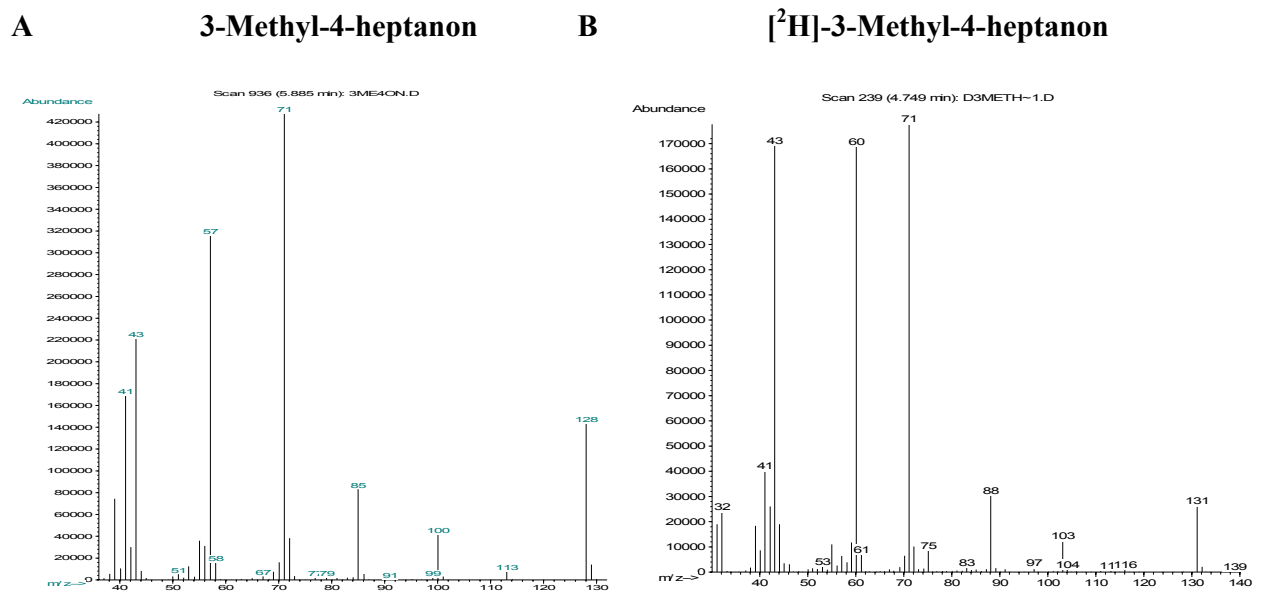
### Methode

Es werden 3 mmol 4-Heptanon in eine Lösung aus 3.05 mmol LiHMDS in 8 ml THF (trocken) unter Schutzatmosphäre (Argon) bei  $-78^\circ\text{C}$  zugegeben. Nach 40 min wird das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt und 9 mmol DMPU zugefügt, anschließend wird für weitere 10 min gerührt. Die Enolatlösung wird zu 3 mmol  $\text{MnBr}_2$  (wasserfrei) zugegeben und gerührt bis eine klare, rot-braune Lösung erreicht wird (10-15 min). Im Anschluss werden 3.3 mmol deuteriertes Methyljodid mit einer Spritze zugegeben. Die Reaktion wird nach 4 h mit ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gequentscht, mit 50 ml Pentan extrahiert und mit ges. wässriger EDTA-Lösung, ges.  $\text{NaHCO}_3$  und Wasser aufgereinigt.

Die über Destillation an einer Vigreux-Kolonne (50 x 1 cm) und Mikrodestillation auf ca. 500  $\mu\text{l}$  auf zukonzentrierende Lösung wird mit einer Flash-Chromatographie gereinigt (vgl. Methode Anhang) und die Fraktionen des alkylierten Ketons (UV- und GC-Kontrolle) vereinigt. Die Lösung wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und mit einem Rotationsverdampfer vorsichtig einkonzentriert. Über erneute Destillation an der Vigreux-Kolonne wird das Lösungsmittel vollständig entfernt.

Die über GC ermittelte Ausbeute des monoalkylierten Rohproduktes betrug ca. 70 %; das 3,5-Dimethyl-4-heptanon wurde nicht nachgewiesen. Um ein reines Endprodukt zu erhalten, wurden die Fraktionen der Flash-Chromatographie, bei denen das Produkt mit dem Edukt koeluierten nicht vereinigt. Nach der Reinigung und dem Entfernen des Lösungsmittels betrug die Ausbeute ca. 30 %. Die Reinheit der Verbindung wurde gaschromatographisch über MSD- und FID-Detektion kontrolliert und betrug ca. 90 %. Das Massenspektrum der Verbindung ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

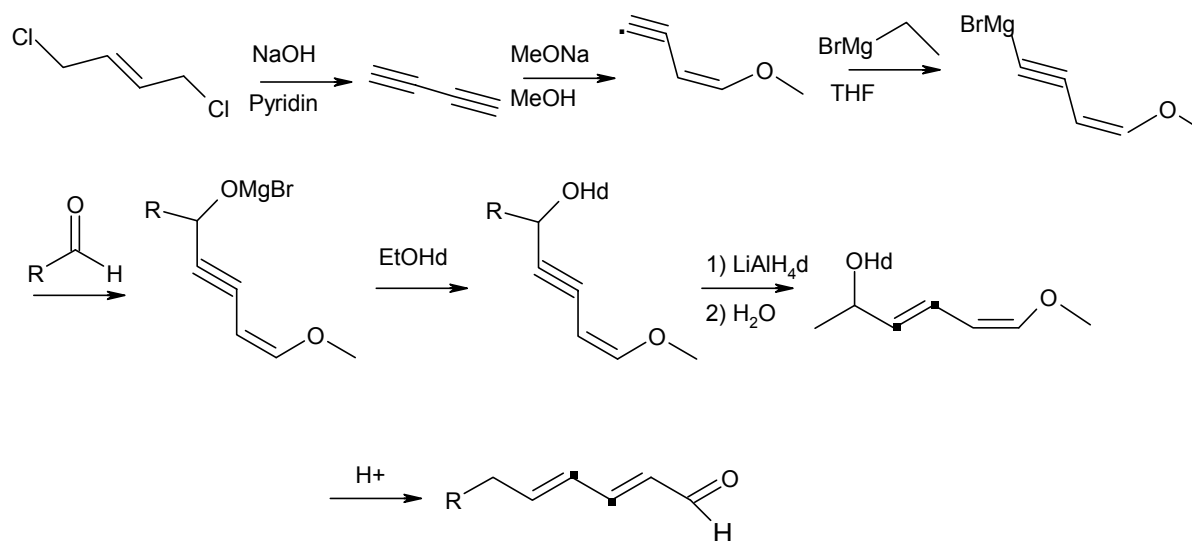
**Abbildung 5.2** Massenspektren des synthetisierten 3-Methyl-4-heptanons und des [<sup>2</sup>H]-3-Methyl-4-heptanons



### 5.2.3 [<sup>2</sup>H]-(E,E)-2,4-Nonadienal und [<sup>2</sup>H]-(E,E)-2,4-Nonadienal

Die beiden Dienale wurden nach der Vorschrift von Lin et al., 1999 synthetisiert:

**Abbildung 5.3** Reaktionsmechanismus zur Synthese des [<sup>2</sup>H]-(E,E)-2,4-Decadienals und [<sup>2</sup>H]-(E,E)-2,4-Nonadienals



#### Methode

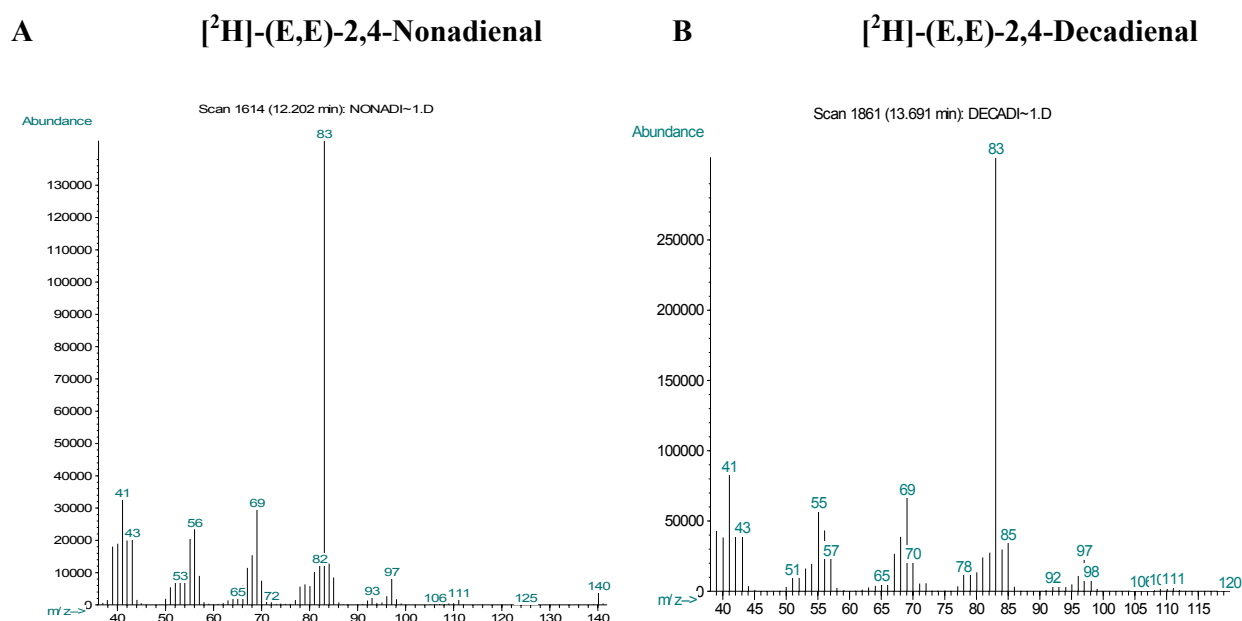
Mit einer wässrigen Lösung NaOH (40 %) wird durch Zutropfen in eine ethanolische Lösung aus 1,4-Dichlorbutin (0,24 mol) mit Pyridin als Base, 1,3-Dibutin freigesetzt, das Gas durch eine wässrige Lösung mit NaOH (1M) sowie trockenes CaCl<sub>2</sub> durchleiten und in einer Kühlfalle kondensiert. Mit MeONa (2,7 g) in MeOH (100 ml) wird bei 75 °C im Autoklaven für 4 h erhitzt und anschließend Wasser (200 ml) zufügen. Nach der Abtrennung der organischen Phase, wird die wässrige Lösung mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25 %) angesäuert und anschließend mit Diethylether (3\*100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden gewaschene, getrocknete und das Lösungsmittel entfernt. Nach einer Vakuumdestillation wird das (Z)-1-Methoxy-1-buten-3-in (9,2 mmol in 12 ml THF<sub>trocken</sub>) in eine Lösung aus BrMgC<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (1 M in THF<sub>trocken</sub>) bei -40 C getropft und bei RT gerührt. Nach Rühren bei RT (1 h) wird der entsprechende Aldehyd (7 mmol) bei gekühlter Lösung zugetropft und gerührt, bis die Grignard-Reaktion vollständig abgelaufen ist (GC-Monitoring). Die heruntergekühlte Lösung wird mit EtO<sup>2</sup>H (7 mmol) versetzt, nach 20 min mit LiAl<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (portionsweise) reduziert. Nach 2 h rühren und stehen lassen über Nacht, wird die Lösung



mit Ethylacetat (0,4 ml),  $^2\text{H}_2\text{O}$  (2 ml) und  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$  (4 N, 10 ml) behandelt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, getrocknet und vorsichtig über Destillation an einer Vigreux-Kolonne (50 x 1 cm) und Mikrodestillation auf ca. 500  $\mu\text{l}$  aufkonzentriert. Mit einer Flash-Chromatographie wird das Produkt gereinigt (vgl. Methode Anhang) und die Fraktionen der deuterierten Dienale (UV- und GC-Kontrolle) vereinigt. Die Lösung wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und mit einem Rotationsverdampfer vorsichtig einkonzentriert. Über erneute Destillation an der Vigreux-Kolonne wird das Lösungsmittel vollständig entfernt.

Die Reinheit der Produkte wurde gaschromatographisch über MSD- und FID-Detektion kontrolliert. Die Reinheit des  $[\text{H}^2]\text{-(E,E)-2,4-Nonadienal}$  betrug ca. 40 % und die des  $[\text{H}^2]\text{-(E,E)-2,4-Decadienal}$  betrug ca. 45 %. In Abbildung 5.4 sind die Massenspektren der beiden Verbindungen dargestellt.

**Abbildung 5.4** Massenspektren des synthetisierten  $[\text{H}^2]\text{-(E,E)-2,4-Nonadienals}$  und des  $[\text{H}^2]\text{-(E,E)-2,4-Decadienals}$



### 5.3 Synthesevorschrift der Hydroperoxide

Die Synthese der Hydroperoxyfettsäuren wurde nach der von Schmitz und Gäb, 1997 beschriebenen Vorschrift über Photooxygenierung der jeweiligen Fettsäuren durchgeführt. Isomeren reine Hydroperoxyde wurden durch enzymatische Synthese nach der von Heitkamp, 1999 beschriebenen Methode synthetisiert.

#### 5.3.1 Photooxygenierung

Linolen-, Linol- und Ölsäure (100-300 mg) in 200 ml Methanol lösen, mit 5 mg Methylenblau versetzen und in das Reaktionsgefäß aus Quarzglas geben. Bestrahlung mit einer Wolframlampe unter gleichzeitiger Einleitung von Sauerstoff (Bestrahlungszeiten: Ölsäure: 48 h, Linolsäure 24 h, Linolensäure 12 h). Konzentrierung am Rotationsverdampfer auf ca. 10-15 ml und Zugabe von ca. 10 ml Wasser und anschließender Extraktion der Produkte mit Hexan.

Die Reinigung der Ölsäurehydroperoxide erfolgte mittels HPLC nach folgenden Bedingungen:

Pumpe: Hochdruckgradientenpumpe LaChrom Merck Hitachi L-7100; Detektor: Merck Hitachi UV-Detektor L-7400; Säule: Nucleosil 100-5 C<sub>8</sub>, 7cm Länge; Eluent: 0,1% Phosphorsäure (Eluent B), Acetonitril (Eluent A); Gradient: B 80v% ⇒ A 80 % (15 min), A 80%(25 min), B 80% ⇒ 1 min; Wellenlänge: 195 nm

#### 5.3.2 Enzymatische Synthese

Linolsäure (316,9 mg/100 ml) bzw. Linolensäure (233 mg/100 ml) in Messkolben (100 ml) einwiegen und 5 ml Tween 20-Lösung (Polysorbat 20, 10 µl/100 ml H<sub>2</sub>O) zugeben und die Lösung mit Boratpuffer (3 mM, pH = 9) auffüllen. Jeweils eine Lösung von Lipoxygenase (13,0 mg/100 ml; Aktivität: ca.  $6 \cdot 10^4$ - $12 \cdot 10^4$  Units/mg, Boratpuffer 3 mM, pH 9) zusetzen und durch die Lösung Sauerstoff leiten. Die Reaktionslösungen bei 0 °C im Eisbad für 6 h belassen. Die Reaktionslösungen auf pH 4 ansäuern und anschließend mit Pentan die gebildeten Hydroperoxide isolieren.

Die Reinigung der Linol- und Linolensäurehydroperoxide nach der enzymatischen Peroxidation erfolgte mittels Flash-Chromatographie nach folgenden Bedingungen:

Flash-Chromatographie: Merck System Superformance Säule 31 cm Länge, 16 mm Innendurchmesser, Kieselgel 60 Korngröße 0,04-0,063 mm, Pumpe: LC Kontron 414-T; Eluent: Hexan/Ether/Eisessig (80/20/1;v/v/v ); Fraktionssammler: Pharmacia LKB.RediFrac; Detektor: LKB Bromma 2138 UVICORDS ( $\lambda=285$  nm)

Die Hydroperoxide der Linolsäure eluierten in einem Bereich von 50 ml bis 100 ml, die der Linolensäure von ca. 75 ml bis 120 ml.

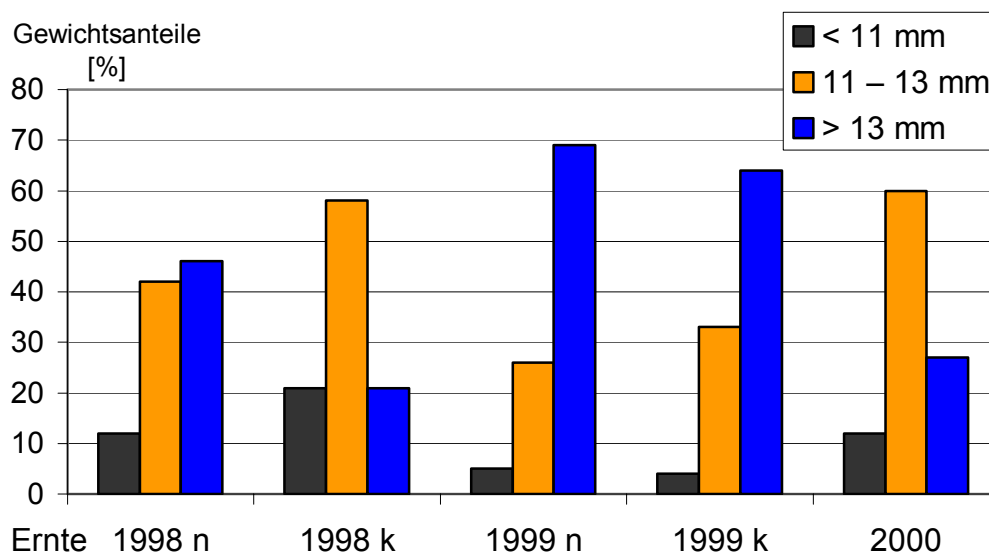
## Anhang

### Ergebnisse Fraunhofer- Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV, Freising)

Am Fraunhofer- Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV, Freising) wurden analytische Kennzahlen wie z.B. der Wasser-, Öl- und Proteingehalt, der Anteil der Linol- und Ölsäure an der Triglycerid- Zusammensetzung sowie die Fettsäureverteilung, Induktionszeit und Enzymaktivitäten in den gleichen wie in dieser Arbeit verwendeten Probenmaterialien untersucht [Rieblinger und Guth, 2002]. Teilergebnisse dieser Untersuchungen sind ergänzend zu dieser Arbeit in Tabelle 6.2 - Tabelle 6.7 und Diagramm 6.2 - 6.5 dargestellt.

Die Lagerung unter „Normalbedingung“ führte, verglichen mit den kühl gelagerten Proben, zu einer Reduzierung des Anteiles der Fraktion mit >13 mm Durchmesser. Der jeweilige Anteil der Fraktion 11-13 mm und der Fraktion <11 mm wurde durch die normale Lagerung erhöht. Zurückzuführen sind diese Effekte auf die größere Verdunstungsrate bei höheren Lagertemperaturen und dem mit der größeren Oberfläche verbundenem stärkerem Gewichtsverlust der Fraktion >13 mm. Bezogen auf die Erntejahre war der Anteil der großen Nüsse (> 13 mm) in der Ernte 1999 höher als in den Ernte 1998 und 2000.

**Diagramm 6.1**      **Größenverteilung der Haselnusskerne zum Zeitpunkt der Ernte 2000 nach IVV**



**Tabelle 6.1****Größenverteilung der unterschiedlichen Erntejahre nach IVV**

Erntejahr	Gewichtsanteile nach Kalibrierung [%]		
	< 11 mm	11 – 13 mm	> 13 mm
1998 n	12	42	46
1998 k	21	58	21
1999 n	5	26	69
1999 k	4	33	64
2000	12	60	27

Aus den Tabellen 6.2 bis 6.4 geht hervor, dass kleine Haselnusskerne (<11 mm) einen leicht erhöhten Wasser- sowie Proteingehalt und einen geringeren Anteil Öl aufweisen als größere Kerne. Im Öl der kleinen Haselnusskerne ist der Anteil der Linolsäure erhöht, während der Gehalt der Ölsäure vergleichsweise sinkt (Tabelle 6.5). Damit lässt sich die größere Oxidationsanfälligkeit des Haselnussöls von kleinen Nüssen erklären. Bei kühl gelagerten Haselnusschargen (Ernte 1999 k, Ernte 1998 k) änderte sich die Induktionszeit im Vergleich zur aktuellen Ernte bei groß- und mittelkalibrierten Größen nur wenig (Tabelle 6.6). Ein deutlicher Qualitätsabfall wiesen hingegen normal gelagerte Proben auf (Ernte 1999 n, Ernte 1998 k).

Es zeigte sich, dass die Peroxydase bei einer gelagerten Ware eine im Vergleich zu einer frischen Ernte erhöhte Aktivität aufwies (Ernte 2000 > Ernte 1999 k > Ernte 1998 k bzw. Ernte 2000 > Ernte 1999 n > Ernte 1998 n) (Diagramm 6.2). Dabei war der Effekt bei den in Schale und Umgebungstemperatur gelagerten (Ernte 1999 n, Ernte 1998 n) größer als bei geschlagen und unter Kühlung gelagerten Kernen.

Die Unterschiede in der Lipoxygenase- Aktivität zwischen frischen und gelagerten Haselnusskernen waren nicht signifikant (Diagramm 6.3). Es konnte nach der Lagerung lediglich eine im Vergleich zur frischen Ernte leicht geringere Aktivität festgestellt werden.

Auch die Phenoloxidase zeigt absolut eine geringe Aktivität und bei der Alterung eine Abnahme (Diagramm 6.4).

Die ADH (Diagramm 6.5) zeigte die größten Aktivitätsunterschiede. Während nach einer Alterung und Lagerung der Haselnüsse in Schale (Umgebungstemperatur) die ADH-Aktivität nur 1/10 der Aktivität einer frischen Ware aufwies (Ernte 2000 < Ernte 1999 n < Ernte 1998 n), war die Aktivität bei einer Lagerung von 2 Jahren ohne Schale unter Kühlung (Ernte 2000 > Ernte 1999 k > Ernte 1998 k) doppelt so hoch.

Tabelle 6.2

## Wassergehalt [%] der Proben nach IVV

Kalibrierung	Wassergehalt [%]		
	<11	11-13	>13
Ernte 2000	4,9	4,4	4,3
Ernte 1999 n	4,0	3,7	3,5
Ernte 1999 k	4,3	4,0	3,7
Ernte 1998 n	4,0	3,6	3,5
Ernte 1998 k	4,3	3,9	3,7

Tabelle 6.3

## Ölgehalt [%] der Proben nach IVV

Kalibrierung:	Ölgehalt [%]		
	<11	11-13	>13
Ernte 2000	59,2	62,9	65,0
Ernte 1999 n	62,9	65,8	67,7
Ernte 1999 k	61,9	65,4	67,7
Ernte 1998 n	60,6	64,6	67,1
Ernte 1998 k	61,1	65,4	67,0

Tabelle 6.4

## Proteingehalt [%] der Proben nach IVV

Kalibrierung:	Proteingehalt [%]		
	<11	11-13	>13
Ernte 2000	18,4	17,5	16,2
Ernte 1999 n	15,9	15,0	14,6
Ernte 1999 k	15,9	15,2	14,8
Ernte 1998 n	16,0	15,4	14,8
Ernte 1998 k	16,2	15,7	15,4

Tabelle 6.5

## Anteil der Linol- und Ölsäure an der Triglyceridzusammensetzung nach IVV

Kalibrierung:	L-haltige /O-haltige TG [%]		
	<11	11-13	>13
Ernte 2000	15,8 / 73,0	10,6 / 79,2	8,6 / 83,0
Ernte 1999 n	12,5 / 80,3	10,3 / 80,3	8,5 / 81,2
Ernte 1999 k	15,4 / 75,5	10,2 / 82,0	7,9 / 84,3
Ernte 1998 n	17,4 / 75,7	15,2 / 73,8	10,4 / 79,0
Ernte 1998 k	16,7 / 76,6	11,6 / 80,5	9,1 / 83,0

Tabelle 6.6

**Induktionszeiten (Ranzimat) von extrahiertem Haselnussöl nach IVV**

Kalibrierung	Induktionszeit [h]		
	<11	11-13	>13
Ernte 2000	7,5	10,0	10,3
Ernte 1999 n	-	-	11,2
Ernte 1999 k	7,2	10,3	10,7
Ernte 1998 n	4,7	8,6	-
Ernte 1998 k	7,0	-	11,2

Tabelle 6.7

**Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuren von rohen Haselnüssen nach Um-/Veresterung (FAME) der Ernte 1998 n nach IVV**

Kalibrierung	FAME [%]		
	<11	11-13	>13
C16	5,7	5,7	5,8
C16:1	0,2	0,2	0,2
C18	0,4	n.n	n.n
C18:1	74,3	78,9	81,0
C18:2	17,1	12,6	10,1
C18:3	n.n	n.n	n.n
C20	2,3	2,6	2,8

Diagramm 6.2

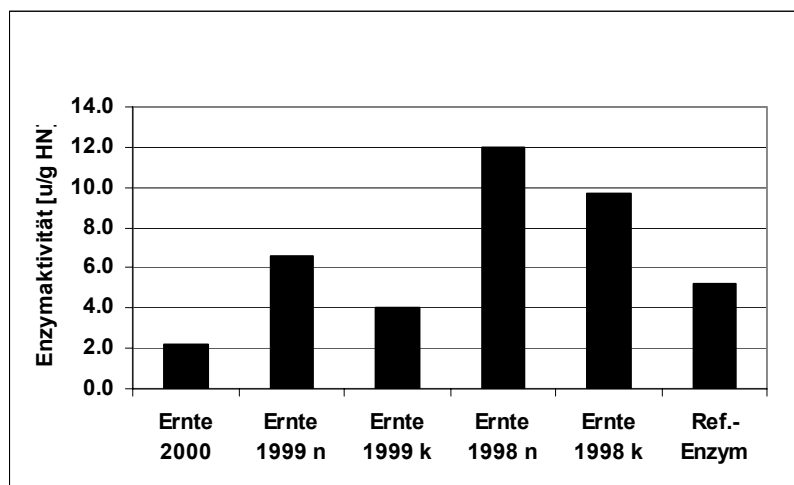
**Peroxidase-Aktivität roher Haselnusskerne nach IVV**

Diagramm 6.3

Lipoxidase-Aktivität in rohen Haselnusskernen nach IVV

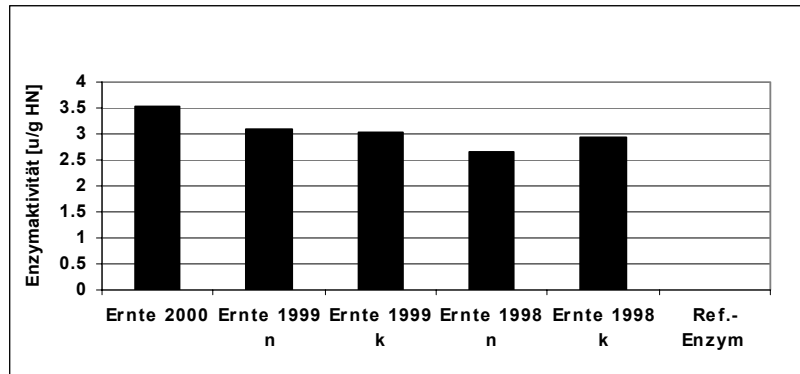


Diagramm 6.4

Phenoloxidase-Aktivität roher Haselnusskerne nach IVV

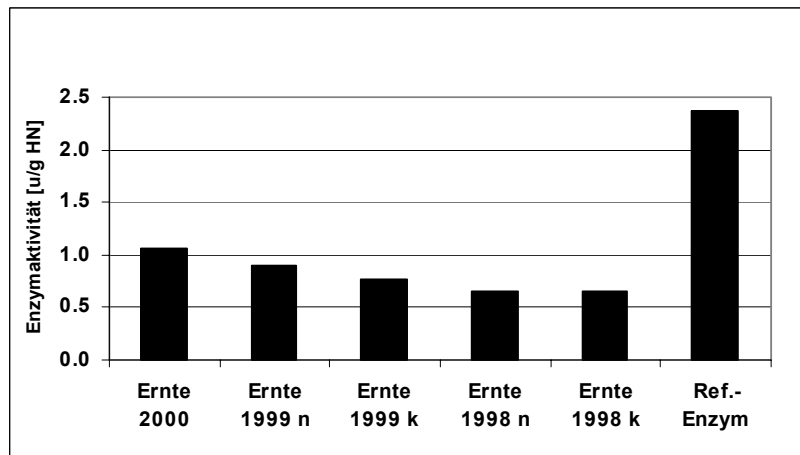
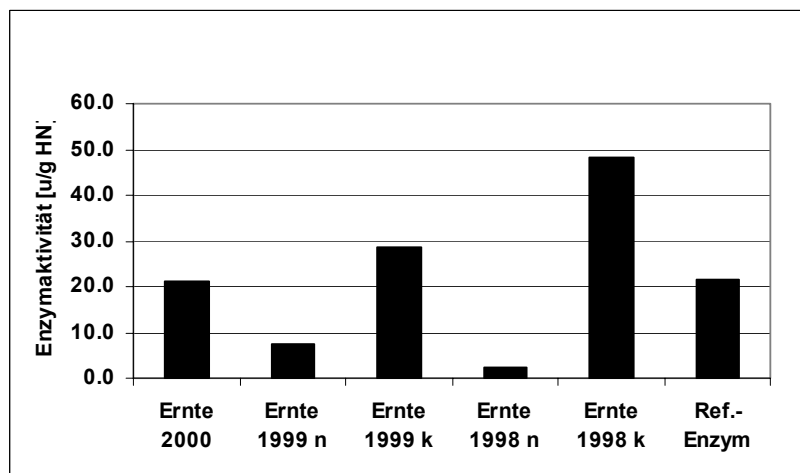


Diagramm 6.5

Alkoholdehydrogenase in rohen Haselnusskernen nach IVV





## Literaturverzeichnis

Ackurt F, Özdemir M, Biringen G, Löker M (1999): Effects of geographical origin and variety on vitamin and mineral composition of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) *FOOD CHEM* **65**: 309 – 313.

Alasalvar C, Shahidi F, Liyanapathirana C M, Ohshima T (2003): Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1. Compositional Characteristics *J AGR FOOD CHEM* **51**: 3790 – 3796.

Alasalvar C, Shahidi F, Ohshima T, Wanasundara U, Yurttas H C, Liyanapathirana C M, Rodrigues F B (2003): Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellana* L.). 2. Lipid Characteristics and Oxidative Stability *J AGR FOOD CHEM* **51**: 3797 – 3805.

Barthel G, Laskawy G, Grosch W (1974): Untersuchungen über den oxidativen Fettverderb von Haselnußkernen *DEUT LEBENS-M-RUNDSCH* **70 (6)**: 201 – 204.

Becker H G O, Berger W, Domschke G, Fanghänel E, Faust J, Fischer M, Gentz F, Gewalt K, Gluch R, Mayer R, Müller K, Pavel D, Schmidt H, Schollberg K, Schwetlick K, Seiler E (1993): Organikum *DT VERL DER WISS* **19. Aufl.**: 376 – 377.

Belitz H D, Grosch W, Schieberle P (2001): Lehrbuch der Lebensmittelchemie *SPRINGER VERLAG BERLIN* **5. Aufl.**: 335 – 337.

Bemelmans J M H (1979): Review of Isolation and Concentration Techniques *PROGRESS IN FLAVOR RESEARCH, APPL SCI PUBL LONDON* **8**: 79 – 98.

Bernardo-Gil M G, Grenha J, Santos J Cardoso P (2002): Supercritical fluid extraction and characterisation of oil from hazelnut *EUR J LIPID SCI TECHNOL* **104**: 402 – 409.

Bhattacharjee P, Ranganathan T V, Singhal R S, Kulkarni P R (2003): Comparative aroma profiles using supercritical carbon dioxide and Likens-Nickerson extraction from a commercial brand of Basmati rice *J SCI FOOD AGRIC* **83 (9)**: 880 – 883.

Blanch G P, Caja M M, Ruiz Del Castillo M L R, Herraiz M (1998): Comparison of Different Methods for the Evaluation of the Authenticity of Olive Oil and Hazelnut Oil *J AGR FOOD CHEM* **46**: 3153 – 3157.

Bonvehí J S (1993): Oil content, stability and fatty acid composition of the main varieties of Catalonian hazelnuts (*Corylus avellana* L.) *FOOD CHEM* **48**: 237 – 241.

Bonvehí J S, Rosúa N S (1996): Enzymatic activities in the varieties of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) grown in Tarragona, Spain *FOOD CHEM* **56**: 39 – 44.

Day E A, Anderson D F (1965): Gas Chromatographic and Mass Spectral Identification of Natural Components of the Aroma Fraction of Blue Cheese *J AGR FOOD CHEM* **13(1)**: 2 – 4.

Deibler K D, Acree T E, Lavin E H (1999): Solid Phase Microextraction Application in Gas Chromatography/Olfactometry Dilution Analysis *J AGR FOOD CHEM* **47(4)**: 1616 – 1618.

Elmore J S, Erbahadir M A, Mottram D S (1997): Comparison of Dynamic Headspace Concentration on Tenax with Solid Phase Microextraction for the Analysis of Aroma Volatiles *J AGR FOOD CHEM* **45 (7)**: 2638 – 2641.

Engen T, Pfaffmann C (1959): Absolute judgments of odour intensity *J EXP PSYCHOL* **58**: 22 – 26.

Fincke, A (1981): Untersuchungen zur Zusammensetzung von Haselnußkernen und süßen Mandeln verschiedener Herkunft *GORDIAN* **81(11)**: 253 – 256.

Fincke A (1981): Untersuchungen zur Zusammensetzung von Haselnußkernen und süßen Mandeln verschiedener Herkunft *GORDIAN* **11**: 253– 256.

Gertz (2002): Persönliches Gespräch, [gertz@cua-hagen.de](mailto:gertz@cua-hagen.de)

Glusman G, Bahar A, Sharon D, Pilpel Y, White J, Lancet D (2000): The olfactory receptor gene superfamily: data mining, classification, and nomenclature *MAMM GENOME* **11(11)**:1016 – 23.

Glusman G, Yanai I, Rubin I, Lancet D (2001): The complete human olfactory subgenome *GENOME RES* **11(5)**:685-702.

Grosch W (1990): Analyse von Aromastoffen *CHEM UNSERER ZEIT* **24 (2)**: 82 – 89.

Güntert M, Emberger R, Hopp R, Köpsel M, Silberzahn W, Werkhoff P (1991): Chirospecific analysis in flavor and essential oil chemistry. Part A. Filbertone – the character impact odorant of hazelnuts *Z LEBENSM UNTERS FORSCH* **192**: 108 – 110.

Guth H (1991): Verderb von Sojaöl unter Einwirkung von Licht und Sauerstoff – Identifizierung der Aromastoffe und Vorläufer *DISSERTATION* Technische Universität München.

Guth H, Grosch W (1989): 3-Methylnonane-2,4-dione - an intense odour compound formed during flavour reversion of soya-bean oil *FAT SCI TECHNOL* **91**: 225 – 230.

Guth H, Grosch W (1990): Deterioration of soya-bean oil: quantification of primary flavour compounds using a stable isotope dilution assay *LEBENSM WISS TECHNOL* **23**: 513 – 522.

Guth H, Grosch W (1993): Quantitation of Potent Odorants of VirginOlive Oil by Stable-Isotope Dilution Assays *JAACS* **70 (5)**: 513 – 516.

Guth H, Grosch W (1994): Aromastoffe in Haferextrudaten Haferextrudate *GMB* **6**: 50 – 52.

Grosch W, Laskawy G, Senser F (1982): Lagerstabilität gerösteter Haselnüsse *ZSW* **35**: 127 – 130.

Grosch W, Konopka U C, Guth H (1992): Characterization of off-flavors by aroma extract dilution analysis In: Lipid Oxidation in Food (St. Angelo AJ, ed) *ACS SYMPOSIUM SERIES, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, Washington, DC **500**: 266 – 278.

Hadorn H, Keme T, Kleinert J, Messerli M, Zürcher K (1977): So verhalten sich Haselnüsse unter verschiedenen Lagerbedingungen (I) *ZSW* **30 (4)**: 120 – 126.

Hadorn H, Keme T, Kleinert J, Messerli M, Zürcher K (1977): So verhalten sich Haselnüsse unter verschiedenen Lagerbedingungen (II) *ZSW* **30 (5)**: 170 – 180.

Hadorn H, Keme T, Kleinert J, Messerli M, Zürcher K (1978): Lagerungsversuche und Qualitätsprüfungen an Haselnüssen *GORDIAN* **10**: 300 – 310.

Hadorn H, Keme T, Kleinert J, Messerli M, Zürcher K (1978): Lagerungsversuche und Qualitätsprüfungen an Haselnüssen (Fortsetzung) *GORDIAN* **11**: 342 – 348.

Hadorn H, Zürcher K (1977): Nachteilige Veränderungen von Haselnüssen während der Lagerung *GORDIAN* **5**: 114 – 120.

Heitkamp K (1999): Entwicklung von Detektionssystemen für die HPLC-Bestimmung von Lipidhydroperoxiden *DISSERTATION* Bergische Universität Wuppertal.

Hérent M F, Collin S (1998): Pyrazine and Thiazole Structural Properties and Their Influence on the Recovery of Such Derivatives in Aroma Extraction Procedures *J AGR FOOD CHEM* **46 (5)**: 1975 – 1980.

Hofmann T, Schieberle P, Krummel C, Freiling A, Bock J, Heinert L, Kohl D (1997): High resolution gas chromatography/selective odorant measurement by multisensor array (HRGC/SOMA): a useful approach to standardise multisensor arrays for use in the detection of key food odorants *SENSORS AND ACTUATORS B* **41**: 81 – 87.

Jackson J F, Linskens H F (2002): Analysis of Taste and Aroma *SPRINGER-VERLAG BERLING HEIDELBERG* **1. Auflage**.

Jauch J, Schmalzing D, Schurig V, Emberger R, Hopp R, Köpsel M, Silberzahn W, Werkhoff P (1989): Isolierung, Synthese und absolute Konfiguration von Filberton, dem aktiven Prinzip des Haselnußaromas *ANGEW CHEM* **101(8)**: 1039 – 1041.

Kaiser H, Specker H (1956): Bewertung und Vergleich von Analysenverfahren *Z ANAL CHEM* **149**: 46 – 66.

Kinderlerer J L, Johnson S (1992): Rancidity in Hazelnut due to Volatile Aliphatic Aldehydes *J SCI FOOD AGRIC* **58**: 89 – 93.

Kinlin T E, Muralidhara R, Pittet A O, Sanderson A, Walradt J P (1972): Volatile Components of Roasted Filberts *J AGR FOOD CHEM* **20** (5): 1022 – 1028.

Kleinert J (1959): *INTERN FACHSCHR SCHOK IND* **14**: 2,50,98,146.

Laing D G, Wilcox M E (1983): Perception of components in binary odour mixtures *CHEM SENSES* **7**: 249 –.

Lawless H T (1999): Descriptive analysis of complex odors: reality, model or illusion? *FOOD QUALITY PREF* **10**: 325 – 332.

Lin J, Welti D H, Arce Vera F, Fay L B, Blank I (1999): Synthesis of Deuterated Volatile Lipid Degradation Products To Be Used as Internal Standards in Isotope Dilution Assays. 1. Aldehyds *J AGR FOOD CHEM* **47**: 2813 – 2821.

Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck L B (1999): Combinatorial receptor codes for odors *CELL* **96** (5): 713 – 723.

Matsui T, Guth H, Grosch W (1998): A comparative study of potent odorants in peanut, hazelnut und pumpkin seed oils on the basis of aroma extract dilution analysis (AEDA) and gas chromatography-olfactometry of headspace samples (GCOH) *LIPID* **100** (2): 51 – 56.

Matthäus B, Fiebig H J (1999): Die sensorische Untersuchung von Speiseölen – Teil 1 *VERBRAUCHERDIENST* **44** (1): 11 – 15.

Matthäus B, Fiebig H J (1999): Die sensorische Untersuchung von Speiseölen – Teil 2 *VERBRAUCHERDIENST* **44** (2): 34 – 37.

Melchior D (2001): Entwicklung von MEKC- und HPLC-Methoden zur Bestimmung von Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxiden und Hydroxyfettsäuren *DISSERTATION BERGISCHE UNIVERSITÄT WUPPERTAL*.

Melchior D, Gäb S (2000): Simultaneous micellar electrokinetic chromatographic determination of isomeric fatty acid hydroperoxides and corresponding hydroxy fatty acids *J CHROMATOGRAPHY A* **894**: 145 – 155.

Parcerisa J, Codony R, Boatella J, Rafecas M (1999): Triacylglycerol and Phospholipid Composition of Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Lipid Fraction during Fruit Development *J AGRIC FOOD CHEM* **47**: 1410 – 1415.

Parcerisa J, Richardson D, Rafecas M, Codony R, Boatella J (1997): Fatty acid Distribution in Polar and Nonpolar Lipid Classes of Hazelnut Oil (*Corylus avellana* L.) *J AGRIC FOOD CHEM* **45**: 3887 – 3890.

Parcerisa J, Richardson D, Rafecas M, Codony R (1998): Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) harvested in Oregon (USA) *J CHROMATOGR A* **805**: 259 – 268.

Pfner P, Matsui T, Grosch W, Guth H, Hofmann T, Schieberle P (1999): Development of a Stable Isotope Dilution Assay for the Quantification of 5-Methyl-(E)-2-hepten-4-one: Application to Hazelnut Oils and Hazelnuts *J AGR FOOD CHEM* **47(5)**: 2044 – 2047.

Pillonel L, Bosset J O, Tabacchi R (2002): Rapid Preconcentration and Enrichment Techniques for the Analysis of Food Volatile. A Review *LEBENS WISS TECHNOL* **35**: 1 – 14.

Radtke R (1965): Orientierende Untersuchungen über die Langzeitlagerung ungerösteter Haselnüsse *SÜSSWAREN* **19**: 1106 – 1110.

Radtke R, Heiss R (1971): Über das Lagerverhalten von Erdnüssen türkischer Provenienz *SÜSSWAREN* **3**: 103 – 106.

Radtke R, Heiss R (1971): Über das Lagerverhalten von Haselnüssen türkischer Provenienz *SÜSSWAREN* **4**: 137 – 142.

Pfannkoch E (2000): Comparison of the sensitivity of static headspace GC, solid phase microextraction, and direct thermal desorption for analysis of volatiles in solid matrices. In: Sandra P, Rackstraw A J (2000): *PROCEEDING OF THE 23<sup>RD</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY* Riva del Garda, Italy, June 5-10, 2000, I.O.P.M.S., Kortrijk, Belgium.

Reetz M, Haning H (1993):  $\alpha$ -Methylation of Ketones via Manganese-Enolates: Absence of Undesired Polyalkylation *TETRAHEDRON LETT* **34(46)**: 7395 – 7398.

Ren Y L (2001): Comparison of Solvent Extraction and Microwave Extraction for Release of Dimethyl Sulfide from Cereals and Canola *J AGR FOOD CHEM* **49 (4)**: 1737 – 1739.

Rieblinger K, Guth H (2002): [http://www.ivv.fhg.de/no\\_html/12520\\_kb.pdf](http://www.ivv.fhg.de/no_html/12520_kb.pdf)

Rieblinger K (1999): Neue Methoden zur Beurteilung von Haselnusskernen, Teil IV *ZSW* **48**: 74 – 76.

Rieblinger K Ziegler G (1995): Neue Methoden zur Beurteilung von Haselnusskernen, Teil I *ZSW* **48**: 457 – 459.

Rieblinger K Ziegler G (1995): Neue Methoden zur Beurteilung von Haselnusskernen, Teil II *ZSW* **48**: 504 – 505.

Sandmeier D (1996): Zur Bildung primärer Alkohole und niederer Carbonsäuren in rohen Haselnüssen während der Lagerung *DEUT LEBENS WISS RUNDSCH* **92 (8)**: 239 – 242.

Schäfer H (2002): Analysenmethoden zur raschen Bewertung der Frische und des beginnenden Verderbs von Haselnüssen *VERLAGSHAUS MONSENSTEIN UND VANNERDAT, MÜNSTER*.

Schäfer H, Schulte E, Thier H P (2002): A novel and simple approach for assessing the freshness of hazelnuts *EUR FOOD RES TECHNOL* **215**: 249 – 254.

Schäfer H, Schulte E, Thier H P (2003): Glycerol Content of Hazelnuts as Indicator of Microbial Spoilage *DEUT LEBENSM RUNDSCHE* **99** (4): 143 – 146.

Scherz H, Senser F (2000): Die Zusammensetzung der Lebensmittel Nährwert-Tabellen. *VERLAG MEDPHARM, STUTTGART* **6. Aufl.**: 1016 – 1017.

Schmitz O (1997): Entwicklung kapillarelektrophoretischer Methoden zur Analyse von Fettsäurehydroperoxiden *DISSERTATION BERGISCHE UNIVERSITÄT WUPPERTAL*.

Schmitz O, Melchior D, Schuhmann W, Gäb S (1998): Postcolumn derivatisation for selective laser-induced fluorescence detection in micellar electrokinetic chromatography of fatty acid hydroperoxides *J CHROMATOGRAPHY A* **814**: 261 – 265.

Schmitz O, Gäb S (1997): Separation isomeric hydroperoxides of unsaturated fatty acids by capillary electrophoresis *J CHROMATOGRAPHY A* **767**: 249 – 253.

Schmitz O, Gäb S (1997): Separation of unsaturated fatty acids and related isomeric hydroperoxides by micellar electrokinetic chromatography *J CHROMATOGRAPHY A* **781**: 215 – 221.

Schnermann P, Schieberle P (1997): Evaluation of Key Odorants in Milk Chocolate and Cocoa Mass by Aroma Extract Dilution Analyses *J AGR FOOD CHEM* **45**: 865 – 872.

Sheldon, R M, Lindsay R C, Libbey (1972): Identification of volatile flavour compounds from roasted filberts *J FOOD CHEM* **37**: 313 – 316.

Silberzahn W (1988): Gaschromatographische – Massenspektrometrische Untersuchungen von Aromastoffen in Haselnüssen (*Corylus Avellana*) *DISSERTATION TECHNISCHE UNIVERSITÄT BERLIN*.

Sturm W (1979): Praktische Qualitätsprüfungen an Haselnüssen *DEUT LEBENSM RUNDSCHE* **75** (3): 85 – 88.

Ullrich F, Grosch W (1987): Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid *Z LEBENSM UNTERS FORSCH* **184**: 277 – 282.

*Verordnung (EG) Nr. 1284/2002* vom 15 Juli 2002 zur Festlegung der Vermarktungsnorm für Haselnüsse in der Schale.

Wilkes J G, Conte E D, Kim Y, Holcomb M, Sutherland J B, Miller D W (2000): Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods *J CHROMATOGR A* **880**: 3 – 33.

Yamini Y, Sefidkon F, Pourmortazavi (2002): Comparison of essential oil composition of Iranian fennel (*Foeniculum vulgare*) obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL* **17** (5): 345 – 348.

Ziegleder G, Rieblinger K (1999) Neue Methoden zur Beurteilung von Haselnusskernen, Teil III *ZSW* **52**: 18 – 21.

Ziegleder G, Rieblinger K (2000) Bedeutung der Oberflächenschicht für die Haltbarkeit gerösteter Haselnüsse, Teil I *ZSW* **4**: 104 – 106.

Ziegleder G, Rieblinger K (2000) Bedeutung der Oberflächenschicht für die Haltbarkeit gerösteter Haselnüsse, Teil II *ZSW* **5**: 125 – 126.

Ziegleder G, Sandmeier D (1983): Röstgradbestimmung von Kakao mittels Hochdruckflüssigchromatographie *DEUT LEBENSM-RUNDSCH* **79** (10): 343 – 347.

Zozulya S, Echeverri F, Nguyen T (2001): The human olfactory receptor repertoire *GENOME BIOLOGY* **2**(6): 0018.1-0018.12.

Zürcher K, Hadorn H (1975): Qualitätsbeurteilung von Haselnußkernen *MITT GEBIETE LEBENSM HYG* **66**: 191 – 224.

## Chemikalienliste

Acetaldehyd	Fluka
Acetonitril, p.a.	Roth
$\alpha$ -Pinen	Fluka
2-Aminoacetophenon	Sigma
Ammoniumchlorid	Aldrich
$\beta$ -Pinen	Aldrich
Buttersäureethylester	Aldrich
2-Butylamin	Aldrich
Buttersäure	Riedel de Haen
Chloroform-d	Cambridge izotop
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Camphen	Merck
3-Caren	Aldrich
Citral	Merck
$\beta$ -Citronellol	Aldrich
(E,E)-2,4-Decadienal	Aldrich
Decan	Aldrich
Decanal	Aldrich
2-Decanon	Aldrich
3-Decanon	Aldrich
(E)-2-Decenal	Sigma
2-Dichloro-1,4-butin	Aldrich
Diethylether, p.a (destilliert)	Roth
Dimethylsulfoxid	Aldrich
Docosan	Aldrich
Dodecan	Aldrich
Dotriacontan	Aldrich
EDTA	Merck
Essigsäure, p.a (100%)	Merck
Eicosan	Aldrich
Ethylbromid	Aldrich
Ethanol-d	Aldrich
Ethylcaprylat	Aldrich
Ethyloctanoat	Lancaster
Ethylmagnesiumbromid	Aldrich
Eugenol	München
$\gamma$ -Terpinen	Aldrich
Geraniol	Aldrich
Glycylglycin	ICN Biomedicals



Heneicosan	Aldrich
Heptadecan	Aldrich
Heptan	Aldrich
1-Heptanal	Aldrich
4-Heptanon	Lancaster
Hexacosan	Aldrich
Hexadecan	Aldrich
Hexan	Aldrich
1-Hexanal	Aldrich
Hexansäureethylester	Aldrich
Hexatriacontan	Aldrich
Iodmethan	Aldrich
2-Isobutyl-3-methoxypyrazin	Sigma
Isoluminol	Sigma
(6-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion)	
Kieselgel 60 (40-63µm)	Macherey Nagel
LiChroprep Si 60 (40-63µm)	Merck
(R)- (+)-Limonen (97%)	Sigma
(±)-Linalool	Aldrich
Linolsäure	Aldrich
Linolensäure	Aldrich
Lipase	Sigma
Lipoxygenase (6*10 <sup>4</sup> -12*10 <sup>4</sup> Units /mg)	Sigma
Lithium-bis-(trimethyl-silyl)amid	Lancaster
Luminol (5-Amino-,1,2,3,4-tetrahydro-phthalazin-1,4-dion)	Sigma
Magnesiumsulfat	Aldrich
Mangan-(II)-bromid, wasserfrei	Fluka
Methyldichlorid	Aldrich
Methyl-5-3-heptanon	Lancaster
(E)-5-Methyl-4-hepten-2-on	Lancaster
(E)-6-Methyl-5-hepten-2-on	Aldrich
Natriumborhydrid	Merck
Nonadecan	Aldrich
(E,E)-2,4-Nonadienal	Aldrich
Nonan	Aldrich
1-Nonanal	Aldrich
2-Nonanon	Sigma
Octacosan	Aldrich

Octadecan	Aldrich
Octan	Aldrich
Octanal	Lancaster
Octansäure	Merck
Ölsäure	Aldrich
Pentacosan	Aldrich
Pentadecan	Fluka
Pentan	Aldrich
Pentanal	Sigma
Phenylethanol	Aldrich
Propionaldehyd	Aldrich
Pyridin	Pierce
Pyridiniumdichromat	Sigma
Pyrrol	Fluka
2-Pyrrolidon	BASF
Seesand	Merck
Tetracosan	Aldrich
Tetrahydrofuran	
Tetrahydro-2-pyrimidon	Aldrich
Tetratriacontan	Aldrich
Tridecan	Aldrich
Triacontan	Aldrich
Tricosan	Aldrich
Triethylamin	Fluka
Tween 20	Sigma
Undecan	Aldrich
2-Undecanon	Aldrich
Vanillin	Merck

## Geräteliste

GC System	Injektor: Chromapack TCT/PTI CP 4010/4020 Ofen: Hewlett Packard GC 5890 Series II Detektor: HP 5971 Series MSD Detektor: HP FID Detektor: Sniffing-Port Integrator Merck Hitachi D-7000
GC System	Injektor: HP On Column Ofen: Hewlett Packard GC 5890 Series II Detektor: Hewlett Packard 5971 Series MSD Detektor: HP FID Integrator Merck Hitachi D-7000
GC System	Injektor: Carlo Erba On Column Ofen: Carlo Erba 5160 Detektor: Carlo Erba FID Detektor: Sniffing Port Schreiber Kipp und Zonen Typ BDIII
GC System	Injektor: Carlo Erba On Column Ofen: Carlo Erba GC 8000TOP Detektor: Carlo Erba FID Detektor: Sniffing-Port Integrator Merck Hitachi D-7000
GC System	Autosampler: Combi Pal CTC Injektor: ATAS Deutschland DTD-Injektionssystem Optic2 Kryofokussierung SGE CO2 Cryogenic Cold Trap Ofen: Agilent 6890 Detektor: LECO Instruments Pegasus II TOF-MSD, Steuerungs- und Auswertesoftware ChromaTOF 1.41
GC-Kapillare	J&W DB-FFAP 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, 30 m Länge
GC-Kapillare	J&W DB-5 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, 30 m Länge

GC-Kapillare	J&W DB-1701 0,18 mm ID, 0,4 µm Filmdicke, 20 m Länge
GC-Kapillare	Restek RTX-5 0,18 mm ID, 0,2 µm Filmdicke, 20 m Länge
CE-System	Beckman P/ACE 5510 Beckman Diodenarra-Detektor Steuerungs- und Auswertesoftware P/ACE 32 Karat, Version 1.1
CE-Kapillare	CS-Chromatographie Fused-silica Kapillare ID: 50µm
HPLC-System	Autosampler Waters alliance 2690 Separation Module Probenschleife 100µl Eluentenpumpe Waters 2690 Separation Module Detektor Merck Hitachi L-7420 Detektor Jasco Intelligent CL-825 Steuerungs- und Auswertesoftware Millenium32 Version 3.5
HPLC-System	LaChrom Merck Hitachi Hochdruckgradientenpumpe L-7100 Probenschleife 100µl Detektor: Merck Hitachi UV-Detektor L-7400 Integrator:Merck Hitachi D-7000
HPLC-Säule	Fluofix-RP-Säule NEOS Company Säulenmaße: 250 mm Länge 46 mm ID Teilchengröße: 5 µm
Flash-Chromatographie	Merck System Superformance Säule 31cm Länge, 16mm Innendurchmesser, Kieselgel 60 Korngröße 0,04-0,063mm LC Pumpe Kontron 414-T Fraktionssammler Pharmacia LKB Redi Frac mit UV-Detektion LKB 2138 UV/CORD 5
Hochvakuum- Destillation	Glasbläserei Universität Wuppertal, Destillationsanlage

Schüttler	Eppendorff Mixer 5432
Mühle	IKA Universalmühle M 20
Presse	SPECAC KBr-Press
Presse	Hydraulische Presse, Universität Wuppertal
Rotationsverdampfer	Jouan RC 10.22, RCT 90
Waage	Satorius Universal
Waage	Satorius M2P Feinwaage
Zentrifuge	HERMLE Z 200 A