

**Olivenöl: Untersuchungen zur Herkunft und Authentizität mittels Multielement-
Isotopenverhältnismassenspektrometrie**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Michael Menzel
aus Würzburg

Würzburg 2010

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: _____
2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____
2. Prüfer: _____
3. Prüfer: _____

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Dank

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2005 bis April 2009 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Schreier angefertigt. Ihm möchte ich herzlich für meine Ausbildung, die Betreuung der Arbeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen und ganz besonders aber für die mir zugestandene akademische Freiheit danken.

Herrn Dr. Schäfer-Schuchardt, Würzburg, sei an dieser Stelle für die vielen wertvollen Diskussionen über die Olivenölherstellung und für die von ihm bereitgestellten Ölproben gedankt. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Valotis, dessen im Olivenölmarkt tätige griechische Verwandten für authentisches Probenmaterial sorgten -auch wenn der griechische Zoll trotz EU-Binnenmarkt gelegentlich einen Strich durch die Rechnung machte.

Meiner ehemaligen Kommilitonin und Kollegin, Frau Helena Kroll, danke ich für die stets ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Betreuung der Studierenden und –weitaus schwieriger- für die „Bemutterung“ der Finnigan Delta plus XL-Anlage, an der man Murphys Law tagtäglich von neuem hautnah erleben konnte. Es ist schade, dass sich unsere Wege nach nunmehr 8 Jahren trennen -aber man soll ja aufhören, wenn´s am schönsten ist! Selbiges trifft auch auf Max Kurlbaum zu, nur dass dies mit 18 Jahren Kollaboration (Abiturschule, halbes Studium & Promotion) ein deutlich schwererer Fall ist.

Meinem Kollegen Dr. Kempf sei für die Übersetzung meiner hochpräzisen Temperaturprogramme („gut durchbraten“) in die Maschinensprache der GC-MS gedankt.

Meinen F-Praktikantinnen Jeanett Hohm, Susanne Rückert, Nora Rempfer und Ria Born möchte ich für ihr Engagement danken und hoffe, dass ihnen das F-Praktikum nicht nur ein wenig Spass gemacht hat, sondern auch zur Entfaltung einer selbstständigen Wissenschaftspersönlichkeit beigetragen hat.

Herrn Stefan Englert danke ich für die Hilfestellung bei der Benutzung der Statistiksoftware. Natürlich darf ich auch die „Drei von der Werkstatt“ - Georg, Matthias und Karl- nicht vergessen, die unermüdlich nicht nur die Gasflaschen gewechselt haben sondern auch bei einer Vielzahl technischer Probleme immer schnell Abhilfe schafften und ohne die der –nicht gerade preiswerte- Servicetechniker von Thermo öfter hätte anrücken müssen. Thomas und Fritz sei gedankt, dass sie immer unsere Heizungen repariert haben, ohne die wahrscheinlich ein Teil des Lehrstuhlpersonals den harten unterfränkischen Winter nicht überstanden hätte! Pierre und Andi („Mr. Zehntausend-Volt“) danke ich für die schnelle Lösung aller unserer zahlreichen elektrischen Probleme & Problemchen (Leuchtmittel).

Herrn Dr. Bernd Reyer sei für die Reparatur der vielen defekten Rechner gedankt.

*À la fin, c'est trop bête de ne vivre que dans la peste. Bien entendu, un homme doit se battre [...].
Mais s'il cesse de rien aimer par ailleurs, à quoi sert qu'il se batte?*

A.Camus

Inhaltsverzeichnis

- 1. Einleitung und Zielsetzung **5**

- 2. Kenntnisstand **8**
 - 2.1 Stabile Isotopen **8**

 - 2.2 Isotopenfraktionierungen von Wasserstoff **12**
 - 2.2.1 Thermodynamische Isotopenfraktionierungen **12**
 - 2.2.2 Isotopenfraktionierungen in Pflanzen **15**

 - 2.3 Isotopenfraktionierungen von Kohlenstoff **18**
 - 2.3.1 Thermodynamische Isotopenfraktionierungen **18**
 - 2.3.2 Isotopenfraktionierungen von Kohlenstoff in Pflanzen **19**

 - 2.4 Isotopenfraktionierungen von Sauerstoff **23**
 - 2.4.1 Thermodynamische Isotopenfraktionierungen **23**
 - 2.4.2 Isotopenfraktionierungen in Pflanzen **24**

 - 2.5 Anwendung und Methodik der Stabilisotopenanalyse in der Lebensmittelchemie **26**
 - 2.5.1 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie **26**
 - 2.5.1.1 Elementaranalyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-IRMS) **27**
 - 2.5.1.1.1 Elementaranalyse-Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-C-IRMS) **28**
 - 2.5.1.1.2 Elementaranalyse-Pyrolyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-P-IRMS) **29**
 - 2.5.1.2 Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS) **31**
 - 2.5.1.2.1 Gaschromatographie-Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-C-IRMS) **32**
 - 2.5.1.2.2 Gaschromatographie-Pyrolyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-P-IRMS) **33**
 - 2.5.2 Deuterium-Kernresonanzspektroskopie SNIF-NMR © **34**
 - 2.5.3 Anwendungsgebiete der Stabilisotopenanalytik **35**
 - 2.5.3.1 Authentizitätskontrolle von Aromastoffen **36**
 - 2.5.3.2 Sonstige Anwendungen der Stabilisotopenanalyse **38**

 - 2.6 Olea europaea – Botanik **40**

 - 2.7 Olivenöl - Rechtliche Situation **42**

 - 2.8 Herstellung von Qualitätsolivenöl **46**
 - 2.8.1 Die Produktion von Qualitätsölen **46**
 - 2.8.2 Herstellung von verfälschtem Olivenöl **47**

- 2.9 Zusammensetzung des Olivenöls **51**
 - 2.9.1 Hauptkomponenten **51**
 - 2.9.1.1 Fettsäuren und Triacylglyceride **51**
 - 2.9.1.2 Biosynthese von Fettsäuren und Triacylglyceriden **53**
 - 2.9.2 Nebenbestandteile / Unverseifbares **63**
 - 2.9.2.1 Aroma / flüchtige organische Verbindungen **63**
 - 2.9.2.1.1 Qualitätsöle **63**
 - 2.9.2.1.2 Fehlparmen **67**
 - 2.9.2.2 Polyphenole **71**
 - 2.9.2.3 Sterole **73**
 - 2.9.2.4 Kohlenwasserstoffe **76**
 - 2.9.2.4.1 Alkane / Alkene **76**
 - 2.9.2.4.2 Sesquiterpene **78**
 - 2.9.2.4.3 Squalen **79**
 - 2.9.2.5 Tocopherole **89**
 - 2.9.2.6 Wachse **91**
 - 2.9.2.7 Pigmente **92**
 - 2.9.2.8 Diacylglyceride **96**
 - 2.10 Stabilisotopenmassenspektrometrie von Olivenöl **99**
- 3. Ergebnisse und Diskussion **107**
 - 3.1 Gesamtöl **107**
 - 3.2 Wachse **117**
 - 3.3 Grünnoten **118**
 - 3.4 Squalen **120**
 - 3.5 Fettsäuremethylester FSME **123**
 - 3.6 Weitere statistische Betrachtung **128**
- 4. Material und Methoden **131**
 - 4.1 Material **131**
 - 4.1.1 Chemikalien & Gase **131**
 - 4.1.2 Verbrauchsmaterial Elementaranalysator **132**
 - 4.1.3 Ölproben **132**
 - 4.2 Geräte **133**
 - 4.2.1 Kapillargaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS) **133**
 - 4.2.2 Elementaranalysator **134**
 - 4.2.3 Kapillargaschromatographie (HRGC-FID) **134**
 - 4.2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR) **134**
 - 4.2.5 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometer I (HRGC-MS) **135**

4.3 Methoden **136**

4.3.1 Fraktionierung des unbehandelten Öls zur Isolierung von Squalen **136**

4.3.2 Isolierung der Wachse durch Säulenchromatografie **136**

4.3.3 Isolierung der Wachse durch Festphasenextraktion (SPE) **137**

4.3.4 Herstellung der Fettsäuremethylester und Isotopenverhältnismessung über HRGC-P-IRMS **137**

4.3.5 Herstellung der Fettsäuremethylester und Isotopenverhältnismessung über HRGC-C-IRMS **138**

4.3.6 Isolierung des Unverseifbaren mittels kalter Verseifung **138**

4.3.7 Isolierung des Unverseifbaren nach enzymatischer Hydrolyse **138**

5. Literaturverzeichnis **140**

6. Anhang **166**

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACCase	Acetyl-CoA-Carboxylase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADP	Adenosindiphosphat
AOCS	American Oil Chemists' Society
ATP	Adenosintriphosphat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
CA	Crassulacean acid metabolism
CDP-ME	4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol
CDT	Canyon Diablo Troilite
CoA	Coenzym A
CTP	Cytidintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DG	Diacylglyceride
DGF	Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft
DMAP	3,3-Dimethylallyl-diphosphat
DOXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
DXS	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase
EA	Elementaranalysator
EA-C/P-IRMS	Elementaranalysator-(Pyrolyse/Verbrennungs)- Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie
EC	Enzyme Commission number
EI	Elektronenstoßionisation
ELSD	Lichtstreuendetektor
eV	Elektronenvolt
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FAAE	Fettsäurealkylester
FAS	Fettsäure-Synthase
FFA	Freie Fettsäuren
FFP	Farnesyldiphosphat
FID	Flammenionisationsdetektor
FMN	Flavinmononukleotid
FSME	Fettsäuremethylester
GC	Gaschromatographie

GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GISP	Greenland Ice Sheet Project
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaminsäure
HPL	Hydroperoxidlyase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRGC	Kapillargaschromatographie
HRGC-C/P-IRMS	Kapillargaschromatographie- (Pyrolyse/Verbrennungs)-Isotopenverhältnis- Massenspektroskopie
HRGC-MS	Kapillargaschromatographie- Massenspektro- skopie
i.d.	innerer Durchmesser
IAEA	Internationale Atomenergiebehörde
IPD / IPP	Isopent-3-enylpyrophosphat
IRMS	Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Che- mistry
LC-GC-FID	Flüssigkeitschromatographie- Gaschromatographie- Flammenionisationsdetektor
LDI-TOF-MS	Laser desorption/ionisation-time-of-flight Mas- senspektroskopie
LLE	Flüssig-flüssig Extraktion
LOX	Lipoxygenase
<i>m/z</i>	Masse-/Ladungsverhältnis
MDS	Multidimensionale Skalierung
MEP	Methylerythritol
MG	Monoacylglyceride
MS	Massenspektroskopie
MVA	Mevalonat
n.b.	nicht bestimmt
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (phosphat)
NBS	National Bureau of Standards
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMR	Kernmagnetresonanzspektroskopie
NP	Normalphase
o.d.	Äußerer Durchmesser

PCA	Principal compound analysis
PEP	Phosphoenolpyruvat
PLOT	porous-layer open-tabular column
ppm	parts per million
PSPP	Präsqualen-diphosphat
RP	Umkehrphase
RUBISCO	1,5-Ribulosebisphosphat-Carboxylase / Oxygenase
SDE	simultane Destillations-Extraktion
SLAP	Standard light antarctic precipitation
SNIF-NMR	Positionsspezifische Deuterium-Kernmagnetresonanzspektroskopie
SPE	Festphasenextraktion
SPME	Festphasenmikroextraktion
Tab.	Tabelle
TCD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
TG	Triacylglyceride
TLC	Dünnschichtchromatographie
TMS-OH	methanolische Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung
VO	Verordnung
VPDB	Vienna pee dee belemnite
VSMOW	Vienna standard mean ocean water
WLD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor

Zusammenfassung

Natives Olivenöl, ein wegen seiner allgemein als positiv betrachteten Wirkung auf die menschliche Gesundheit geschätztes, teures Öl, lässt sich nur aus Oliven hoher Qualität produzieren. Es gibt Autoren, die davon ausgehen, dass lediglich ein kleiner Teil (etwa 10 %) der geernteten Oliven geeignet ist, Spitzenqualitäten an nativen Ölen hervorzubringen. Dennoch finden sich in den Supermarktregalen fast nur Öle der höchsten Qualitätsstufe „extra nativ“. Man vermutet, dass dieses offensichtliche Missverhältnis von der Verwendung illegal teilraffinierter desodoriertes Öle (so z.B. Lampantöle) herrührt, um diese minderwertigen Ölsorten so zu „extra nativen“ Ölen unerlaubt aufzuwerten. Darüber hinaus erscheint es als wahrscheinlich, dass Olivenöle aus Ländern, die traditionell eine niedrige Qualität produzieren (meist außerhalb der EU), unter falscher Herkunftsangabe verkauft werden. Von legislativer Seite betrachtet, regelt die EU-Verordnung VO (EWG) Nr. 2068/91 Analysenmethoden und Qualitätsklassen speziell für Olivenöle. Da diese Angaben nicht mehr den aktuellen Anforderungen genügen und somit keine zuverlässige Basis zu Authentizitätsbewertungen liefern, ist die Entwicklung neuer Ansätze zur Authentizitäts- und Herkunftsanalytik von Olivenölen unausweichlich. Eine in vielen anderen Bereichen bewährte Methode ist hierbei die der Isotopenverhältnismassenspektroskopie (IRMS).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand der IRMS eine Methode zu entwickeln, mit der die Authentizität hochwertiger nativer Olivenöle überprüft werden kann. Im Gegensatz zu den wenigen in der Literatur veröffentlichten Modelluntersuchungen sollte dies durch Screening einer hohen Anzahl von Ölproben aus Groß- und Einzelhandel geschehen; so wurden von uns 165 Olivenöle untersucht, davon 50 aus Italien, 29 aus Spanien, 27 aus Frankreich, 23 aus Griechenland, 20 „Billigöle“ unbekannter Herkunft, 4 aus der Türkei, jeweils 3 aus Chile und Tunesien, jeweils 2 aus Portugal und Australien sowie jeweils 1 Öl aus Israel und den USA (Kalifornien). In Anbetracht der experimentellen Unzulänglichkeiten, die sich bei Messung von Ölproben, die unter kontrollierten Wachstums- und/oder Extraktionsbedingungen erhalten wurden, ergeben, wurde bewusst nahezu ausschließlich Handelsware untersucht.

Zunächst erfolgten Bestimmungen der Wasserstoff-, Kohlenstoff- und Sauerstoff-Isotopenverhältnisse der Olivenöle mittels Elementaranalysator- Isotopenverhältnismassenspektroskopie (EA-IRMS); die ermittelten Bereiche der Isotopenverhältnisse lagen für Wasserstoff zwischen $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -161$ und -114 ‰, für Kohlenstoff zwischen $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -31,7$ und $-26,1$ ‰, und zwischen $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} = 15,8$ und $31,1$ ‰ für Sauerstoff. Zudem wurde das Wasserstoff- und Kohlenstoff-Isotopenverhältnis des mittels Säulenchromatographie (SC) aus den Ölen jeweils isolierten Squalens ebenfalls anhand von EA-IRMS Analysen bestimmt. Die IRMS-Werte lagen zwischen $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -174$ und -144 ‰ sowie $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -32,3$ und $-26,6$

‰. Ferner erfolgten IRMS-Messungen in der Kopplung mit der Kapillargaschromatographie (HRGC-IRMS). So wurden die Wasserstoff-Isotopenverhältnisse von Palmitinsäure- und Ölsäuremethylester (Palmitinsäuremethylester $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -156$ und -95 ‰, Ölsäuremethylester $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -157$ und -107 ‰) ermittelt und durch die Bestimmung deren relativer Gehalte im Öl ergänzt (Schwankungsbreite zwischen 15 und 35 % für Palmitinsäure sowie zwischen 39 und 78 % für Ölsäure). Mittels multidimensionaler Skalierung (MDS) erfolgte eine statistische Betrachtung und Auswertung der einzelnen Datensätze sowie aller erhaltenen Daten in Kombination.

Dabei zeigte sich, dass mittels massenspektrometrischer Stabilisotopenuntersuchung eine Bewertung der Herkunft und Qualität von Olivenölen nicht möglich ist. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen einiger in der Literatur publizierter Studien, bei denen unter kontrollierten Bedingungen gewonnene Olivenöle (d.h. die wenn stets gleiche Bedingungen an Sorte, Extraktion und Wachstum herrschten) mit der Stabilisotopenanalytik im Nachhinein definiert werden konnten. Anhand der von uns durchgeführten Screening-Untersuchungen einer hohen Anzahl Proben konnte jedoch gezeigt werden, dass unter realistischen Kontrollbedingungen (mit nicht vorselektierter Probenauswahl) eine Untersuchung mittels IRMS zur Beurteilung von Herkunft und Qualität von Olivenölen nicht hilfreich ist.

Summary

The virgin olive oil is considered to be a healthy, high-priced and appreciated oil that can only be produced from olives of high quality. Some authors estimate that only a small part (about 10%) of harvested olives are suitable to produce high quality virgin oils. Nevertheless, in the supermarkets one finds almost solely olive oils of the highest category, i.e. "extra virgin". It is supposed that this inadequacy derives from illegal partial refining processes (mainly desodorization) to "recycle" low-quality "lampant oils" with the objective to sell these as virgin olive oils of best geographical indication. Additionally, it is assumed that olive oils produced in countries with traditionally lower quality standards (mainly outside of the European Union) are sold under wrong description of their origin. From the legislative point of view, EU regulation provides olive oils' analysis methods and defines its quality categories. As these legislative analytical methods are considered to be out of date, they cannot serve as a reliable tool to authenticate oil quality; hence, the development of new approaches is needed. Isotope ratio mass spectroscopy (IRMS), a powerful tool used for authenticity assessment in many other domains, could be a promising method.

The aim of this study was to elaborate an IRMS based method to distinguish real high quality virgin olive oils from the not authentic ones. In contrast to the limited data presented in literature, this should be performed by screening a large number of commercial oil samples mainly from supermarkets and wholesale trade; therefore 165 olive oils were investigated, among them 50 from Italy; 29 from Spain; 27 from France; 23 from Greece; 20 low-quality oils (origin not declared); 4 from Turkey; 3 from Chile and Tunisia, respectively; 2 from Portugal and Australia, respectively; and one from Israel and the U.S. (California), respectively. Aware of the inadequateness in measuring oil samples derived from controlled extraction and/or growth processes, we decided to choose this more practice-oriented way of investigation by measuring commercial samples.

In the first series of our studies, the hydrogen, carbon and oxygen isotope ratios of the oils were determined via EA-IRMS; hydrogen values ranged between $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -161$ and -114 ‰, carbon values varied between $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -31,7$ and $-26,1$ ‰ and oxygen isotope ratios varied between $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} = 15,8$ and $31,1$ ‰. Additionally, the squalen's hydrogen and carbon isotope ratios were measured via EA-IRMS after isolation by means of column chromatography (values ranging between $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -174$ and -144 ‰, $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -32,3$ and $-26,6$ ‰).

Last but not least, hydrogen isotope ratios of fatty acid methyl esters of palmitic and oleic acid were determined using HRGC-IRMS (values ranging between $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -156$ and -95 ‰ for palmitic acid methylester and $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -157$ and -107 ‰ for oleic acid methylester); additionally, their relative concentration was measured (palmitic acid 15-35 %, oleic acid 39-

78 %). By means of multidimensional scaling (MDS), statistical examinations of the single data sets and of all data together were performed.

It was shown that IRMS based methods are not a satisfactory tool to detect oil falsifications or a misleading indication of origin. In contrast to the data presented in literature, it has to be concluded that isotope ratio analysis a posteriori (that means no limitations in the area of origin or controlled extraction or growth processes) can not be used to characterise oil quality. In this respect, the contribution of such controlled studies can be considered as very limited. The development of new, non-IRMS based methods to control olive oil quality should be advanced.

1. Einleitung und Zielsetzung

Olivenöl ist buchstäblich in aller Munde und die Verwendung dieses Pflanzenöles hat sich in den letzten Jahren zu einem Trend entwickelt. So richtig aus der Mode war es jedoch nie, es vollzog sich vielmehr eine Wandlung vom alltäglichen „Lebens“mittel zum „Kultprodukt“ für den gesundheitsbewussten Verbraucher.

Bereits seit tausenden von Jahren wird Olivenöl in den mediterranen Gebieten geschätzt und genutzt -nicht nur zur Zubereitung von Speisen. Gerade die heute als weniger wertvoll angesehenen Ölqualitäten fanden über Jahrtausende als Lampenöl Anwendung (daher der Name Lampantöl). In der Liturgie der katholischen und orthodoxen Kirche verwendet man Olivenöl, das oft mit Balsam gemischt wird, unter anderem bei der Taufe, Firmung, Priesterweihe, Krankensalbung (früher deswegen als Letzte Ölung bezeichnet) und bei Bestattungen. Die Bibel beschreibt im zweiten Buch Mose (30;22-33) sogar die Herstellung von Salböl für sakrale Zwecke aus Olivenöl, Myrrhe, Zimt, Kalmus und Cassia: „Und der Herr redete mit Mose und sprach: Nimm zu dir die beste Spezerei: die edelste Myrrhe, fünfhundert Lot, und Zimt, die Hälfte soviel, zweihundertfünfzig, und Kalmus, auch zweihundertfünfzig, und Cassia, fünfhundert, nach dem Lot des Heiligtums, und Öl vom Ölbaum ein Hin. Und mache ein heiliges Salböl nach der Kunst des Salbenbereiters.“

Da in den vergangenen Jahrhunderten andere pflanzliche Öle und Fette, wie z.B. das heute gängige Kokos- und Palmfett dort nicht zur Verfügung standen, musste zwangsläufig der Ölbedarf aus den Früchten des heimischen Ölbaums gedeckt werden. Diese Gegebenheiten führten dazu, dass sich über Jahrtausende eine Olivenöl-Kultur entwickeln konnte. Neben der Funktion als Speise- und Lampenöl wurde das „grüne Gold“ auch zur Seifenherstellung verwendet; der Presskuchen diente als Viehfutter. Das Holz des Ölbaums fand ebenfalls universell Anwendung. Im Gegensatz zu heute war Olivenöl damals also ein alltägliches Mittel zum Leben und kein Trendlebensmittel oder Genussmittel. Erst durch die Einführung der Elektrizität, auch gerade in abgelegenen mediterranen Regionen, sowie die Verfügbarkeit von anderen, billigeren Pflanzenölen und durch den Aufstieg der Petrochemie ergab sich ein Strukturwandel, der letztendlich dazu führte, dass Olivenöl heute vorwiegend als hochwertiges, gesundes Nahrungsmittel angesehen wird. Als Konsequenz hat sich Olivenöl für die beteiligten Regionen zu einem wichtigen Wirtschaftsfaktor entwickelt. Davon profitiert auch der Handel in nicht-mediterranen Ländern.

Betrachten wir kurz die Marktdaten von Olivenöl; die nachfolgend verwendeten Informationen stammen von Luchetti (2000) sowie vom internationalen Olivenölrat (IOOC), der die Daten für die Erntejahre 2003-2005 zusammengefasst hat.

Auf den ersten Blick mag es überraschen, dass es für Olivenöl, das lediglich einen Anteil von ca. 3 % am internationalen Konsum und 2 % am globalen Produktionsvolumen von Pflanzenölen besitzt, sogar einen eigenen Olivenölrat gibt. Doch dieser augenscheinlich untergeordneten mengenmäßigen Bedeutung steht ein geldwerter Anteil in Höhe von 15 % gegenüber! In Deutschland lag der Marktanteil am Speiseölmarkt 2001 nach Angaben der Gesellschaft für Konsumforschung bei mengenmäßig 17 % und machte dabei beinahe ein Drittel des Wertes am Speiseölmarkt aus! Verglichen mit anderen Pflanzenölen ist Olivenöl also ein hochpreisiges Produkt von enormer wirtschaftlicher Bedeutung. Zusammen mit der Tatsache, dass das Öl praktisch ausschließlich in den wenigen Ländern angebaut wird, die das Mittelmeer umgeben, ergibt sich ein heutzutage ungewöhnliches wirtschaftliches Gebilde: Sehr wenige Länder produzieren absolut gesehen eine geringe Menge Öl, welches aber einen vergleichsweise hohen Wert besitzt. 98 % des Olivenöls entstammt den mediterranen Ländern; daneben findet Anbau in geringen Mengen unter anderem in Chile, Argentinien, Kalifornien und Australien statt. 75 % des Olivenöls werden in der Europäischen Union produziert; innerhalb der Union haben Spanien, Italien und Griechenland zusammengenommen einen mengenmäßigen Anteil von 97 % und lassen somit Portugal und Frankreich - zumindest quantitativ- weit hinter sich. Interessant ist, dass in den Ländern mit der höchsten Produktion wiederum Zonen mit größtem Anbau existieren; so stammen 75 % des spanischen Öls aus Andalusien und 63 % des italienischen Öls aus Süditalien. Bei den zu 25 % am Ölvolumen beitragenden nicht-EU Ländern stehen Tunesien und die Türkei mit einem Volumenanteil von 9 % respektive 5 % an der Spitze. Allein in Tunesien lebt jeder zehnte Einwohner ganz oder teilweise von der Olivenwirtschaft und jeder dritte Saisonarbeiter dort arbeitet mit Ölbäumen.

Beim Verbrauch des Olivenöls ist die Situation ähnlich: 71 % des Öls werden in der EU verbraucht, davon 92 % in den Ländern Italien, Spanien und Griechenland. Abweichend hiervon werden in Tunesien und der Türkei nur jeweils etwa 3 % des weltweit produzierten Öls konsumiert; es handelt sich um die wichtigsten Exportländer außerhalb der Union. In der Union sind Spanien, Italien und Griechenland mit einem Anteil von 35 %, 21 % beziehungsweise 17 % am exportierten Öl weltweit die größten Exporteure.

Wie sieht der jährliche pro-Kopf-Verbrauch aus? Federführend sind die Griechen mit etwa 20 kg Olivenöl pro Jahr, gefolgt von Spanien und Italien mit 12 kg beziehungsweise 11 kg.

Die Stellung des Olivenöls als ein bedeutendes, hochpreisiges Wirtschaftsgut bedingt also die Existenz von einem eigenen Olivenölrat, Codex Alimentarius-Regelungen und EU-Vorschriften, mit dem Ziel, den Handel zu harmonisieren.

Ist ein Olivenöl mit der Bezeichnung „extra nativ“ versehen, handelt es sich gemäß rechtlicher Bestimmungen (siehe Kap. 2.7) um ein Öl der höchsten Qualitätsstufe. Einige Autoren gehen davon aus, dass nur etwa 10 % der geernteten Oliven für die Erzeugung dieser Spit-

zenqualität geeignet sind. Dagegen sind im Handel jedoch beinahe ausschließlich „extra native“ Öle anzutreffen, die zudem meist aus den hoch angesehenen Regionen in Spanien, Italien und Griechenland stammen. Olivenöl aus Tunesien und der Türkei, die mengenmäßig bedeutsamsten Länder außerhalb der EU, werden praktisch nicht gehandelt.

Es stellt sich somit die Frage, ob die auf den Ölen angegebene Herkunft auch den Tatsachen entspricht. Auch das augenscheinliche Missverhältnis zwischen exklusivem Angebot an „extra nativen“ Ölen und der geringen hierfür zur Verfügung stehenden Menge an geeignetem Ausgangsmaterial wirft die Frage auf, ob möglicherweise nicht erlaubte Raffinationsprozesse zur Anwendung kommen, um aus „Lampantölen“ minderer Qualität „extra native“ Öle zu erzeugen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine Methode zu entwickeln, um die Herkunft der Olivenöle und deren Authentizität (beispielsweise in Bezug auf nicht erlaubte Raffinationsschritte) abzusichern. Hierfür beitet sich in besonderem Maße die Stabilisotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) an. Damit sollten Schwankungen in der Isotopenzusammensetzung zu erfassen sein, die aufgrund verschiedener Standorte oder unterschiedlicher technologischer Behandlung der Öle zu Stande kommen können. Da jedoch viele einzelne Faktoren dabei zusammenspielen, ist eine Aussage a priori nicht möglich; es muss anfangs eine solide Datengrundlage erarbeitet werden, um Aussagen über Herkunft und Authentizität einer Probe machen zu können. Hierfür wurden insgesamt 165 Olivenöle verschiedener Anbaugebiete (überwiegend „extra nativ“) untersucht, darunter auch so genannte Billigöle, die wegen der Kenntlichmachung als „extra nativ“ in Verbindung mit einem niedrigen Preis besonders im Fokus des Interesses stehen.

Ergänzend zu den ermittelten Isotopenverhältnissen wurde der Versuch unternommen, die Daten mittels statistischer Verfahren zu verknüpfen und so Informationen über Herkunft und Authentizität des Olivenöls zu erhalten.

2. Kenntnisstand

2.1 Stabile Isotopen

Die Atome eines chemischen Elements treten in der Natur als Mischung verschiedener Nuklide auf, die gleiche Ordnungszahlen (Protonenzahl) besitzen, aber differente Massenzahlen (Summe aus Protonenzahl und Neutronenzahl) aufweisen. Ernest Rutherfords (1871 – 1937) Schüler Frederick Soddy (1877 – 1957) gelang es zu zeigen, dass die Atome eines radioaktiven Elements gleiche chemische Eigenschaften besitzen, obwohl sie sich in der Masse unterscheiden. Er prägte 1913 den Begriff Isotop (griechisch. ἴσος, ísos „gleich“ und τόπος, tópos „Ort, Stelle“, also gleicher Ort; gemeint ist die Stellung im Periodensystem). So wurde ihm "for his contributions to our knowledge of the chemistry of radioactive substances, and his investigations into the origin and nature of isotopes" (Bekanntgabe des Nobelpreiskomitees) 1921 der Nobelpreis für Chemie verliehen. Später erkannte man, dass auch nicht-radioaktive Elemente Isotope besitzen. Als Isotope bezeichnet man heute alle Atome eines Elements, die sich nur in der Neutronenzahl im Atomkern unterscheiden. Üblich ist eine Differenzierung zwischen radioaktiven und stabilen Isotopen, erstere sind durch einen stetigen radioaktiven Zerfall und einer damit einhergehenden Umwandlung zu einem anderen Element charakterisiert. Meist besitzt jedes natürlich vorkommende Element ein oder mehrere stabile Isotope, welche jedoch nicht die mengenmäßig bedeutendsten Isotope sein müssen; diese Elemente bezeichnet man auch als Mischelemente. Thorium beispielsweise ist eine Ausnahme: es existiert in der Natur nur ein instabiles Isotop, deswegen bezeichnet man solche Elemente auch als Reinelemente oder anisotope Elemente; auch Fluor, Natrium, Phosphor oder Iod sind anisotop. Den prozentualen Anteil eines Isotops an dessen dazugehörigem Element bezeichnet man als *relative Häufigkeit*. Die Angabe erfolgt in Atom-%. Multipliziert man nun die Massen der Nuklide jedes natürlich vorkommenden Isotops eines Elements mit dessen relativer Häufigkeit, erhält man nach Addition der Massen die mittlere Atommasse in Dalton (früher: Atomgewicht). Von den bisher bekannten Elementen sind aktuell ca. 265 stabile Nuklide bekannt; durch Fortschritte in der Kernphysik sinkt diese Zahl ständig, da bei mehr und mehr Elementen Zerfallsprozesse mit extrem langen Halbwertszeiten nachgewiesen werden können, z.B. Bismut, das nach aktuellen Erkenntnissen doch kein stabiles Isotop besitzt. Daneben existieren ca. 2700 instabile Isotope, die nur künstlich erzeugt werden können.

Vom lebensmittelchemischen Standpunkt betrachtet, fokussiert sich das Interesse an Isotopen vornehmlich auf die Bioelemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und

Schwefel. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die stabilen Isotope von Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff untersucht. Einen Überblick über die relativen Häufigkeiten der Isotope gibt Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1: Vorkommen und Eigenschaften stabiler Isotope in den wichtigsten Bioelementen im Kontext mit den Isotopenstandards nach: Schmidt et al., 2007; a=siehe Gl. 2.1

Element	Stabile Isotopen	Relative Häufigkeit [Atom-%]	Kernmasse [Dalton]	Isotopenverhältnis R ^a	Internation. Standard (Auswahl)	Gas zur Analyse
Wasserstoff	¹ H	99.9855	1.00782522		(V)SMOW	
	² H	0.0145	2.0141022	0.000145	SLAP, GISP	H ₂
Kohlenstoff	¹² C	98.892	12.0000000			
	¹³ C	1.108	13.0033543	0.011204	VPDB	CO ₂
Stickstoff	¹⁴ N	99.6337	14.0030744			
	¹⁵ N	0.3663	15.0001081	0.003676	AIR	N ₂
Sauerstoff	¹⁶ O	99.7587	15.9949149		(V)SMOW	
	¹⁷ O	0.0374	16.9991334	0.000375	SLAP	(CO ₂), CO
	¹⁸ O	0.2039	17.9991598	0.002044	GISP VPDB	
Schwefel	³² S	95.0018	31.972074			
	³³ S	0.750	32.97146	0.00789	CDT	SO ₂
	³⁴ S	4.215	33.967864	0.04436		
	³⁵ S	0.02	35.96709	0.000210		

Für die Untersuchung der wesentlichen Bioelemente im Rahmen lebensmittelchemischer Multielement-Analytik gibt es aktuell nur ein Verfahren: die Stabilisotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS). Hierbei werden je nach Systemkonfiguration und Methodik entweder die zu untersuchenden Verbindungen nach chromatographischer Trennung oder das zu messende Material durch Elementaranalyse in einfache Messgase (vgl. Tabelle 2.1) überführt. Das anschließend gemessene Isotopenverhältnis der Messgase wird nun als relative Abweichung von einem international normierten Standard angegeben. In Tabelle 2.1 findet sich ein Überblick über die jeweiligen Standards. Man erkennt, dass Präzision und exakte Standardisierungen nötig sind, da sich die Variation der Isotopenzusammensetzung im Bereich von Bruchteilen von Atom-% bewegt. Die international gebräuchliche Einheit bei der Isotopenverhältnisbestimmung mittels IRMS ist der in [‰] angegebene δ-Wert; er stellt die Abweichung des Isotopenverhältnis der Probe vom Isotopenverhältnis des verwendeten Standards dar; per definitionem ist der Wert der Standards somit null. Man bildet sozusagen das Verhältnis vom Verhältnis mit dem Ziel, einen einfachen Zahlenwert, den δ-Wert, zu

erhalten. Ist dieser negativ, so ist die Probe, verglichen mit dem Standard abgereicherter am schweren Isotop und umgekehrt.

$$\delta[\text{‰}] = \left(\frac{R_{\text{Probe}} - R_{\text{Standard}}}{R_{\text{Standard}}} \right) \cdot 1000$$

(Gl. 2.1)

$$R = \frac{\text{Gehalt}_{\text{schweres Isotop}}}{\text{Gehalt}_{\text{leichtes Isotop}}}$$

In Schulen wird oftmals gelehrt, Isotope desselben Elements seien untereinander chemisch völlig identisch. Dies wird mit der jeweils gleichen Zahl an Protonen im Kern und Elektronen in der Hülle begründet; letztere seien für die chemischen Eigenschaften verantwortlich. Diese Behauptung bedarf einiger Einschränkung: Isotope verhalten sich chemisch nicht völlig gleich, sondern nur gleichartig. Die unterschiedlichen Massen der Isotopen führen zu sogenannten Isotopie-Effekten, welche sich aufgrund unterschiedlicher Nullpunktenergien der chemischen Bindungen zeigen, falls daran unterschiedliche Isotope beteiligt sind. So kann die Beobachtung erklärt werden, dass an markierten Verbindungen chemische Reaktionen an diesen Bindungen schneller ablaufen als bei den leichteren Isotopen. Diese kinetischen Isotopeneffekte sind umso ausgeprägter, je stärker die Differenz der Massen der Isotope ist. Maximal ist dieser Effekt also beim einfachsten aller Elemente: dem Wasserstoff. Hier sind die Unterschiede in den relativen Massen der Isotope Protium (^1H), Deuterium (^2H) und Tritium (^3H) größer als bei jedem anderen Element. Derartige kinetische Isotopeneffekte sind auch bei enzymkatalysierten Reaktionen zu beobachten.

Isotopie-Effekte äußern sich neben den Variationen in der Bindungsenergie auch in unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften. Diese Effekte beeinflussen unter anderem Molvolumen, Dichte, Schmelzpunkt, Siedepunkt, Dampfdruck, das chromatographische Verhalten und kernspinabhängige Spektroskopieverfahren. Konkret spricht man hier von thermodynamischen Isotopeneffekten. Es lassen sich dadurch auch Verfahren zur Isotopentrennung entwickeln, die beispielsweise für die Kerntechnik von Bedeutung sind.

Darüber hinaus können sogenannte Austauschreaktionen auftreten; dies sind Reaktionen, bei denen innerhalb eines Moleküls einzelne Atome oder eine ganze funktionelle Gruppe durch ein anderes Isotop ersetzt werden kann. Dadurch kann sich die Isotopenzusammensetzung ändern. Häufig ist dies bei Protonentransfers von enolisierbaren Verbindungen der Fall. Im analytischen Bereich ist also Augenmerk darauf zu legen, bei der Probenvorbereitung Austauschreaktionen und thermodynamisch bedingte Isotopenfraktionierung (z.B. infolge unvollständiger Destillation) zu vermeiden oder entsprechend zu berücksichtigen, um korrekte Messergebnisse zu erhalten.

Die oben angeführten Isotopeneffekte führen auch in der Biosphäre zu schwachen, aber messbaren Abweichungen von den durchschnittlichen relativen Häufigkeiten einzelner Isotope; man spricht hier auch von Isotopenfraktionierung. Verantwortlich sind meteorologische Faktoren und die geographische Lage; hinzu kommen thermodynamische Isotopeneffekte beispielsweise bei der Kohlenstoffdioxid-Assimilation und Transpiration der Pflanzen sowie kinetische Isotopeneffekte bei biochemischen Prozessen innerhalb der Pflanzen. Natürlich sind diese Effekte auch bei Tieren zu beobachten, im Rahmen dieser Arbeit soll aber der Focus auf den Isotopenuntersuchungen des pflanzlichen Stoffwechsels liegen. Erst durch diese Isotopie-Effekte, die Isotopenfraktionierungen bedingen, ist eine Bestimmung der Isotopenverhältnisse überhaupt sinnvoll.

2.2 Isotopenfraktionierungen von Wasserstoff

2.2.1 Thermodynamische Isotopenfraktionierungen

Wasserstoff ist mit geschätzten 0,74 Gew.-% (Lithosphäre, Hydrosphäre und Atmosphäre zusammen) das 9. häufigste Element auf der Erde. Eher selten ist Wasserstoff in freier Form zu finden, so z.B. in Spuren in eingeschlossenen Mineralien oder in vulkanischen Gasen. Dominierend ist die gebundene Form: in Wasser beispielsweise liegt eine Bindung zum Sauerstoff vor, bei den organischen Stoffen ist die Bindung an Kohlenstoff vorherrschend.

Es ist wohlbekannt, dass das Wasser der Meere eine annähernd konstante Isotopenzusammensetzung hinsichtlich der Elemente Wasserstoff- und Sauerstoff aufweist. Dagegen unterliegt der Wasserkreislauf der Atmosphäre signifikanten Isotopenfraktionierungen, die zu großem Teil den thermodynamischen Isotopie-Effekten bei Verdunstung, Kondensation und Niederschlag geschuldet sind. Der Wasserkreislauf der Erde ist somit Ursache der global vorherrschenden Isotopenfraktionierungen von Wasserstoff und Sauerstoff. Die Fraktionierungen der beiden Elemente korrelieren, da sie durch Isotopie-Effekte des Wassers miteinander verbunden sind (Friedmann, 1953). 1961 hat Craig diesen linearen Zusammenhang der meteorologischen Wasserlinie mit der Gleichung $\delta^2\text{H} = 8 * \delta^{18}\text{O} + 10$ beschrieben. Die auftretenden Muster bei der Isotopenfraktionierung des meteorologischen Wassers sind von den klimatischen und geographischen Faktoren des jeweiligen Ortes abhängig und werden durch Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Niederschlagsmenge und der geographischen Lage (geographische Länge und Breite, Höhe über dem Meeresspiegel) bestimmt (Epstein und Mayeda, 1953; Martin und Martin, 2003).

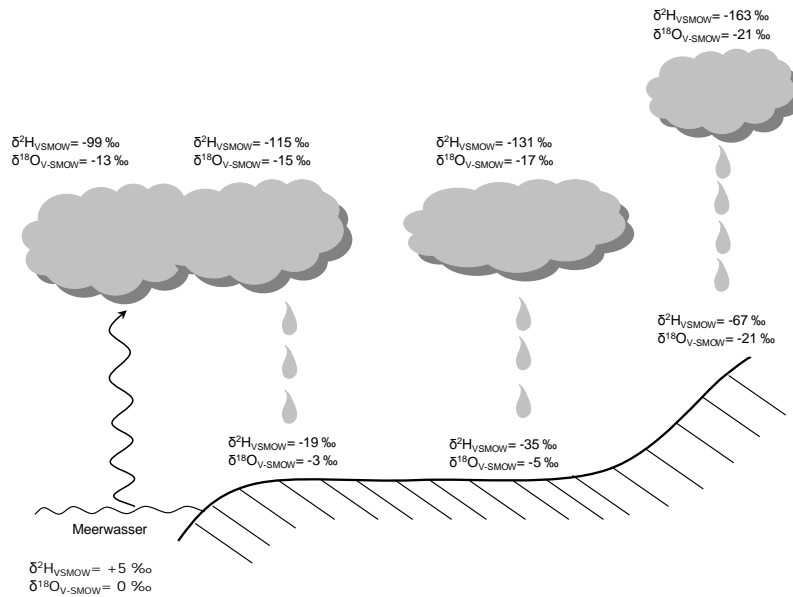


Abb. 2.1: Schematische Übersicht der Isotopendiskriminierung im Niederschlagswasser, nach: Hoefs, 1973.

Betrachtet man die in Abb. 2.1 links dargestellte Wolkenbildung über dem Meer im Zusammenhang mit dem höheren Dampfdruck der leichteren Isotope ^1H und ^{16}O gegenüber den schwereren Isotopen ^2H und ^{18}O , so ist klar, dass die Wolken gegenüber dem Meerwasser an ^2H und ^{18}O abgereichert sind, da durch Sonneneinwirkung vorzugsweise die leichteren Isotope verdampfen (Hoefs, 1973).

Die meiste Wolkenbildung findet in den äquatorialen Gebieten der Erde statt; bedingt durch die Erdrotation kommt es zu einer weiteren Isotopenfraktionierung. In Folge dessen kommt es mit zunehmender geographischer Breite zu deuteriumärmeren Niederschlägen. Da die schwereren Isotope leichter kondensieren, werden diese tendenziell häufiger in Küstennähe abgerechnet. Folglich ist das Wasser in diesen Wolken nun noch abgereicherter an schweren Isotopen. Mit zunehmender Höhe regnen nun diese Wolken nach und nach ab. Demnach ist der Anteil schwerer Isotope im Niederschlagswasser bei zunehmender Höhe über dem Meeresspiegel geringer. In hoch gelegenen Regionen ist der Niederschlag also nochmals abgereicherter an schweren Isotopen.

Die im Landesinneren herrschende Luftfeuchtigkeit hat ebenfalls einen Einfluss auf die Isotopenzusammensetzung des Niederschlagswassers; eine Anreicherung ist in niederschlagsarmen Jahreszeiten und eine Abreicherung in niederschlagsreichen Jahreszeiten zu beobachten (Dansgaard, 1964).

Die beschriebenen klimatischen und geographischen Gegebenheiten am jeweiligen Betrachtungsort haben essentiellen Einfluss auf die Isotopenzusammensetzung des meteorologischen Wassers und führen zu einer Isotopensignatur, die charakteristisch für den jeweiligen Standort sein kann. 1995 konnten Kluge et al. durch Messungen der $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ -Werte der Biomasse verschiedener madagassischer Orchideen und Sukkulenten unterschiedlicher Lagen zeigen, dass die Isotopenzusammensetzung des meteorologischen Wassers weniger bedeutend ist als die Vorgänge innerhalb der Pflanze, welche im folgenden Beschreibung finden.

Verdunstungsprozesse finden nicht nur über den Weltmeeren statt, sondern auch in Pflanzen. Man spricht hierbei von Transpiration; das von den Wurzeln der Pflanzen aufgenommene Wasser gelangt ins Xylem und wird zu den Blättern transportiert, in denen durch Transpiration eine weitere Isotopenfraktionierung stattfindet. Hierbei verdampfen aufgrund der unterschiedlichen Dampfdrücke die Moleküle mit leichteren Isotopen schneller. In der Folge ist im Blattwasser der Pflanzen eine Anreicherung von schwereren Isotopen, verglichen mit dem Wurzelwasser, zu beobachten (Bricout, 1978). Nach Untersuchungen von Schmidt et al. (2003a) kommt es zu einer Anreicherung von ^2H im Blattwasser von etwa +30‰ gegenüber dem meteorologischen Wasser; diese Anreicherung ist in etwas weniger stark ausgeprägter Form auch im Fruchtwasser zu finden (Lesaint et al., 1974).

Weitere Fraktionierungen in Pflanzen sind durch biochemische metabolische und kinetische Prozesse bedingt.

Eine Übersicht über die $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ -Werte verschiedener Stoffklassen bietet die Abb. 2.2.

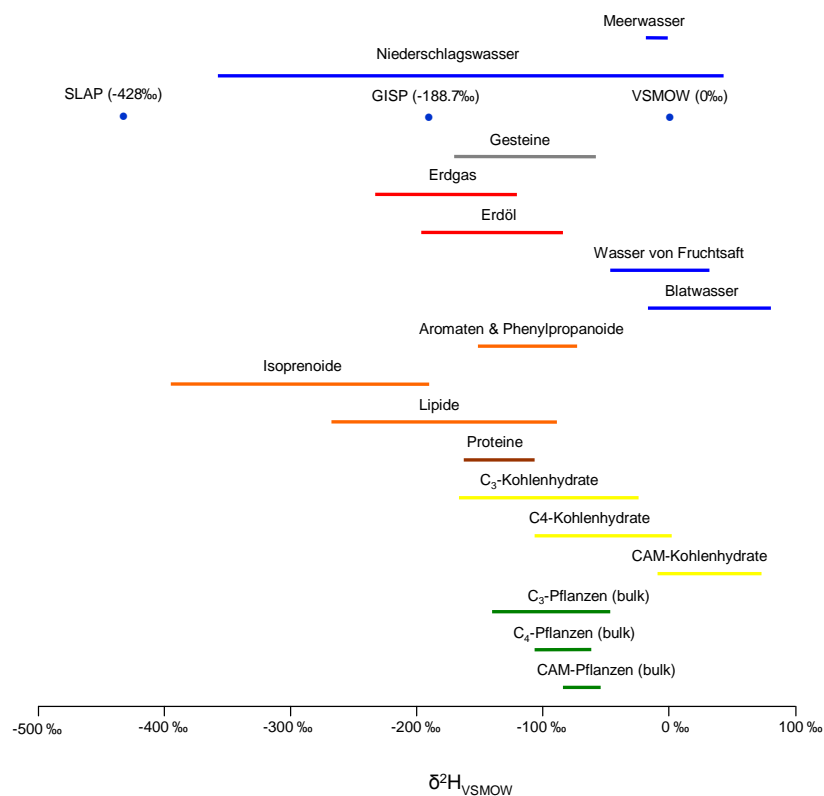


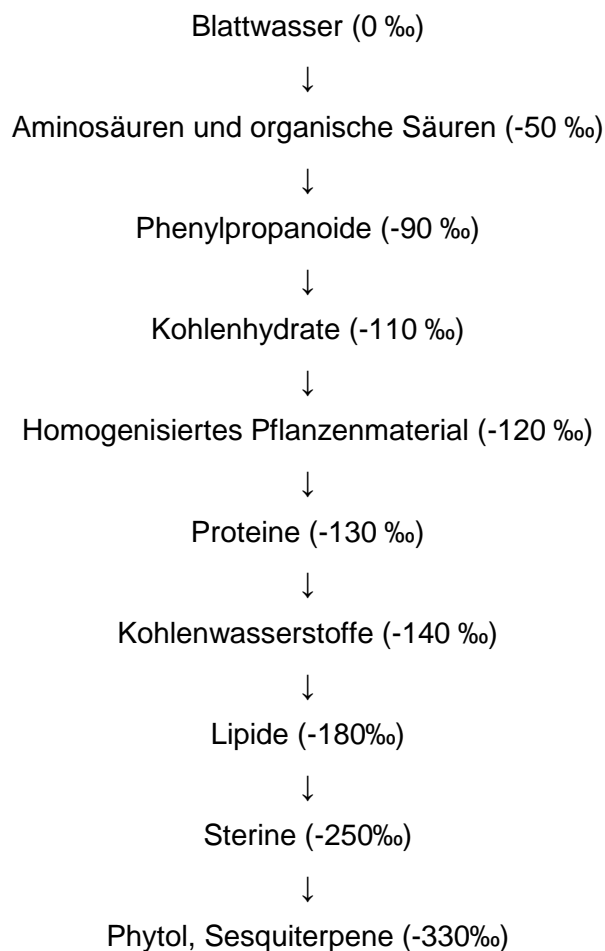
Abb. 2.2: Überblick über die durchschnittlich zu erwartenden Wasserstoff-Isotopenverhältnisse ausgewählter organischer und anorganischer Verbindungen ($\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$), nach: Hoefs, 1973; Winkler, 1984; Sternberg et al., 1984 a; Naraoka et al., 2001; Schmidt et al., 2003a.

2.2.2 Isotopenfraktionierungen in Pflanzen

Das gesamte Vorkommen von gebundenem Wasserstoff in der Pflanze entspringt dem aufgenommenen Wasser. Das Isotopenverhältnis des örtlichen Niederschlagswassers bedingt die Verhältnisse im Bodenwasser (Gat, 1971). Nach Aufnahme des Wassers durch die Wurzel und Transport zu den photosynthetischen Zentren, den Blättern, erfolgt nach Gasaustausch an den Spaltöffnungen (Stomata) eine weitere Anreicherung der schweren Isotope (Bricout, 1978). Das Ausmaß der Anreicherung sollte unabhängig vom Photosynthesetyp der Pflanze sein (Flanagan et al., 1991), dennoch zeigen CAM-Pflanzen in freier Natur oft höhere Deuterium-Anreicherungen als die C₃- und C₄-Pflanzen. Obwohl CAM-Pflanzen nur nachts transpirieren, kann man für diese Beobachtung nicht nur Transpirationseffekte verantwortlich machen. Möglich ist, dass bei CAM-Pflanzen, die nur unter Stress Deuterium anreichern, auch der höhere Deuteriumgehalt des Grundwassers eine Rolle spielt, der im Allgemeinen an trockenen Standorten anzutreffen ist (Ziegler et al., 1976; Sternberg et al., 1986).

Auf dem weiteren Weg der Photosynthese kommt es nun zu einer Übertragung der Wasserstoffatome des Wassers und Bildung von NADPH, welches über reduktive biosynthetische

Reaktionen den Wasserstoff-Einbau in Assimilationsprodukte ermöglicht. Über die Isotopenzusammensetzung des primären Reduktionsäquivalents ist bisher nichts bekannt; lediglich von Cyanobakterien produziertes Wasserstoffgas hat man untersucht und fand eine Deuteriumanreicherung von etwa -600 ‰ gegenüber dem Wasser (Luo et al., 1991). Nun lässt sich hier nicht einfach auf eine ähnliche Situation bei Pflanzen schließen, aber es gibt Hinweise, dass auch bei Pflanzen die primären photosynthetischen Reduktionsäquivalente eine starke Anreicherung aufweisen. Bei der Untersuchung photosynthetisch produzierter Zellulose hat man eine Deuteriumanreicherung von -171 ‰ gegenüber dem Wasser festgestellt, wobei je nach Wachstumsbedingungen der Pflanze 40-100 % der Wasserstoffatome des Primärassimilats mit dem Wasser ausgetauscht haben (Yakir und DeNiro, 1990; Hayes, 2001). Bei den nachfolgenden katabolen und anabolen Stoffwechselfvorgängen kommt es später zu einer Anreicherung von Deuterium, bedingt durch weiteren Austausch der Wasserstoffatome mit Wasser. Basierend auf Erkenntnissen von Schmidt et al. (2003a) lässt sich für C₃-Pflanzen ein Schema erstellen, in welchem man die durchschnittliche Anreicherung ausgewählter Verbindungstypen gegenüber dem Blattwasser (hier zur Vereinfachung 0 ‰; alle Werte gegen VSMOW) ersehen kann.



Nach der Theorie von Schmidt et al. (2003b) spiegeln diese Stufen die Distanz der jeweiligen sekundären Pflanzenstoffe zum Primärassimilat der Photosynthese wieder. Je „länger“ der Biosyntheseweg, desto stärker die relative Abreicherung an Deuterium. Die Gründe hierfür liegen in den beteiligten Reduktionsäquivalenten, den metabolischen Produktflüssen sowie den kinetischen Isotopeneffekten der involvierten Enzyme, die aber nur in Erscheinung treten, falls bei biochemischen Umsetzungen Abzweigungen im Produktfluss auftreten.

Ein von Fogel und Cifuentes 1993 entwickeltes Modell erklärt die auftretenden Unterschiede im Deuteriumgehalt von C₃- und C₄-Pflanzen: Charakteristisch für C₄-Pflanzen sind zwei Typen photosynthetisch aktiver Zellen, welche die Blattleitbündel umgeben; im Mesophyll wird Kohlenstoffdioxid fixiert und liegt in Form von Oxalacetat vor. Zusammen mit NADPH-Reduktionsäquivalenten wird es nun in die Kranzzellen transportiert, wo nach Freisetzung des Kohlenstoffdioxids eine Assimilierung via Calvin-Zyklus folgt. Demnach differiert die den C₄-Pflanzen zur Verfügung stehende Gesamtheit an Reduktionsäquivalenten von denen der C₃-Gewächse. Der Unterschied in der Fixierung von Kohlenstoffdioxid ist also indirekt Ursache für die höhere Deuteriumkonzentration im Vergleich zu C₃-Pflanzen (Smith und Ziegler, 1990).

Sternberg und DeNiro berichteten 1983 erstmals über eine Besonderheit der CAM-Pflanzen: sie fanden unerwartet hohe Deuterium-Gehalte im vermessenem Cellulosenitrat. Es konnte dargelegt werden, dass diese Anreicherung von den ²H/¹H-Verhältnissen in Lipiden (Sternberg et al., 1984a) und von den ¹⁸O/¹⁶O-Verhältnissen in Cellulose (Sternberg et al., 1984b) unabhängig ist. Die Autoren verwarfen die Idee einer transpirationsbedingten Kausalität und postulierten stattdessen die differente biochemische Kompartimentierung und eine Anreicherung bei der Gluconeogenese bzw. beim Kohlenhydratmetabolismus im Cytoplasma als Ursache (Sternberg et al., 1984a). Diese Hypothese wurde durch Luo und Sternberg 1991 untermauert, als sie Deuteriumgehalte von Stärke- und Cellulosenitrat bei C₃- und CAM-Pflanzen untersuchten. Sie konstatierten eine grundsätzliche, vom Photosynthesetyp unabhängige Anreicherung von Cellulose gegenüber Stärke. Es zeigte sich, dass diese Unterschiede umso größer waren, je weniger Deuterium die Stärke enthielt; bei den CAM-Pflanzen fand man durchweg die höchsten Deuteriumgehalte in der Stärke.

2.3 Isotopenfraktionierungen von Kohlenstoff

2.3.1 Thermodynamische Isotopenfraktionierungen

Das in der Atmosphäre vorhandene Kohlenstoffdioxid (CO_2) und das hydrosphärische Hydrogencarbonat (HCO_3^-) sind die primären Kohlenstoffquellen der Pflanzen. Der Durchschnittswert des atmosphärischen CO_2 liegt bei etwa $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -7$ bis -10 ‰; diese Homogenität kann mit Äquilibrierungsvorgängen erklärt werden (Hoefs, 1973). Das konstante Isotopenverhältnis kann jedoch lokal durch natürliche (Waldbrände, Vulkanausbrüche) (Freyer, 1979; Martin und Sutherland, 1990) oder anthropogene (Verkehr, Industrieabgase) (Keeling et al., 1979; Penuelas und Azcon-Bieto, 1992) Einflüsse nachhaltig verändert werden.

Das im Wasser in gelöster Form vorliegende Hydrogencarbonat besitzt einen $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert von circa 0 ‰. Zu berücksichtigen sind hierbei die folgenden Gleichgewichtsreaktionen, die den stattfindenden atmosphärischen CO_2 -Austausch mit der Hydrosphäre verdeutlichen:



Hierbei kommt es zu einer Isotopenfraktionierung: es findet eine Anreicherung von ^{13}C beim Hydrogencarbonat statt. Diese Anreicherung bewegt sich im Bereich von etwa +8 ‰ und erklärt somit das gefundene Kohlenstoff-Isotopenverhältnis des marinen Hydrogencarbonats (Deuser und Degens, 1967; Mook et al., 1974; Marlier und O'Leary, 1984).

Wie daraus leicht ersichtlich ist, kommt es bei Landpflanzen, die sich des atmosphärischen CO_2 bedienen, nun zu einer Abreicherung an ^{13}C verglichen mit den aquatischen Pflanzen (Schmidt et al., 2007; Kroll et al., 2008).

Daneben gibt es weitere Faktoren, die das Verhältnis an Kohlenstoff-Isotopen in pflanzlichem Material beeinflussen: Lichteinstrahlung (Ehleringer et al., 1986; Evans et al., 1986), Transpiration (Farquhar et al., 1982) und Salzgehalt (Downton et al., 1985). Einen Überblick über die durchschnittlich zu erwartenden Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse ausgewählter organischer und anorganischer Verbindungen gibt Abb. 2.3.

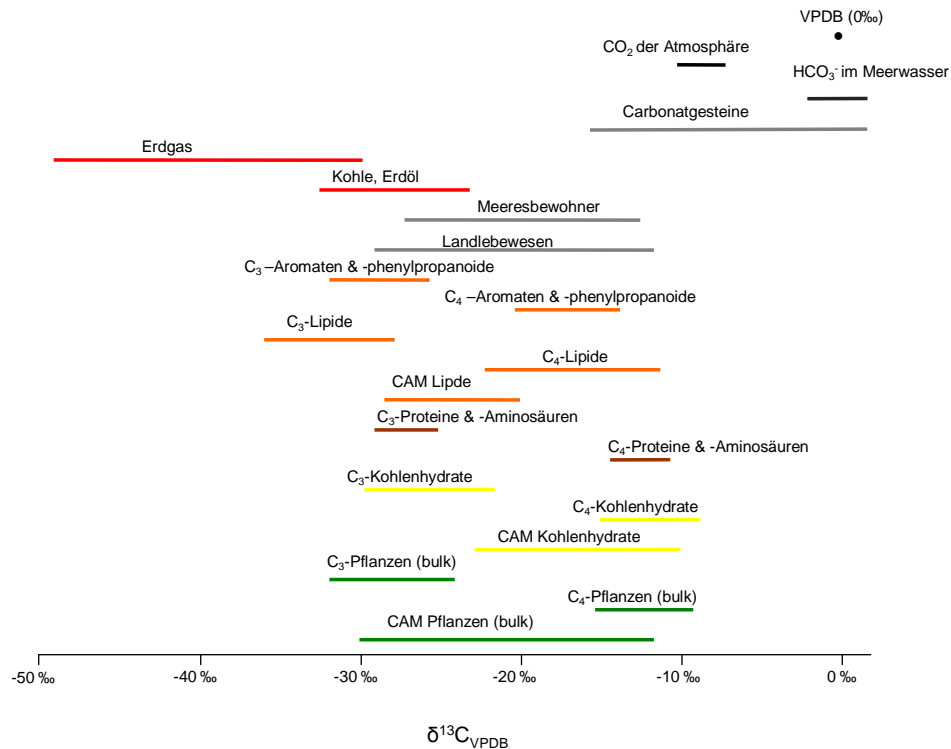


Abb. 2.3: Überblick über die durchschnittlich zu erwartenden Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse ausgewählter organischer und anorganischer Verbindungen ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$), nach: Hoefs, 1973; Winkler, 1984; Sternberg et al., 1984 a-c; Naraoka et al., 2001; Schmidt et al., 2007.

2.3.2 Isotopenfraktionierungen von Kohlenstoff in Pflanzen

Verglichen mit den oben beschriebenen Isotopenfraktionierungen bei Wasserstoff herrscht beim Kohlenstoff ein weit größeres Verständnis. Hauptursache für auftretende Fraktionierungen ist der Beginn der Photosynthese, die atmosphärische CO₂-Fixierung. Je nach Photosynthesetyp (C₃, C₄ oder CAM) kommt es hierbei zu unterschiedlichen Diskriminierungen. Nachfolgend treten weitere Diskriminierungen bei der Biosynthese der einzelnen Substanzgruppen auf.

Betrachten wir zuallererst die C₃-Pflanzen: wie allgemein bekannt ist, findet die Verwertung von CO₂ im Stroma der Chloroplasten via Calvin-Zyklus statt. Die nötige CO₂-Fixierung erfolgt unter Katalyse des mengenmäßig häufigsten Enzyms der Erde: der 1,5-Ribulosebisphosphat-Carboxylase / Oxygenase (RUBISCO). CO₂ wird enzymkatalytisch an Ribulose-1,5-bisphosphat gebunden, danach erfolgt Spaltung zu zwei Molekülen 3-Phospho-D-glycerat. Letztere Verbindung stellt somit das erste greifbare Photosyntheseprodukt dar.

Die CO₂-Fixierung mittels RUBISCO ist mit einer starken Bevorzugung des leichteren ¹²CO₂ einhergehend (Park und Epstein, 1960; Christeller et al., 1976); es kommt demnach zu einer Anreicherung von ¹³C in der Pflanze. Der eigentlichen Substratbindung geht eine Aktivierung der RUBISCO durch Anlagerung von CO₂ im katalytischen Zentrum voraus: CO₂ wird an einen Lysin-Rest gebunden; es entsteht ein Carbamat-Rest, der durch Magnesium-Ionen stabilisiert wird (Carbamat-Komplex) (Richter, 1996).

Es ist schwierig, das exakte Ausmaß dieser Diskriminierung zu benennen, da die in der Literatur publizierten Werte -bedingt durch Versuchsaufbau und Herkunft des Enzyms- stark variieren (O'Leary, 1981; Winkler et al., 1982). Es ist jedoch die Tendenz zu erkennen, dass *in vivo* ermittelte Werte gegenüber den *in vitro* bestimmten Daten erheblich kleiner sind (O'Leary, 1981; Ivlev, 2001). Als Durchschnitt der ¹³C-Anreicherung wird eine Größenordnung von -30 ‰ ± 10 ‰ angesehen (O'Leary, 1981); dies wurde aktuell von Hobbie und Werner, die 2004 einen Durchschnittswert von -29 ‰ angaben, bestätigt.

Während bei den C₃-Pflanzen, die RUBISCO atmosphärisches CO₂ direkt fixiert und dem Calvin-Zyklus zuführt, erfolgt dies bei den C₄-Pflanzen über den C₄-Dicarbonsäure-Zyklus, der nach seinen Entdeckern, den australischen Forschern Marshall Davidson Hatch und Charles Roger, auch Hatch-Slack-Zyklus genannt wird. Hierbei herrscht eine räumliche Trennung zwischen CO₂-Fixierung in den Mesophyllzellen und dem Einbau in Ribulose-1,5-bisphosphat durch die RUBISCO in den Bündelscheidenzellen. Warum dieser Umweg? Es handelt sich hierbei um eine Anpassungsform der photosynthetischen Kohlehydratproduktion an wasserarme, stark besonnte und heiße Standorte. Der C₄-Dicarbonsäure-Zyklus erlaubt den Pflanzen eine optimale Akquirierung von CO₂ in Verbindung mit weitestgehend geschlossenen Stomata; so werden Transpirationsverluste minimiert, und gleichzeitig bleiben Assimilierungsprozesse dennoch möglich.

CO₂ wird bei den C₄-Pflanzen über Hydrogencarbonat mit Hilfe des zusätzlichen Enzyms Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEP-Carboxylase) an Phosphoenolpyruvat gebunden; es entsteht primär Oxalacetat, das zum stabileren Malat umgewandelt wird. Nach Transport des Malats zu den Bündelscheidenzellen erfolgt die enzymkatalysierte Freisetzung (Decarboxylierung) des gebundenen CO₂ und instantane Refixierung an Ribulose-1,5-bisphosphat via RUBISCO. Hierbei kann die CO₂-Konzentration bis auf das 40fache der Konzentration in Luft ansteigen; Diffusionsprozesse werden durch Suberineinlagerungen in den Zellwänden erschwert. Die primäre CO₂-Fixierung und die sekundäre Bindung im Calvin-Zyklus laufen zur selben Zeit, jedoch räumlich in unterschiedlichen Blattgeweben ab. Was bedeutet diese Anpassungsform nun für die Isotopendiskriminierung? Anders als bei C₃-Pflanzen stammt das CO₂ bei C₄-Gewächsen aus einer relativ ¹³C-angereicherten Gesamtheit: dem Hydrogencarbonat; dieses ist wie der Gleichung 2.4 zu entnehmen ist, an ¹³C angereichert. Hinzu kommt,

dass bei der primären CO₂-Fixierung über die PEP-Carboxylase im Gegensatz zur RUBISCO nur eine schwache Abreicherung von ¹³CO₂ im Rahmen von -2 bis -2,5 ‰ zu beobachten ist (Whelan et al., 1973; Reibach und Benedict, 1977; Schmidt et al., 1978). Die im Vergleich zu C₃-Pflanzen schwache Abreicherung, die Anreicherung von Hydrogencarbonat und die Tatsache, dass fast das gesamte CO₂ in den Zellen der Bündelscheide umgesetzt wird, erklären die bei den C₄-Pflanzen gemessenen Werte der Biomasse von δ¹³C_{VPDB} im Bereich von -10 bis -16 ‰ (Whelan et al., 1970). Dies ist Folge der effizienteren CO₂-Fixierung verglichen mit den C₃-Pflanzen (O'Leary, 1981). Erkauft wird dieser Effizienzvorteil u.a. durch erhöhten Energiebedarf in Form von ATP, was aber an sonnigen Standorten nicht unbedingt ein Problem sein dürfte.

Betrachten wir nun die letzte Gruppe: Pflanzen mit dem Crassulaceen-Stoffwechsel (CAM, Crassulacean Acid Metabolism, benannt nach den Dickblatt-Gewächsen, in denen er erstmalig entdeckt wurde). Auch hierbei handelt es sich um eine Anpassungsform der pflanzlichen photosynthetischen Kohlenstoffproduktion an eine heiße, wasserarme Umgebung. Im Gegensatz zu C₄-Pflanzen ist dieser Stoffwechselweg nicht genetisch determiniert, sondern wird durch physiologische Faktoren ausgelöst und gesteuert. Gemeinsam ist jedoch die CO₂-Fixierung als Malat und spätere Freisetzung von CO₂, diesmal jedoch nicht in einem anderen Gewebe, sondern in derselben Zelle, aber in einem anderen Kompartiment. Das Besondere: es herrscht eine zeitliche Versetzung; nachts wird CO₂ als Malat gespeichert und tagsüber erfolgt in derselben Zelle die Assimilation mittels Calvin-Zyklus. Der Vorteil liegt auf der Hand: tagsüber bleiben die Stomata weitestgehend geschlossen und unnötige Transpirationsverluste werden dadurch vermieden. Nachts jedoch, wenn die Temperatur gesunken, und die Sonne untergegangen ist, sind weit geöffnete Stomata in Bezug auf Transpirationsverluste nicht sonderlich bedenklich (Sayed, 2001). Bei der Speicherung von CO₂ während der Nacht kommt es zu einer starken Ansäuerung im Cytosol, daher die Bezeichnung Crassulacean Acid Metabolism. Beachtenswert ist die Tatsache, dass der CAM-Stoffwechsel fakultativ ist, d.h. ist die Pflanze keinem Wasser- und Temperaturstress mehr ausgesetzt, so geht sie zur CO₂-Fixierung bei Tage mit geöffneten Stomata über. Das führt dazu, dass die durchschnittlich gemessenen Isotopenwerte der CAM-Pflanzen zwischen denen der C₃- und C₄-Pflanzen angesiedelt sind, die je nach Ausmaß der Nacht- und Tagfixierung variieren (Ziegler et al., 1976; Ziegler, 1996; Winter und Holtum, 2002).

Es ist also deutlich zu erkennen, dass der Photosynthesetyp die entscheidenden Weichen für die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse einer Pflanze stellt. Natürlich haben auch andere Enzyme Einfluss auf das ¹³C/¹²C-Verhältnis. Die neben der Photosynthese derzeit am besten untersuchte und verstandene Fraktionierung von Kohlenstoffisotopen innerhalb der Pflanze

findet man bei der Pyruvat-Dehydrogenase-katalysierten Decarboxylierung von Pyruvat mit Bildung von Acetyl-CoA (DeNiro und Epstein, 1977). Diese Reaktion führt in Lipiden zu einer Abreicherung von ^{13}C um etwa -4 bis -10 ‰, verglichen mit den primär gebildeten Kohlenhydraten (Naraoka und Chikaraishi, 2001), respektive zu einer Abreicherung von -2,4 bis -9,9 ‰ gegenüber der pflanzlichen Blattbiomasse (Chikaraishi et al., 2004). Dabei fällt folgendes auf: diese Lipid-Abreicherung gegenüber Kohlenhydraten scheint bei C_3 -Pflanzen deutlich geringer auszufallen (-4 bis -6 ‰) als bei den C_4 -Gewächsen (-8 bis -10 ‰). Diese Beobachtung ist jedoch noch in der Diskussion und könnte mit unterschiedlichen Lipidkonzentrationen erklärt werden (Collister et al., 1994; Naraoka und Chikaraishi, 2001; Conte et al., 2003). Die angesprochene Abreicherung bedingt eine Verminderung des Gehaltes von ^{13}C an der Carbonylfunktion des CoA und ist demzufolge für die Abreicherung von daraus aufgebauten Isoprenoide und Fettsäuren verantwortlich (DeNiro und Epstein, 1977; Melzer und Schmidt, 1987). Dem Enzym Pyruvat-Decarboxylase ist ein ähnlicher Effekt geschuldet, nämlich die ^{13}C -Abreicherung an der Carbonylfunktion von Acetaldehyd (Alvarez et al., 1991; Sun et al., 1995).

Wie Gleixner und Schmidt 1997 nachweisen konnten, kommt es bei der Glykolyse und Gluconeogenese bedingt durch die 1,6-Bisphosphat-Aldolase zu einer Anreicherung von Kohlenstoff an der Position C_3 und C_4 von Kohlenhydraten; eine Abhängigkeit von der Orientierung der Gleichgewichtsreaktion ist gegeben.

2.4 Isotopenfraktionierungen von Sauerstoff

2.4.1 Thermodynamische Isotopenfraktionierungen

Sauerstoff ist das häufigste und am weitesten verbreitete Element auf der Erde. Es existieren in der Natur drei stabile Sauerstoffisotope: ^{16}O (Häufigkeit 99,76 %), ^{18}O (Häufigkeit 0,20 %) sowie ^{17}O (Häufigkeit 0,04 %). Große Mengen sind im Wasser und in der Luft zu finden. Mengenmäßig weniger bedeutsam, aber für das Verständnis von Isotopenfraktionierungen wichtig, ist das Vorkommen als Kohlenstoffdioxid in der Luft. Wasser, CO_2 und der Luftsauerstoff sind Hauptquellen für Sauerstoff in organischem Material. Die Tatsache, dass es hier im Gegensatz zu Wasserstoff und Kohlenstoff mehrere Quellen gibt, macht es äußerst schwierig, Voraussagen über die Diskriminierungen innerhalb der Pflanze zu machen. Von der thermodynamischen Seite her ist die Situation jedoch ähnlich wie bei Wasserstoff: aus dem Meerwasser mit eng begrenzter Sauerstoff-Isotopenzusammensetzung wird durch Verdunstungsprozesse bevorzugt das Wasser verdampfen, welches das leichtere Isotop ^{16}O enthält. Analog den Vorgängen bei Wasserstoff ist somit der Wasserdampf in den Wolken abgereichert an ^{18}O . Da auch hier bevorzugt die schwereren Isotope kondensieren, kommt es auf dem Weg der Wolken über das Land zu weiteren Abreicherungen, d.h. der Niederschlag ist im Landesinneren abgereicherter (Kontinentaleffekt), und in höheren Lagen kommt es zu einer weiteren Abreicherung von ^{18}O (Höheneffekt) (Friedmann et al., 1964). Daraus ergibt sich der bereits bei Wasserstoff angesprochene lineare Zusammenhang zwischen Sauerstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnissen im Niederschlag (Craig, 1961; Dansgaard, 1964). Ferner hängt die Isotopenzusammensetzung auch von Temperatur, Niederschlagsmenge, geographischer Lage, Entfernung zum Meer, Salzgehalt und saisonalen Einflüssen ab (Epstein und Mayeda, 1953; Dansgaard, 1964). Der für Mitteleuropa zu erwartende Gehalt an ^{18}O im Niederschlagswasser liegt zwischen -6 und -9 ‰ gegen VSMOW (Fürstel, 1985).

Durch die Transpirationseffekte in den Pflanzen kommt es –analog zu Wasserstoff- zu einer Anreicherung des schwereren Isotops im Blatt- und Fruchtwasser.

Zu den Besonderheiten bei Wasserpflanzen (Aufnahme von gelöstem CO_2 aus dem Wasser) sei hier auf die einschlägige Literatur verwiesen (Epstein et al. 1977; Kroll et al., 2008).

Verglichen mit Wasserstoff sind die Fraktionierungen bei Sauerstoff aufgrund der geringeren Massendifferenz der Isotope geringer.

Obwohl nur zu 0,03 % in der Atmosphäre vorhanden, hat Kohlenstoffdioxid erhebliche Auswirkungen auf die Isotopenzusammensetzung pflanzlicher Verbindungen. Dies ist zum einen dem extrem hohen Gehalt an ^{18}O ($\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} \approx +41\text{‰}$) geschuldet und zum anderen dem bei Kohlenstoff bereits erwähnten Austausch von CO_2 mit der Hydrosphäre über Hydrogen-

carbonat. Der $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ -Wert des Luftsauerstoffs bewegt sich mit +23,5‰ zwischen dem von CO_2 und Meerwasser ($\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} \approx 0\text{‰}$). Dieser Wert ist unabhängig von der geographischen Lage (sog. Dole-Effekt, Dole et al., 1954) und entsteht durch eine Art steady-state-Gleichgewicht zwischen Freisetzung von Sauerstoff bei der Photosynthese (annähernd gleiches Isotopenverhältnis wie im Wasser, s.u.) und bevorzugter Aufnahme des leichteren Isotops ^{16}O bei der Respiration von Pflanzen und Tieren.

2.4.2 Isotopenfraktionierungen in Pflanzen

Bei der Photosynthese muss man zwei Arten der Sauerstoffaufnahme berücksichtigen: Zum einen die Photolyse des Wassers im Photosystem II der Pflanze; hierbei tritt keine Fraktionierung auf, der Isotopenwert des entstehenden Sauerstoffs ist identisch mit dem des verstoffwechselten Wassers. Dagegen erfolgt bei der Photorespiration eine sehr starke Diskriminierung bei der (ebenfalls RUBISCO-katalysierten) Oxygenierung von 1,5-Ribulosebisphosphat; dies hat auch nicht unbedeutenden Einfluß auf das globale Isotopenverhältnis des Luftsauerstoffs, der verglichen mit dem Meerwasser stark an ^{18}O angereichert ist (Guy et al.; 1993).

Allgemein lässt sich sagen, dass in pflanzlichen Verbindungen eine ^{18}O -Anreicherung gegenüber dem Wasser beobachtet werden kann (Sternberg und DeNiro, 1983). Der Sauerstoff der Kohlenhydrate stammt zwar aus dem stark angereicherten Kohlenstoffdioxid der Atmosphäre (DeNiro und Epstein, 1979), jedoch kommt es durch Austausch- und Gleichgewichtsreaktionen mit Wasser und/oder durch andere Isotopie-Effekte bei den einzelnen biochemischen Reaktionsschritten zu einer Abreicherung von ^{18}O gegenüber CO_2 . Die Hypothese, dass der Sauerstoffisotopenwert der Kohlenhydrate nur auf einem Gleichgewicht zwischen dem stark angereicherten Kohlenstoffdioxid und dem dagegen relativ abgereicherten Wasser beruht, wird seit einiger Zeit in Frage gestellt (Schmidt et al. 2001). Da man bei Betrachtung im Wachstum befindlicher *Escherichia coli*-Zellen herausgefunden hat, dass deren intrazellulär produziertes Wasser einen Anteil von bis zu 70% am Gesamtanteil des intrazellulären Wassers ausmacht (Kreuzer-Martin et al., 2005), stellen sich aktuell die Fragen nach der Übertragbarkeit auf Pflanzenzellen und letztenendes nach der Auswirkung auf die dortigen Sauerstoff-Isotopenverhältnisse. Möglicherweise könnte der Einfluss des Niederschlagswassers auf die Isotopenverteilung kleiner als bisher angenommen sein.

Die ^{18}O -Verhältnisse des CO_2 bestimmen den $\delta^{18}\text{O}$ -Wert der biosynthetisierten Produkte in Verbindung mit Diskriminierungen bei der Diffusion und einer Gleichgewichtsreaktion mit Wasser. Hinzu kommen vermutlich noch Austauschreaktionen zwischen den pflanzlichen Produkten und Wasser (Sternberg 1989; Wedeking und Hayes, 1983; Ferhi und Létolle, 1977; Farquhar et al., 1993). Das Ausmaß des Einflusses dieser Austauschreaktionen wäh-

rend der Biosynthese im Gewebe ist immer noch in der Diskussion; nach Meinung von Schmidt et al. (2001) ist der Einfluss weitaus geringer als früher angenommen. Durch die Überlappung diverser Austausch- und Gleichgewichtsreaktionen während pflanzlicher Biosynthesen ist die Deutung oder Voraussage von Sauerstoffisotopenverhältnissen einzelner Verbindungen schwierig; hinzu kommen noch mögliche Austauschreaktionen bei der Isolierung der Verbindung für analytische Zwecke. Alleine bei den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnissen des Sauerstoffatoms eines Alkohols ist die Lage kompliziert: die Isotopenverhältnisse variieren teils gewaltig, je nachdem wie die Hydroxygruppe gebildet wurde (Reduktion von Carbonylgruppen, Hydroxylierung, Addition von Wasser oder Hydroxid-Ionen). Bekannt ist, dass Monooxidase-Katalyse stark diskriminiert und die eingeführten Hydroxygruppen $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ -Werte von ca. 0 ‰ bis +7 ‰ aufweisen (z.B. Vanillin, Himbeerketon, Steroide, Phenole) (Schmidt et al., 2001).

2.5 Anwendung und Methodik der Stabilisotopenanalyse in der Lebensmittelchemie

2.5.1 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Die bedeutendste Methode zur Isotopenanalytik in der Lebensmittelchemie ist die Massenspektrometrie. Die großen Vorteile hierbei sind die vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten der Gerätschaften. Das Prinzip ist recht einfach: Mittels elementaranalytischer Aufschlussverfahren (Verbrennung oder Pyrolyse) wird die zu untersuchende Probe in ein einfaches Messgas überführt (je nach Element; vgl. Tabelle 1). Diese Umsetzung geschieht normalerweise ohne Isotopenfraktionierung und quantitativ. Anschließend werden die isotopomeren Gasmoleküle durch Elektronenstoss-Ionisation (EI) ionisiert, beschleunigt und im Magnetfeld des Sektorfeld-Massenspektrometers nach ihrem Verhältnis Masse zu Ladung getrennt. Die Detektion erfolgt an klassischen Faraday-Kollektoren. Computergestützte Berechnungen und der dabei stattfindende Vergleich mit internationalen zertifizierten Standards ergeben dann das Isotopenverhältnis der Probe, ausgedrückt als δ -Wert (Schmidt et al., 2007; Kroll et al., 2008).

Seit längerem gängig ist die Bestimmung der Stabilisotopenverhältnisse mittels Elementaranalysator-Pyrolyse-Stabilisotopenmassenspektroskopie (EA-P-IRMS) und –Verbrennung (Combustion) (EA-C-IRMS). Die entsprechenden Substanzen müssen dabei in größeren Mengen rein vorliegen, was gegebenenfalls komplizierte Stofftrennungen voraussetzt. Bei der in der Lebensmittelchemie wichtigen Aromastoffanalytik kommt meist die Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ - und $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Verhältnisse durch HRGC-IRMS zur Anwendung; bei den Wasserstoffbestimmungen ist auf den dynamischen Linearitätsbereich besonderes Augenmerk zu legen (Schmidt et al., 2007; Richling et al., 2007).

Erst seit ca. zehn Jahren ist es möglich, pyrolytisch $^2\text{H}/^1\text{H}$ - sowie $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnisse gaschromatographisch zu determinieren (HRGC-P-IRMS); früher war lediglich eine gaschromatographische Bestimmung von $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnissen über Verbrennungsinterface möglich (HRGC-C-IRMS).

Auch im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung werden heute verschiedene Techniken der Isotopenverhältnisbestimmung angewandt, meist mit dem Ziel, entweder Aussagen über die Authentizität eines Aromastoffs oder über die Herkunft eines Lebensmittels zu machen (Schmidt et al., 2005a; Richling et al., 2007). In Abbildung 2.4 ist der Aufbau des für diese Arbeit verwendeten Systems zur Isotopenverhältnisanalyse gezeigt.

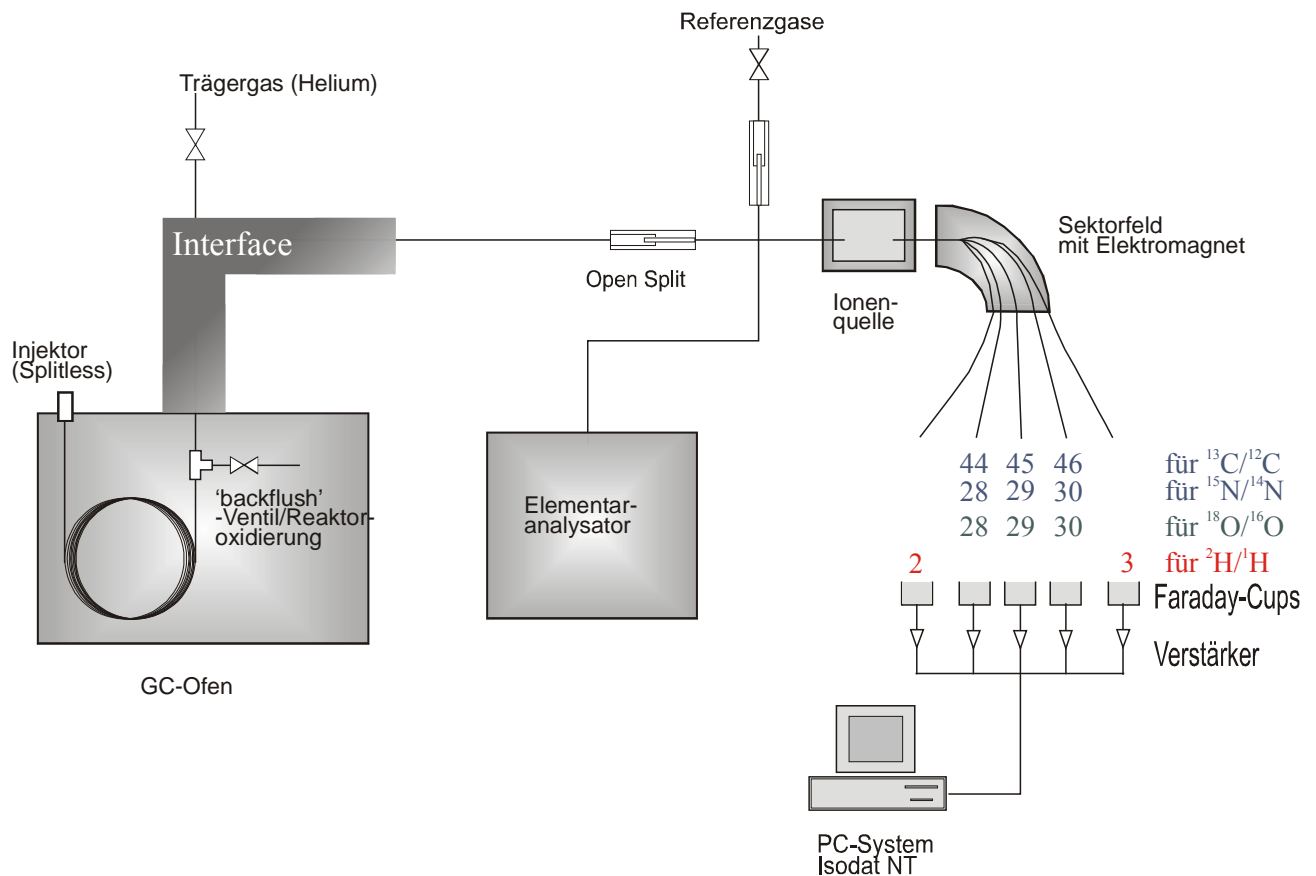


Abb. 2.4: Schematischer Aufbau des in der vorliegenden Arbeit verwendeten IRMS-Systems.

2.5.1.1 Elementaranalyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-IRMS)

Die Verwendung von Elementaranalysatoren (EA) zur Isotopenverhältnisbestimmung ist ein relativ unkompliziertes Verfahren, das jedoch Reinstsubstanzen im Milligramm-Bereich erfordert. Üblicherweise müssen diese Reinstoffe erst präparativ aus einem Lebensmittel isoliert werden. Alternativ misst man die komplette Probe und erhält so einen sog. bulk-Wert. Aromastoffmischungen, die man aus Früchten oder Pflanzen extrahiert hat, lassen sich erst nach umfangreicher Auftrennung und Aufkonzentrierung der Einzelverbindungen messen; hier bietet sich als Alternative die HRGC-IRMS an. Dennoch ist die Verwendung des Elementaranalysators oft angebracht: ein schneller Probendurchsatz, ein unkompliziertes, weniger fehleranfälliges System sowie die Möglichkeit, die von der IAEA (Wien) herausgegebenen Primär- und Sekundärstandards direkt mit dem EA zu messen sind enorme Vorteile dieses Verfahrens. Außerdem benötigt man den EA oft, um laboreigene Tertiärstandards (working standards) zu messen. Dies hat den Hintergrund, dass leider trotz intensiver Bemühungen für die gaschromatographische Analyse noch keine internationalen Standards zur Verfügung stehen. Vergleicht man nun den mittels EA ermittelten Wert des Tertiärstandards mit

dem via HRGC-IRMS ermittelten und stellt hinreichende Übereinstimmung fest, so kann man den Tertiärstandard als geeignet betrachten und ihn als „working standard“ verwenden.

Die zwei zur Erstellung dieser Arbeit verwendeten Elementaranalysatoren (ein Pyrolyse-EA sowie ein Combustion-EA) sind parallel zur HRGC über ein Nadelventil an das Isotopenmassenspektrometer gekoppelt worden. Das HRGC-System konnte dabei mittels „open split“ und Helium-Backflush entkoppelt werden, um die EA-Messungen nicht zu beeinträchtigen (vgl. Abb 2.4).

2.5.1.1.1 Elementaranalyse-Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-C-IRMS)

Bei der elementaranalytischen Bestimmung von Kohlenstoff verwendet man ein auf etwa 1000°C temperiertes Rohr aus Quarzglas, das mit Wolframoxid und Kupfer gefüllt ist. Unmittelbar vor der Messung wird eine gewisse Menge Sauerstoff eingeleitet, die das Kupfer zu Kupfer-I-oxid oxidiert. Dann wird mittels eines Autosamplers eine mit dem Analyten gefüllte, zugefaltete Zinnkapsel eingeführt. Es erfolgt eine blitzartige Verbrennung des Zinns zu Zinnoxid und eine nachfolgende Verbrennung des Analyten; das in Verbindung mit dem Katalysator entstehende Messgas Kohlenstoffdioxid stammt ausschließlich aus dem Kohlenstoffgerüst des Analyten und reflektiert damit dessen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis. Dabei entstehende Stickoxide, die im Fall von NO_2 aufgrund desselben Masse-/Ladungsverhältnisses die Bestimmung stören würden, werden durch elementares Kupfer zu Stickstoff reduziert. Ein konstanter Strom getrockneten Heliums überführt das gebildete Messgas ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$, $m/z=44$ bzw. 45) in einen Wasserabsorber (Magnesiumperchlorat) und dann weiter auf eine temperierte gepackte GC-Säule mit Molekularsieb, in der das Messgas von anderen Gasen getrennt wird. Im Sektorfeld-Massenspektrometer, das im Fall von Kohlenstoff auf die Massen-/Ladungsverhältnisse 44,45 und 46 eingestellt ist, erfolgt Auftrennung und Detektion. Vorher ist es jedoch nötig, das System durch Einleitung von zertifiziertem CO_2 -Referenzgas zu kalibrieren und dies anhand der IAEA-Standards (z.B. IAEA-CH-7 Polyethylenfolie) zu prüfen.

Zur Messung der Stickstoff-Isotopenverhältnisse (Messgas N_2) verfährt man analog, jedoch verwendet man Carbosorb®, um anfallendes CO_2 zu binden, das in der Ionenquelle zu Kohlenstoffmonoxid (CO) reduziert werden kann und wegen gleicher Massen-/Ladungsverhältnisse die Messung verfälscht. Natürlich verwendet man im Vergleich zu CO_2 andere Standards und Referenzgase.

2.5.1.1.2 Elementaranalyse-Pyrolyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-P-IRMS)

Die elementaranalytische Bestimmung von Wasserstoff- und Sauerstoffisotopenverhältnissen gelingt nach Pyrolyse der in einer Silberkapsel verpackten Probe in einem 1440°C heißen Glaskohlenstoffrohr, das mit Glaskohlenstoffsplintern, Nickelwolle (fakultativ) und (Nickel)kohle gefüllt ist. Nachdem der Autosampler die Silberkapsel in den Reaktor eingebracht hat erfolgt Hochtemperaturpyrolyse mit Bildung der Pyrolyseprodukte $^1\text{H}^1\text{H}/^1\text{H}^2\text{H}$ und $^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$. Nach der Passage von Magnesiumperchlorat (Wasserfalle) und Carbosorb® (zu den Gründen siehe voriges Kapitel) werden die entstehenden Gase an einer temperierten gepackten GC-Säule getrennt und gelangen in das Isotopenmassenspektrometer (vgl. Abb 2.5). Dort wird je nach Einstellung entweder das Wasserstoff-Isotopenverhältnis ($^1\text{H}^1\text{H}/^1\text{H}^2\text{H}$; $m/z=2$ bzw. 3) oder das Sauerstoff-Isotopenverhältnis bestimmt ($^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$; $m/z=28$ bzw. 30) bestimmt. Auch hier muss zuvor das System durch Einleitung von zertifiziertem Wasserstoff-Referenzgas kalibriert und dies anhand der IAEA-Standards (z.B. IAEA-CH-7 Polyethylenfolie bei Wasserstoff) geprüft werden (Appel, 2008). Bei Sauerstoff-Bestimmungen geschieht dies anhand des im Labor vorhandenen, nicht-zertifizierten CO-Gases (metastabil, working standard), welches täglich mit einem geeigneten IAEA-Standard zu kalibrieren ist (z.B. VSMOW).

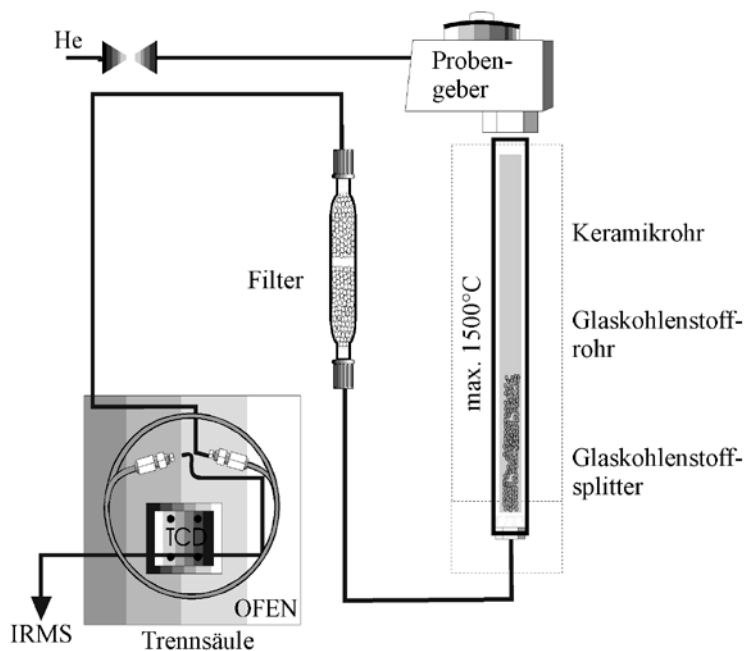


Abb. 2.5 Schematische Darstellung des Aufbaus eines Pyrolyse-EA.

Eine Besonderheit tritt bei der Bestimmung der Wasserstoff-Isotopenverhältnisse auf: es ist erforderlich, den sogenannten H_3^+ -Faktor zu bestimmen. Die liegt darin begründet, dass in der Ionenquelle des Massenspektrometers durch Ionen-Molekül-Reaktionen Linearitätsprobleme auftreten können. So entsteht bei der Ionisierung von Wasserstoffgas neben den gewünschten Ionen HH^+ ($m/z=2$) sowie HD^+ ($m/z=3$) auch ein gewisser Anteil an Ionen der Elektronenmangelverbindung H_3^+ die ungünstigerweise auch das Masse-/Ladungsverhältnis $m/z=3$ aufweist.



Dadurch wird fälschlicherweise ein höherer Deuteriumgehalt als vorhanden gemessen. In der Ionenquelle ist die Bildung und Konzentration der H_3^+ -Ionen vom Partialdruck bzw. der Konzentration des Wasserstoffgases abhängig und steigt mit dem Quadrat des Drucks und somit mit dem Quadrat der Anzahl der H_2^+ (HD^+ , D_2^+)-Ionen an. Dies ergibt sich, da letztere nicht quadratisch, sondern linear mit dem Partialdruck ansteigen (Schmidt, 1974; Habfast, 1997). Die mathematische Korrektur dieses Einflusses kann mittels des Verhältnisses der Ionenströme (i), die bei den Masse-/Ladungsverhältnissen 2 und 3 bei unterschiedlichen Partialdrücken gemessen werden, erfolgen (Habfast, 1997). Die Gleichung hierbei lautet:

$$(Gl. 2.7) \quad \frac{i(3)}{i(2)} = \frac{HD^+ + H_3^+}{H_2^+} = \frac{HD^+}{H_2^+} + \frac{k(H_2^+)^2}{H_2^+} \rightarrow \frac{HD^+}{H_2^+} = \frac{i(3)}{i(2)} - ki(2)$$

Der H_3^+ -Faktor muss also jeweils vor der Wasserstoffisotopenverhältnismessung bestimmt werden, indem man die D/H-Verhältnisse im Wasserstoff-Referenzgas bei unterschiedlichen Partialdrücken bestimmt (Hilkert et al., 1999). Praktisch gelingt dies, indem man den Druck und damit die Menge des einströmenden Wasserstoff-Referenzgases variiert.

Eine weitere Besonderheit bei Wasserstoffisotopenverhältnismessungen stellt der sogenannte lineare Messbereich dar. Durch Probemessungen muss dieser lineare Bereich jeweils ermittelt und bei der Messung unbekannter Proben beachtet werden.

2.5.1.2 Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS)

Auf den ersten Blick überraschend erscheint die Tatsache, dass man für die HRGC-IRMS-Analytik einen handelsüblichen Gaschromatographen verwendet; die dabei gegebene Notwendigkeit spezieller Interfaces für die Verbindung zu Reaktoren und Massenspektrometer sowie die prinzipbedingten Besonderheiten -verglichen mit „normalen“ HRGC-MS Analysen-relativieren dies jedoch.

Die Verwendung eines Autosamplers ist gängig, jedoch fakultativ; SPME-basierte Bestimmungen sind grundsätzlich manuell möglich.

Nach der Injektion, die üblicherweise im splitless-Modus ausgeführt wird (Maximierung der Substanzmenge!), erfolgt eine Trennung auf handelsüblichen Kapillarsäulen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine 60 Meter lange, mit Polyethylenglykol beschichtete Kapillarsäule verwendet. Natürlich kann man auch andere Chromatographiesäulen im Bedarfsfall einsetzen (z.B. PLOT, Cyanopropyl-beschichtete Phasen,...), jedoch sollte im Vergleich zu HRGC-MS-Analysen stets eine deutlich größere Länge gewählt werden, damit ausreichende Trennung gewährleistet ist. Dies ist dem Verlust an Trennleistung im Reaktor und dem nachfolgenden Interface-System geschuldet, da dort prinzipbedingt unbelegte Kapillarsäulen eingebaut sind. Die Temperaturprogramme des HRGC-Ofens sind wie üblich festzulegen.

Eines besonderen Augenmerks bedarf die vollständige Erfassung der gesamten Peakfläche des Analyten, da es ansonsten zu falschen Messwerten kommen kann. Grund hierfür ist die Tatsache, dass es im Lauf der Elution eines Peaks zu Isotopendiskriminierung kommt (Chromatographischer Isotopeneffekt). Eine nur partielle Erfassung eines Peaks bedeutet also die Messung eines falschen Isotopenverhältnisses (Barrie et al., 1984; Shepard et al., 1976; Matthews und Hayes, 1978).

Der schematische Aufbau des von uns verwendeten Systems bestehend aus HRGC-System und Reaktor/Interface-System ist in Abbildung 2.6 zu finden. Ergänzend sei auf die ausführliche Veröffentlichung von Meier-Augenstein (1999) verwiesen.

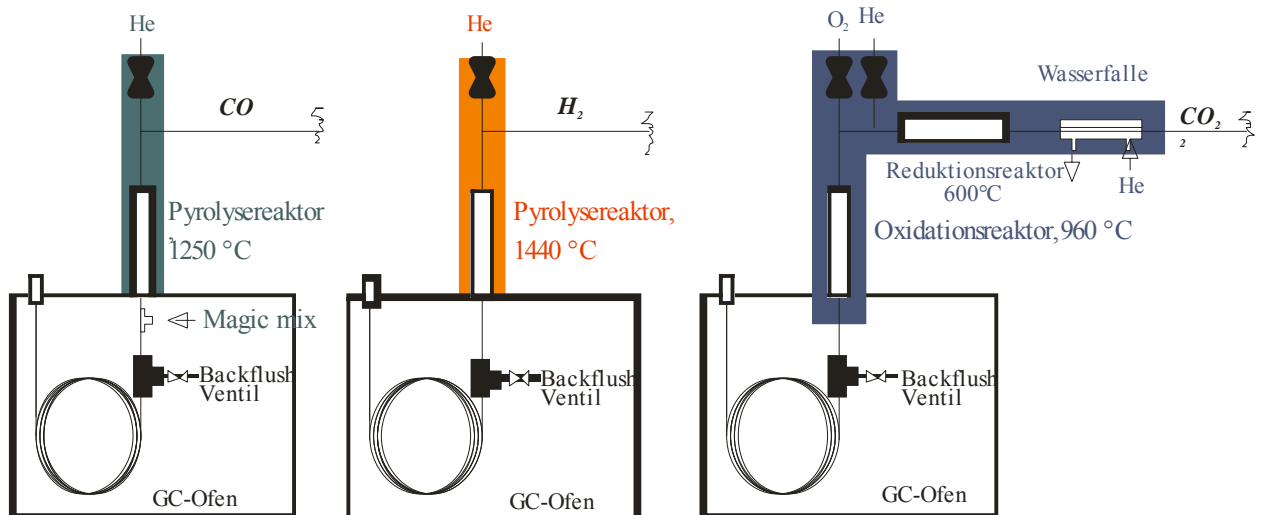


Abb. 2.6: Schematischer Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten GC-Interfaces für die IRMS zur Sauerstoff-, Wasserstoff- und Kohlenstoff-Isotopenverhältnismessung (von links nach rechts).

2.5.1.2.1 Gaschromatographie-Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-C-IRMS)

Das Messprinzip unterscheidet sich nicht gravierend von der EA-C-IRMS-Analyse: die zu untersuchende Verbindung wird in einem Reaktor verbrannt und das entstehende Kohlenstoffdioxid wird im nachfolgenden Massenspektrometer hinsichtlich seiner Isotopenzusammensetzung untersucht. Dies soll aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass der Vorgang „en detail“ durchaus komplexer ist. Die von der Chromatographiesäule eluierenden Substanzen („Peaks“) gelangen über eine Transferkapillare zum eigentlichen Reaktor. Dieser Zufluss wird über eine Art T-Stück kontrolliert, dem sogenannten Backflush-Ventil. Damit kann durch ein- oder ausschalten eines Heliumstromes, der die eluierenden Substanzen zurückdrückt, bestimmt werden, welche Peaks in den Verbrennungsofen gelangen und damit gemessen werden können. Dies ist zum einen nötig, damit nicht Peaks von Substanzen, die man gar nicht messen möchte, den gespeicherten Sauerstoff im Reaktor unnötigerweise verbrauchen und zum anderen, damit eine Reoxidation des Reaktors mit Sauerstoff unkompliziert durchgeführt werden kann.

Da die benötigten Substanzmengen durchweg geringer sind als bei EA-Analysen, ist der Verbrennungsofen den gegebenen Anforderungen angepasst. Er besteht aus einem dünnen Keramikrohr aus Aluminiumoxid (Länge 32 cm, Innendurchmesser 0,5 mm, Außendurchmesser 1,5 mm), das drei winzige Drähte aus Metall als Katalysatoren enthält (Kupfer, Nickel

und Platin). Dieses Keramikrohr wird im Betrieb durch ein Heizelement auf 1040°C temperiert; darin findet die Verbrennung der organischen Substanzen zum Messgas statt. Der für diese Verbrennung nötige Sauerstoff wird nicht wie beim EA zugeleitet, sondern ist in Form von Metalloxiden in den Drähten des Reaktors gespeichert; da er verbraucht wird, ist der Reaktor regelmäßig durch Einleitung von Sauerstoff zu reoxidieren. Ist der Oxidationszustand des Reaktors zu niedrig, resultieren unvollständige Verbrennung und Messung falscher Werte; dies erkennt man dann leicht an den schwankenden Werten des „working standard“. Da neben den gewünschten Messgasen auch andere Verbindungen, meist Stickstoffoxide entstehen, ist dem Oxidationsreaktor ein Reduktionsreaktor nachgeschaltet. Dieser ist im Prinzip gleich aufgebaut, beinhaltet aber statt der drei Metalle nur Kupfer. Mit 620°C ist die Betriebstemperatur auch moderater. Hier wird neben Stickoxiden auch elementarer Sauerstoff entfernt, der die Lebensdauer des Wolframfadens der Ionenquelle negativ beeinflusst. Die Entfernung von Reaktionswasser erfolgt an einer nachgeschalteten Nafion®-Membran (perfluorierter Ionentauscher). Das Messgas gelangt nun über ein letztes Trennventil, den open-split, in das Massenspektrometer. Analog dem bei den EA-Verfahren geschildertem Vorgehen erfolgt die Ausgabe der Isotopenverhältnisse nach Kalibrierung mit CO₂-Referenzgas.

2.5.1.2.2 Gaschromatographie-Pyrolyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-P-IRMS)

Unter Verwendung eines Pyrolyse-Interface gelingt die Messung der Wasserstoff-Isotopenverhältnisse eines Eluenten. Dabei wird mittels Hochtemperaturpyrolyse der in der Verbindung enthaltene Wasserstoff zu molekularem Wasserstoffgas umgesetzt. Nach Passage des T-Stücks des Backflush-Ventils gelangt der Analyt von der Trennsäule in ein Keramikrohr aus Aluminiumoxid (Länge 32cm, Innendurchmesser 0,5mm, Außendurchmesser 1,5mm), das auf 1440°C temperiert ist. Die Umsetzung zu Wasserstoffgas erfolgt bei dieser Konfiguration ohne Katalysator und ist bei Einhaltung enger Temperaturgrenzen quantitativ und damit nicht isotopendiskriminierend (Burgoyne und Hayers, 1998; Hilkert et al., 1999). Eine weitere Aufreinigung oder Trennung des Wasserstoffgases ist nicht erforderlich. Die Einbringung in das Massenspektrometer erfolgt wie bei Kohlenstoff-Analysen durch Passage des „open-split“. Die Kalibrierung mit Wasserstoff-Referenzgas (zertifiziert) gestattet die genaue, EDV-basierte Bestimmung des Isotopenverhältnisses des Eluenten.

Auch hier ist der oben angesprochene H₃⁺-Faktor zu berücksichtigen. Zusätzlich ist der lineare Messbereich der jeweiligen Verbindung zu bestimmen und einzuhalten (Hör, 2001). Da dieser je nach Anzahl der Wasserstoffatome im Molekül schwankt, sind mit Referenzchemikalien geeignete Konzentrationsbereiche für die Messung auszuarbeiten und zu berücksich-

tigen. Dies geschieht, indem verschiedene Konzentrationen an Referenzchemikalien in Verbindung mit der erhaltenen Peakfläche und den Isotopenverhältnissen gesetzt werden. Auch die Verweilzeit der Probe im Reaktor hat einen gewissen Einfluss; wie Burgoyne und Hayes 1998 herausfanden, sollte die Zeit im Reaktor bei der gegebenen Temperatur mindestens 300 ms betragen.

Bei EA-P-IRMS-Analysen sind deartige Effekte nicht oder nur in deutlich schwächerer Form vorhanden, daher bietet sich auch ein Vergleich der über EA und HRGC ermittelten Werte zur Bestimmung des linearen Messbereichs an.

Die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführte Messung der Sauerstoffisotopenverhältnisse via HRGC gelingt mit einem deutlich komplizierterem Reaktorsystem mit Platinkatalysator und Schutzgas; dennoch ist das Prinzip ähnlich: es erfolgt eine pyrolytische Umsetzung des Eluenten zum Messgas Kohlenstoffmonoxid. Da diese Gerätekonfiguration nicht verwendet wurde, wird auf eine genauere Beschreibung an dieser Stelle verzichtet.

2.5.2 Deuterium-Kernresonanzspektroskopie SNIF-NMR[®]

Neben den beschriebenen massenspektroskopischen Methoden der Isotopenverhältnisanalyse mittels IRMS gibt es die Möglichkeit, Wasserstoff-Isotopenverhältnisse mittels Deuterium-Kernresonanzspektroskopie zu bestimmen. Dies ist aufgrund des vorhandenen Spins im Deuteriumkern möglich, der im Magnetfeld von 9,4 Tesla eine Resonanzfrequenz von 64,401 MHz besitzt, während das Proton bei 400 MHz angeregt wird. So kann man in einem Molekül die Verteilung und Häufigkeit des Deuteriums untersuchen (Martin und Martin, 1981; Schmidt et al., 2007). Neben dem Vorteil der stellungsspezifischen Analyse treten allerdings einige in der Praxis gravierende Nachteile auf. Aufgrund des relativ niedrigen Vorkommens von Deuterium in der Natur (0,0145 atom-%) benötigt man eine vergleichsweise hohe Probenmenge und eine lange Messzeit. Aktueller Stand der Technik sind 150 mg Substanzbedarf und 10 Stunden Messzeit (Schmidt et al., 2005a); bei Routineanalysen werden oftmals 1-1,5 g Probe benötigt. Dahingegen benötigen IRMS-basierte Analyseverfahren nur einen Bruchteil der Zeit und der Probenmenge (typischerweise einige mg pro Analyse). Bei SNIF-NMR[®]-Analysen ist es zwingend, dass die Proben als Reinsubstanzen vorliegen, was oftmals erheblichen Aufwand an Probenvorbereitung bedeutet, sofern eine Isolierung überhaupt möglich ist.

Von Vorteil ist die Auskunft über die positionsspezifische intramolekulare Deuteriumverteilung, die wertvolle Aussagen über Herkunft und Synthesegeschichte einer Verbindung geben kann. Beispielsweise ermöglicht bei dem Aromastoff Benzaldehyd nur die SNIF-NMR[®] Aus-

kunft darüber, ob die Verbindung aus der Frucht stammt (natürliches Aroma) oder aus Zimtsäure über retro-Aldolkondensation hergestellt wurde (naturidentisches Aroma); IRMS-Analysen können diese beiden Fälle nicht unterscheiden, da nur der globale Wert der Isotopenverteilung gemessen wird.

Kopplungen der NMR-Signale treten nicht auf, da die Deuteriumhäufigkeit dafür zu gering ist (Schmidt et al., 2007). Die chemischen Verschiebungen der Signale entsprechen der ^1H -NMR-Spektroskopie. Routinemäßige Anwendung in der Lebensmittelchemie findet die Methode in der amtlichen Weinüberwachung.

2.5.3 Anwendungsgebiete der Stabilisotopenanalytik

Für die Lebensmittelchemie war die Einführung der Stabilisotopenanalytik ein enormer Fortschritt. Die vorher gegebenen Grenzen bei der Herkunftsanalyse oder der Kontrolle der Authentizität von Aromastoffen konnten gesprengt werden. Wie soll man einer aromaaktiven Verbindung ansehen, ob sie synthetisch erzeugt wurde oder aus der Pflanze stammt? Bei chiralen Verbindungen gibt es noch die Möglichkeit der enantioselektiven Analyse, aber bei achiralen Komponenten die –wie man am Beispiel Vanillin sehen kann- durchaus bedeutsam sein können, scheidet dieses Verfahren. Man kann einer Verbindung ihre Entstehung anhand klassischer Analysemethoden nicht ansehen. Hier eröffnet die Stabilisotopenanalytik einen neuen Weg, der es meist ermöglicht, die Herkunft einer Verbindung eindeutig zu klären.

Außer bei Aromastoffen wie Vanillin kommt die Stabilisotopenanalyse insbesondere bei der amtlichen Wein- und Fruchtsaft-Analytik zum Tragen. Hierbei können gestreckte (unerlaubtes Chaptalisieren von Wein beispielsweise) und verfälschte Lebensmittel (z.B. unerlaubter Aromazusatz im Saft) erkannt und so Verbraucher –aber auch seriöse Hersteller- geschützt werden. Bei der Herkunftskontrolle mit Stabilisotopenanalyse sind Wein, Käse, Butter und Fleisch Hauptanwendungsgebiete (Positionspapier der Lebensmittelchemischen Gesellschaft „Aufgaben und Möglichkeiten der Isotopenverhältnisanalytik in der Herkunfts- & Authentizitätsuntersuchung von Fleisch, 2007). Neuere Ansätze sind die Kontrolle von diversen Bio-Lebensmitteln anhand der Stickstoff-Isotopenverteilung, die v.a. durch den Dünger bestimmt wird. Bei Bio-Lebensmittel ist die Verwendung synthetischer Düngemittel nicht erlaubt. Über die Authentizität von Bio-Molkereiprodukten kann die Kohlenstoff-Isotopenverteilung im Milchfett Auskunft geben (Molkentin, 2008).

2.5.3.1 Authentizitätskontrolle von Aromastoffen

Vorbemerkung: Am 16. Dezember 2008 wurde die VO (EG) Nr. 1334/2008 verabschiedet; dabei handelt es sich umgangssprachlich um die „neue EU-Aromenverordnung“. Durch diese Verordnung wird die bisherige Richtlinie 88/388/EWG zum 1.1.2011 ersetzt. Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf die aktuelle Rechtslage.

Die Verwendung von Aromastoffen in Lebensmitteln ist durch die Richtlinie 88/388/EWG der Europäischen Union geregelt. Die EU-Verordnung VO (EWG) Nr. 2232/96 setzt Verwendungsbedingungen für Aromastoffe in Lebensmitteln fest. Nach dieser Verordnung müssen die EU-Mitgliedstaaten der Kommission mitteilen, welche Aromastoffe den nationalen Rechtsvorschriften gemäß in Lebensmitteln verwendet werden dürfen. Diese ca. 2800 Stoffe wurden von der Kommission in einem Verzeichnis zusammengestellt, und als Entscheidung 1999/217/EG der Kommission veröffentlicht. Das Verzeichnis bildet die Grundlage eines Programms zur Bewertung dieser Stoffe (Verordnung VO (EWG) Nr. 1565/2000 der Kommission). Nach Abschluss des Verfahrens soll eine Liste von Aromastoffen, die in der Gemeinschaft in oder auf Lebensmitteln verwendet werden dürfen, festgelegt werden. Parallel dazu gilt noch die deutsche Aromenverordnung, welche die Verkehrsfähigkeit und Deklaration von Aromastoffen regelt. In Anlage 1 zu dieser Verordnung findet sich eine Definition der verwendeten Begriffe natürliches Aroma, naturidentisches Aroma und künstliches Aroma. Aromastoffe oder –extrakte, die mit Hilfe von physikalischen Prozessen (Destillation, Extraktion) oder aber durch enzymatische bzw. mikrobiologische Verfahren aus pflanzlichen oder tierischen Ausgangsstoffen hergestellt werden, dürfen als natürliche Aromen bezeichnet werden. Findet aber eine vollsynthetische Herstellung statt oder werden unter Verwendung von in der Natur vorkommenden pflanzlichen oder tierischen Ausgangsstoffen chemisch-synthetische Prozesse angewandt, um einen in der Natur vorkommenden Aromastoff in gleicher Molekülstruktur nachzubauen, so spricht man von naturidentischen Aromastoffen. Künstliche Aromastoffe haben dahingegen in der Natur kein Vorbild und werden üblicherweise synthetisch produziert; hierunter fallen die in der Aromenverordnung aufgeführten 17 Substanzen, die nur für bestimmte Lebensmittel zugelassen sind.

Da natürliche und naturidentische Aromastoffe gleiche Molekülstruktur besitzen, ist eine analytische Differenzierung eine Herausforderung. Vor diesem Hintergrund und der Tatsache, dass zwischen diesen beiden Klassen ein erheblicher preislicher Unterschied besteht (bis zu dreistelligen Prozentzahlen), ist Fälschung sehr lukrativ.

Bei chiralen Verbindungen existiert noch eine inzwischen klassische Analysenmethode: die quantitative Bestimmung des Enantiomerenüberschuss (ee-Wert, enantiomeric excess). Da

biosynthetisch erzeugte Verbindungen im Allgemeinen nicht als Racemat auftreten, sondern bei diesen meist ein Enantiomer –mehr oder weniger stark- bevorzugt wird, erlaubt die Analyse an chiraler Phase eine Bestimmung des ee-Wertes und damit eine Differenzierung zwischen natürlichem und naturidentischem Aromen. Dabei ist Voraussetzung, dass die Schwankungsbreiten der ee-Werte von den untersuchten Pflanzengruppen bekannt sind (Mosandl, 2004).

Bei achiralen Verbindungen wie z.B. Vanillin versagt die Methode naturgemäß. Auch die immer verfeinerteren Möglichkeiten der stereoselektiven Synthese bzw. Enantiomerentrennung vermindern die Aussagekraft der enantioselektiven Analyse mehr und mehr.

Im Verlauf der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts ergab sich die technische Realisierung von HRGC-C-IRMS-Analysen für das Element Kohlenstoff. In Folge dessen wurden zahlreiche aromawirksame Verbindungen hinsichtlich ihres Kohlenstoff-Isotopenverhältnisses untersucht. Es zeigte sich, dass sich nur relativ wenige Aromastoffe damit sinnvoll prüfen ließen. Dies liegt allem voran darin begründet, dass die Kohlenstoffisotopenverhältnisse eines Moleküls vorwiegend durch den Photosynthesetyp determiniert sind; bei den allermeisten Pflanzen ist dies der C₃-Typ. Synthetisch hergestellte Verbindungen weisen leider meist ähnliche Isotopenverhältnisse wie die C₃-Pflanzen auf. Dennoch eignet sich die Analytik der Kohlenstoffisotope zur Differenzierung von Aromastoffen, die aus C₄-Pflanzen stammen, da diese weniger an ¹³C angereichert sind (Ruff, 2001).

Mit der fortschreitenden Entwicklung der Stabilisotopenanalyse kam es Ende der 90 Jahre zur kommerziellen Verfügbarkeit von HRGC-P-IRMS Interfaces, die Messungen von Sauerstoff- und Wasserstoff-Isotopenverhältnissen ermöglichen. Von diesem Zeitpunkt an konnten also HRGC-Analysen der Elemente Sauerstoff und Wasserstoff durchgeführt werden, was zahlreiche neue Möglichkeiten eröffnete (Werner et al., 1996; Hener et al., 1998; Hilker et al., 1999). In Folge wurden empirische Datenbanken zur Authentizitätsbewertung aufgebaut, die in zahlreichen Fällen eine Differenzierung zwischen in Pflanzen entstandenen, synthetischen und biotechnologisch erzeugten Verbindungen zuließen. Es darf nicht vergessen werden, dass dieses Verfahren jedoch mit erheblichem Arbeitsaufwand verbunden ist und dabei auch zahlreiche Referenzverbindungen unterschiedlicher Herkunft untersucht werden müssen, um Aussagen über die Authentizität treffen zu können. Bedeutende Aromaverbindungen wurden hinsichtlich ihrer Isotopenverhältnisse bereits untersucht; so seien hier erwähnt: Vanillin (Kaunzinger et al., 1997; Hör, 2001; Scharrer und Mosandl, 2002), Benzaldehyd (Culp und Noakes, 1990; Ruff et al., 2000), Linalool und Linalylacetat (Hör et al., 2001a; Jung et al., 2005), Citral (Hör et al., 2001b; Bilke und Mosandl, 2002; Nhu-Trang et al., 2006), α- und β-Ionon (Sewenig et al., 2005; Caja, 2007; Kroll et al. 2008), γ- und δ-Decalacton (Tamura et al., 2005), Zimtaldehyd (Culp und Noakes, 1990; Sewenig et al., 2003), Zimtsäure und –

derivate (Schmidt et al., 2007; Fink et al., 2004), aliphatische und fruchteigene Ester (Schmidt et al., 2007; Preston et al., 2003 und 2004; Kahle et al., 2005) und diverse „Grünnoten“ ($C_{6/9}$ -Alkohole) (Bréas et al., 1994; Hör et al., 2001a; Elss et al., 2006; Appel, 2008).

2.5.3.2 Sonstige Anwendungen der Stabilisotopenanalyse

Außer der Authentizitätsbewertung dient die Stabilisotopenanalyse auch zum Nachweis von Verfälschungen („Streckungen“) von Lebensmitteln; ein Paradebeispiel ist die nachträgliche Zuckering von Traubenmost bei der Weinbereitung. Mittels der beschriebenen Methode der Deuterium-Kernresonanzspektroskopie lässt sich der Deuteriumgehalt der Methylgruppe des gebildeten Ethanols untersuchen. Die Deuteriumverteilung an dieser Stelle reflektiert die Deuteriumverhältnisse im vergorenen Zucker. In Kombination mit den mittels IRMS bestimmten Kohlenstoff-Isotopenverhältnissen des Ethanols gelingt es, eine Zuckering des Traubenmostes im Nachhinein zu beweisen; die Mostanreicherung (Chaptalisieren) ist zumindest bei Prädikatsweinen nicht gestattet (Bauer-Christoph et al., 1997).

Ein Wasserzusatz im Wein oder Saft kann anhand der Sauerstoffisotopenverhältnisse nachgewiesen werden. Die Durchführung erfolgt üblicherweise indirekt über Äquilibrierung des Wassers mit Kohlenstoffdioxid. Eine länderspezifische Datenbank ermöglicht eine Verifizierung der deklarierten Herkunft (europäische Weindatenbank, VO (EG) Nr. 2729/2000; Joint Research Centre, Ispra sowie Drittlandsweindatenbank des BfR, Berlin) (Schmidt et al., 2005a), was nicht nur angesichts einer Täuschung des Verbrauchers, sondern auch im Hinblick auf Subventionsbetrug wichtig ist.

Ein weiteres Feld für die Stabilisotopenverhältnisanalyse ist die Fruchtsaftanalyse. Neben den o.g. Nachweis eines exogenen Aromas ist es auch möglich, zwischen Direktsaft und Saft aus Konzentrat, dessen Sauerstoff-Isotopenverhältnis durch das zugesetzte Trinkwasser dominiert wird, zu differenzieren. Der Nachweis auf Zuckering kann nach Vergärung analog zum Vorgehen bei Wein durchgeführt werden. Die Säuerung von Säften erkennt man an den Wasserstoff-Isotopenverhältnissen der als Calciumsalz gefällten Zitronensäure: ist diese nicht aus dem Saft, sondern nach dem gängigen Verfahren der Zuckerfermentation hergestellt, weist sie einen niedrigeren Deuteriumgehalt auf (Jamin et al., 2005).

Eine Zuckering findet illegal auch oft bei Honigen statt. Dies ist über das Verhältnis der Kohlenstoffisotope vom gesamten Honig in Relation zu dem der darin enthaltenen Proteine zu beweisen (Schmidt et al., 2005a). Alternativ kann man mittels Kopplung von Hochdruckflüssigkeitschromatographie und IRMS (HPLC-IRMS) die Relationen der $\delta^{13}C_{VPDB}$ -Werte der einzelnen Zuckerarten des Honigs vergleichen und so eine Zuckering nachweisen.

Neben Honig bietet auch der Ahornsirup ein Verfälschungspotential. 2006 beschrieben Tremblay und Paquin eine Methode, die anhand der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse der als Blei-Salz gefällten Äpfelsäure eine Zuckering nachweisen soll.

Bereits seit 2003 ist die Unterscheidung zwischen natürlichem und synthetischem Koffein möglich (Richling et al., 2003); so lässt sich anhand der Sauerstoff-Isotopenverhältnisse nachweisen, ob z.B. Guarana-Extrakt oder einfach synthetisches Koffein verwendet wurde.

Ungleich komplexer ist die Herkunftsanalyse mittels Stabilisotopenmassenspektrometrie. Hier ist es erforderlich, die Isotopenverhältnisse mehrerer Elemente ggf. unter Zuhilfenahme weiterer chemischer Parameter und statistischer Verfahren zu erfassen. Camin et al. (2004) beschrieben eine Methode, die geographische Herkunft von Käse zu bestimmen. Hierbei werden die Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Isotopenverhältnisse des enthaltenen Caseins mit den Sauerstoff- und Kohlenstoff-Isotopenverhältnissen des Glycerins kombiniert. Nach Ansicht der Autoren gelingt so die Unterscheidung zwischen französischen, italienischen und spanischen Käsen. 2007 publizierten Camin et al., dass eine Herkunftsbestimmung von Lammfleisch durch Kombination der Wasserstoff-, Stickstoff-, Kohlenstoff- und Schwefel-Isotopenverhältnisse möglich sei.

Lebensmittel aus ökologischem Anbau erringen immer höhere Marktanteile. Der existierende Nachfrageüberhang macht Betrug in Verbindung mit einem hohen Verkaufserlös attraktiv. Obwohl vor Ort in den Betrieben regelmäßig kontrolliert wird, ist gewollter Betrug nie auszuschließen. Kontrollen vor Ort sind zwar besser als nachträgliche Analysen, aber auch hier kann die Stabilisotopenmassenspektroskopie wertvolle Hilfe sein. Erste Arbeiten haben gezeigt, dass es prinzipiell möglich sein sollte, bei ausgewählten Lebensmitteln zwischen konventioneller und biologischer Erzeugung zu unterscheiden. Dennoch waren die bisher erhaltenen Ergebnisse nicht durchweg eindeutig, und es bedarf noch weiterer Forschungsarbeit (Schmidt et al., 2005b; Georgi et al., 2005).

Da Tieren in ökologischer Haltung deutlich weniger Mais-Krafftutter gegeben wird (C_4 -Pflanze!), lässt sich ein Nachweis aus dem Fleisch durch Analyse der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse führen, das aufgrund des relativ hohen Anteils an C_3 -Pflanzen (Raufutter statt Silomais!) an ^{13}C angereicherter sein sollte (Boner und Förstel, 2004). Dies gilt sinngemäß auch für das Milchfett von Bio-Kühen (Molkentin, 2008).

Einen Hinweis auf Freilandhaltung sollte das Stickstoff- und Kohlenstoff-Isotopenverhältnis von Hühnereiern liefern, obgleich damit ein Beweis (noch) nicht möglich ist (Schmidt et al., 2005a).

2.6 *Olea europaea* - Botanik

Oliven sind Steinfrüchte des Ölbaums *Olea europaea* L. var. *europaea*. Dieser gehört zur Familie der Ölbaumgewächse Oleaceae, die wiederum zur Ordnung der Lippenblütlerartigen (Lamiales) zählen. Diese Kulturform leitet sich von der Wildform *Olea europaea* ssp. *sylvestris*, auch Oleaster genannt, ab. Die Geschichte des Ölbaums geht nachweislich zu den Semiten und Ägyptern zurück; die Hauptanbaugebiete finden sich im gesamten Mittelmeerraum. Es sollen etwa 1275 verschiedene Sorten weltweit existieren, kommerziell bedeutsam sind jedoch deutlich weniger (Bertolini et al., 1998).

Der zu den Dikotyledonen gehörende Ölbaum ist immergrün und verliert jahreszeitunabhängig jeweils etwa 2 Jahre alte Blätter. Diese sind schmal-elliptisch, ungeteilt und haben an der Oberseite eine graugrüne Färbung, wohingegen die Unterseite aufgrund von Härchen silbrigweiß glänzt; die Härchen mindern die Diffusionsverluste durch die Spaltöffnungen.

Das Gewächs erreicht eine Höhe von bis zu 20 Metern und kann mehrere hundert Jahre alt werden, obwohl das Holz im Inneren des Stamms abstirbt und dieser dadurch hohl wird. Dies erzeugt das typisch zerklüftete Aussehen des Ölbaums.

Aus den Kurztriebknospen entstehen im Februar die Blütenanlagen. Anfang Juni öffnen sich vierzählige gelbweiße Blüten mit zwei Staubblättern und einem Fruchtknoten, der aus 2 miteinander verwachsenen Fruchtblättern besteht. Im Fruchtknoten gibt es vier Samenanlagen, von denen sich jedoch nur eine durch Windbestäubung zum Samen entwickelt. Die Oliven reifen bis Oktober-Dezember heran und besitzen eine grünliche, später eine blauschwarze Färbung (die im Handel erhältlichen „schwarzen“ Oliven sind üblicherweise durch Eisen-(II)-gluconat/-lactat geschwärzt). Die Fruchtreifung bedarf warmer Temperaturen von ca. 18-22 °C. An trockene, heiße Standorte des Mittelmeerraumes angepasst, verträgt der Ölbaum durchaus auch eine Temperatur von bis zu 40 °C, obwohl der C₃-Photosynthesetyp vorliegt. Magere Böden genügen der Pflanze ebenso wie ein Jahresniederschlag von 200 mm. Zum Vergleich: im Mittel liegt die Niederschlagsmenge in Deutschland bei etwa 770 mm, in Würzburg als trockenerer Region bei 580 mm.

Die pflaumenartigen, 1-20 g schweren Steinfrüchte des Ölbaums, die Oliven, klassisch aus Exokarp, Mesokarp, Endokarp und Samen bestehend, haben im Fruchtfleisch (Mesokarp) einen Ölgehalt von 20-50 %. Sie können bei gewissen Sorten bis zu 3,5 cm lang werden. Lediglich 8% der geernteten Oliven kommen als Speiseoliven in den Handel; hierbei sollte man zweckmäßigerweise spezielle Sorten mit großem Fruchtfleisch nutzen, da klassische Sorten zur Ölgewinnung für den Verbraucher meist unattraktiv, gar winzig aussehen. Der im Fruchtfleisch vorhandene, glykosidisch gebundene iridoide Bitterstoff Oleuropein muss durch Einlegen in alkalische Kochsalzlösung (Alternativverfahren: Gärung) beseitigt werden; außer-

dem ist in Oliven das angeblich hypotensiv wirkende α -Pyron-Derivat Elenolid enthalten. Beachtenswert im Hinblick auf „bioaktive“ Wirkungen sind auch die enthaltenen phenolischen Verbindungen wie Hydroxytyrosol (Richter, 1996).

Der Ertrag der Ölbäume unterliegt starken Schwankungen. Als Durchschnitt kann man 60-65 kg Oliven pro Baum und Jahr ansehen. Da die ersten Erträge meist erst in einem Alter von etwa 10 Jahren anfallen, und die Höchstserträge zwischen dem 60. und 100. Lebensjahr liegen, ist beim kommerziellen Anbau sorgfältige Planung unerlässlich. Durch Waldbrände zerstörte Olivenhaine treffen die Landwirte in den betroffenen Regionen aus oben genannten Gründen besonders hart.

Aus 100 kg Oliven lassen sich trotz des hohen Ölgehaltes meist nur ca. 15 Liter Öl gewinnen.

Außergewöhnlich –und insbesondere für die Stabilisotopenanalytik bemerkenswert- ist die Tatsache, dass es sich beim Ölbaum zwar um eine C_3 -Pflanze handelt, aber eine in den grünen Oliven selbst stattfindende zusätzliche CO_2 -Fixierung analog dem C_4 -Mechanismus abläuft (Sanchez und Harwood, 2002). Die Biosynthese der Fettsäuren und Triacylglyceride erfolgt hingegen nach den bei Pflanzen üblichen Mechanismen. Sanchez und Harwood (2002) gelang es durch praktische Versuche (Lichtenzug Blätter / Oliven) zu beweisen, dass diesem alternativen CO_2 -Fixierungsweg erhebliche Bedeutung für die Größe und dem Ölgehalt der Früchte zukommt. Über die konkreten Auswirkungen dieser zusätzlichen CO_2 -Quelle auf die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse ist bisher nichts bekannt.

2.7 Olivenöl - Rechtliche Situation

Parallel zu den für andere Lebensmittel existierenden rechtlichen Vorschriften gibt es für Olivenöl spezielle rechtliche Vorgaben für die Beschaffenheit und Etikettierung. Diese finden sich hauptsächlich in zwei Verordnungen der Europäischen Union. Die Verordnung VO (EWG) Nr. 2568/91 von 1991 „über die Merkmale von Olivenölen und Oliventresterölen sowie die Verfahren zu ihrer Bestimmung“ legt verbindliche Bezeichnungen für die einzelnen Qualitätskategorien von Olivenöl und Analyseverfahren sowie dazugehörige Grenzwerte fest. In Kontrast hierzu definiert die Verordnung VO (EWG) Nr. 1019/02 vom Juni 2002 hauptsächlich Etikettierungs- sowie Vermarktungsvorschriften für Olivenöl.

Nach VO (EWG) Nr. 2568/91 i.V.m. VO Nr. 136/66/EWG (Anhang) gibt es aktuell acht verschiedene Kategorien von Olivenöl; Hauptcharakteristikum war früher der Anteil der freien Säuren, jedoch sind heute noch zahlreiche andere Markersubstanzen relevant (vgl. hierzu VO (EWG) Nr. 2586/91 Anhang 1).

Im Folgenden finden sich die o.g. Qualitätskategorien nach EU-Recht mit einer kurzen Beschreibung der Eigenschaften; die Reihenfolge der Aufzählung erhebt keinen Anspruch auf eine qualitative Wertung.

1. **Native Olivenöle:** Diese Öle dürfen nur durch physikalische Verfahren wie Pressung oder Zentrifugation ohne äußere Temperatureinwirkung, die zur Verschlechterung des Öles führen, gewonnen werden. Neben dem Waschen, Dekantieren, Zentrifugieren und Filtrieren sind keine anderen Behandlungen gestattet. Lösemittelextraktion, chemische und biochemische Hilfsmittel dürfen nicht verwendet werden, ebenso ist keine Vermischung mit Ölen anderer Qualitäten erlaubt.

In dieser Kategorie gibt es wiederum verschiedene Güteklassen:

a) *Natives Olivenöl Extra:* charakterisiert durch einen Anteil freier Fettsäuren $\leq 0,8$ Gew.-% (berechnet als Ölsäure) sowie den anderen Anforderungen der Anlage 1 der Verordnung VO (EWG) Nr. 2586/91

b) *Natives Olivenöl:* Gehalt an freien Fettsäuren $\leq 2,0$ Gew.-% (berechnet als Ölsäure) sowie den anderen Anforderungen der Anlage 1 der Verordnung VO (EWG) Nr. 2586/91

c) *Lampantöl*: Gehalt freier Fettsäuren >2,0 Gew.-% (berechnet als Ölsäure) sowie den anderen Anforderungen der Anlage 1 der Verordnung VO (EWG) Nr. 2586/91; zum unmittelbaren Verzehr nicht geeignet; darf in dieser Form nicht auf Einzelhandelsstufe vermarktet werden.

Anmerkung: Die bisherige Kategorie „gewöhnliches natives Olivenöl“ ist zum 1.11.2004 ersatzlos entfallen.

2. **Raffiniertes Olivenöl**: Ein durch Vollraffination von nativen Ölen gewonnenes geschmack- und geruchloses Öl, mit Anteil freier Fettsäuren unter 0,3 Gew.-% sowie den anderen Anforderungen der Anlage 1 der Verordnung Nr. (EWG) 2586/91; zweckmäßigerweise wird weitestgehend Lampantöl raffiniert. Öl dieser Kategorie darf in reiner Form nicht an den Endverbraucher abgegeben werden.
3. **Olivenöl – bestehend aus raffinierten und nativen Olivenölen**: Mischung von raffiniertem Olivenöl und nativem Öl –ausgenommen Lampantöl. Somit erhält das Öl zumindest teilweise seinen Olivengeschmack zurück. Unglücklicherweise gibt es über das Mischungsverhältnis keine gesetzlichen Bestimmungen; somit wären auch Mischungen von 99% raffiniertem Olivenöl und 1% nativem Öl verkehrsfähig.
4. **Rohes Oliventresteröl**: Unbehandeltes, durch Lösemittlextraktion oder durch zweite Zentrifugation des mit Wasser versetzten Tresters gewonnenes Öl. Das Öl darf nicht auf Einzelhandelsstufe abgegeben werden.
5. **Raffiniertes Oliventresteröl**: Entsteht nach Raffination von rohem Oliventresteröl und hat keinen Eigengeschmack. Auch Öl dieser Kategorie darf nicht auf Einzelhandelsstufe abgegeben werden.
6. **Oliventresteröl**: Verschnitt von raffiniertem Oliventresteröl und nativem Öl –außer Lampantöl. Auch hier besteht, wie oben angesprochen, die Problematik des Mischungsverhältnisses.

Gemäß Art. 35 der VO Nr. 136/66/EWG dürfen auf Einzelhandelsstufe nur die folgenden Kategorien (Verkehrsbezeichnungen) vermarktet werden:

-
- Natives Olivenöl Extra
 - Natives Olivenöl
 - Olivenöl
 - Oliventresteröl

Im Anhang der VO (EWG) Nr. 2568/91 finden sich Richtlinien zur Probenentnahme, sowie Analysevorschriften mit Grenzwerten zur Überprüfung der deklarierten Olivenölkategorie.

Im Jahr 2002 wurde mit der VO (EWG) Nr. 1019/2002 ein weiterer Versuch zum Schutz des Verbrauchers gemacht. So legt die Verordnung unter anderem Etikettierungs- und Verpackungsvorschriften fest. Weiterhin wird, wie den Erwägungen im Vorwort der Verordnung zu entnehmen ist, angestrebt, eine Ursprungsbezeichnung für native Olivenöle verpflichtend einzuführen, sobald eine systematische Herkunftssicherung und Kontrolle etabliert ist.

Nach dieser Verordnung darf Olivenöl an den Endverbraucher nur in versiegelten Verpackungen mit maximal 5 Liter Volumen abgegeben werden. Die alleinige (jedoch freiwillige) Angabe des Gehalts freier Fettsäuren auf dem Etikett ist verboten; es müssen vielmehr die Gehalte an Peroxiden, Wachsen sowie die Extinktionskoeffizienten mit angegeben werden, falls der Gehalt freier Fettsäuren auf dem Etikett ausgelobt werden soll.

Für die Bezeichnung „Kaltpressung“ oder „erste Kaltpressung“ bzw. –extraktion, wird gefordert, dass die Temperatur beim Gewinnen des Öls 27 °C nicht überschreitet.

Ursprungsangaben sind nur bei den Kategorien „natives“ und „extra natives“ Olivenöl zulässig und ab dem 01. Juni 2009 auch obligatorisch. Leider lässt sich diese Bestimmung umgehen (und damit eine Kontrolle der Herkunft), indem man das Olivenöl als Mischung deklariert und als Herkunftsbezeichnung nur „Mischung von Olivenölen aus der Gemeinschaft“ bzw. „Mischung von Olivenölen aus Drittländern“ angibt. Daneben ist es bei Mischungen selbstverständlich gestattet, statt obiger Formulierung die betroffenen Länder aufzuzählen. Auch hier könnten theoretisch Mischungsanteile von nur 1 % angegeben werden und so Ländernamen auf dem Etikett auftauchen, die für die Ölqualität nicht relevant sind.

Für die Angabe einer geschützten Ursprungsbezeichnung (g.U.) oder einer geschützten geografischen Angabe (g.g.A.) gelten die strengeren Regeln der VO (EWG) Nr. 510/2006 entsprechend.

Das Etikett eines Olivenöls muss die der Qualität entsprechende Angabe im genauen Wortlaut beinhalten:

- „Natives Olivenöl Extra – erste Güteklasse – direkt aus Oliven ausschließlich mit mechanischen Verfahren gewonnen“
- „Natives Olivenöl - direkt aus Oliven ausschließlich mit mechanischen Verfahren gewonnen“
- „Olivenöl – bestehend aus raffiniertem Olivenöl und nativem Olivenöl“

alternativ: „Olivenöl – enthält ausschließlich raffiniertes Olivenöl und direkt aus Oliven gewonnenes Öl“

- „Oliventresteröl – enthält ausschließlich Öl aus der Behandlung von Rückständen der Olivenölgewinnung und direkt aus Oliven gewonnenes Öl“

alternativ: „Oliventresteröl – enthält ausschließlich Öl aus der Behandlung von Oliventrester und direkt aus Oliven gewonnenes Öl“

Weitere rechtliche Bestimmungen geringerer Priorität finden sich in den Leitsätzen für Speisefette und Speiseöle im Deutschen Lebensmittelbuch sowie im Codex Alimentarius, der sich jedoch weitgehend am Trade Standard des Internationalen Olivenölrates (IOC) orientiert.

2.8 Herstellung von Qualitätsolivenöl

2.8.1 Die Produktion von Qualitätsölen

Überraschenderweise ist die Ernte das teuerste an einem Qualitätsolivenöl; sie macht etwa 80% des Preises aus. Sie beginnt üblicherweise im November und kann bis Januar dauern; je nach Reifestadium weist das hergestellte Olivenöl ein unterschiedliches Aroma auf. Eine feste Korrelation zwischen Reifestadium und Aroma ist jedoch nicht gegeben, vielmehr hängt das Aroma u.a. von Faktoren wie Lage, Olivensorte, Sorgfalt bei der Verarbeitung und dem Klima ab. Die anfangs noch grünen Oliven werden mit zunehmendem Reifegrad violett, unter normalen Umständen aber nicht völlig schwarz.

Der Grund für die hohen Erntekosten ist die Handarbeit, nur teilweise kommen Erntemaschinen zum Einsatz. Für die Ernte per Hand werden um den Olivenbaum herum am Boden Netze oder Matten befestigt. Mittels Stöcken werden die Oliven von Hand abgeschlagen und landen in diesen Matten.

Unabdingbare Voraussetzung für eine gute Ölqualität ist, dass die Olivenfrüchte unbeschädigt und rasch zur Presse kommen. Langer Bodenkontakt, grobe mechanische Behandlung und lange Lagerung mindern die Qualität des späteren Öls. Ist das Fruchtfleisch der Olive verletzt, kann es zur Bildung von Fehlparomen kommen.

Nach traditioneller Herstellungsmethode werden die von grobem Unrat befreiten Oliven in Steinmühlen zerkleinert und der entstehende Brei mit Preßmatten zu Türmen geschichtet. Danach wird hydraulisch gepresst. Die abfließende Emulsion aus Öl und Fruchtwasser wurde früher erhitzt, um das Wasser auszutreiben. Das schonendere und heute gängige Verfahren zur Abtrennung der Wasserphase ist die Zentrifugation (Giovacchino, 2000).

Dieser traditionelle Herstellungsprozess ist heute nicht mehr das einzige Gewinnungsverfahren; das Erhitzen des Öls steht den gesetzlichen Regelungen für „natives“ Olivenöl entgegen und führt insgesamt zu qualitativ weniger guten Ölen. Durch den diskontinuierlichen Prozess und die damit verbundenen langen Standzeiten kann die Ölqualität ebenfalls nachteilig beeinflusst werden.

Das moderne kontinuierliche Extraktionsverfahren liefert konstante Qualität und arbeitet wirtschaftlicher als traditionelle Verfahren. Damit setzt es sich immer mehr durch. In Spanien soll etwa jedes dritte Öl bereits so hergestellt werden (Aparicio und Luna, 2002). Die geernteten Oliven kommen in einen Trichter, von dort werden sie per Fließband zur Waschanlage und

zur Absaugung geführt; hier werden Blätter und sonstige Kleinteile abgeblasen, und die Oliven werden gewaschen. Anschließend werden die Früchte zerhäckselt und in großen Behältern unter Wasserzusatz zu einem Brei vermahlen. Dieser Brei gelangt nun in einen Dekanter, welcher simultan Pulpe, Öl und Fruchtwasser voneinander trennt. Zur weiteren Abtrennung des Wassers kommt abschließend noch eine zusätzliche Zentrifuge zum Einsatz. Danach wird –falls gewünscht– filtriert, um feinste Fruchtfleischreste zu entfernen; das Öl soll so haltbarer sein, bekommt jedoch dadurch angeblich auch einen etwas anderen Geschmack. Eine Abwandlung hiervon ist das sogenannte Perkolationsverfahren. Hierbei erfolgt statt der Zentrifugation der Emulsion eine Trennung durch kontinuierliches Eintauchen eines Metallquirls; aufgrund der unterschiedlichen Oberflächenspannungen von Öl und Wasser lässt sich so das am Quirl haftende Öl abtrennen (Giovacchino, 2000).

Wird das Olivenöl als „kaltgepresst“ ausgelobt, so darf die Temperatur bei der Gewinnung 27°C nicht überschreiten. Da bei der Pressung bzw. Extraktion selbst auch Wärme entsteht, kommen Klimaanlage zum Einsatz, welche die Maische abkühlen.

Der letzte Schritt ist die Abfüllung: hierbei sind auch bei hochwertigen Ölen vorwiegend 5 L-Metallkanister maßgebend (Höchstgröße nach VO (EWG) 1019/02); in Anbetracht des Jahresdurchschnittsverbrauchs pro Kopf von etwa 20 Liter in Griechenland stellt dies eine wirtschaftliche Packungsgröße dar; kleine Flaschen, v.a. in Halblitergröße sind eher für den Exportmarkt gedacht.

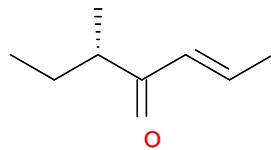
2.8.2 Herstellung von verfälschtem Olivenöl

Schätzungen in Branchenkreisen gehen davon aus, dass lediglich 10% der weltweiten Olivenernte zur Erzeugung von qualitativ hochwertigem „nativem“ Olivenöl geeignet ist. Da aber fast alle der im Handel befindlichen Olivenöle „extra nativ“ sein sollen, tritt hier ein auffälliges Missverhältnis zu Tage. Aufgrund des hohen Preises von Olivenöl und der komplexen Analytik scheinen Fälschungen besonders lohnenswert, da die Gewinnerwartung groß, und das Risiko der Entdeckung moderat ist. In Frage kommen insbesondere die nachfolgend skizzierten Verfahren (der Reihenfolge kommt dabei keine Wertung zu).

- Verfälschung mit Haselnussöl:

Da Haselnussöl eine ähnliche Triacylglycerid-Zusammensetzung wie Olivenöl aufweist, kann diese Art der Verfälschung schon fast als Klassiker bezeichnet werden. Es gibt Berichte, dass Tanklastzüge mit Olivenöl absichtlich angezapft werden, und

die entnommene Menge Olivenöl wieder mit Haselnussöl aufgefüllt wurde. Ein möglicher analytischer Nachweis könnte nach Blanch et al. (2000) das Vorhandensein von (+)-(2E, 5S)-5-Methylhept-2-en-4-on (Filberton) (Aromastoff der Haselnuss) im Olivenöl sein. Hierfür bedarf es aber hoher Mengen an zugesetztem Haselnussöl. Derzeit werden auch molekularbiologische Methoden entwickelt, um Haselnussöl nachzuweisen. Bedenklich kann solch eine Verfälschung insbesondere für Allergiker sein. Der im Vergleich zu Olivenöl auch recht hohe Preis von Haselnussöl macht diese Form der Manipulation heute weniger lukrativ.



(+)-(2E,5S)-5-Methylhept-2-en-4-on (Filberton)

- Verwendung von raffiniertem „Lampantöl“ zum Herstellen von „extra nativem“ Olivenöl:

Da, wie eingangs erwähnt, auf dem Markt fast nur „extra native“ Olivenöle zu finden sind, ergibt sich die Frage, was mit den anderen Ölqualitäten passiert. Vor diesem Hintergrund erscheint es möglich, dass zur Herstellung von billigen „extra nativen“ Olivenölen statt einwandfreier Oliven ausschließlich oder zum großen Teil minderwertige Rohware eingesetzt wird. Hierbei werden zur Ernte lediglich Netze unter die Bäume gelegt und abgewartet, bis die überreifen Oliven von alleine herabfallen; durch die lange Liegezeit und den Bodenkontakt können Fermentationsprozesse einsetzen (evtl. auch Schimmelbildung), die den Anteil freier Fettsäuren stark erhöhen und das Aroma negativ beeinflussen. Ist der Gehalt freier Fettsäuren aber größer 2 Gew.-% (berechnet als Ölsäure), handelt es sich um „Lampantöl“, das für den unmittelbaren menschlichen Verzehr nicht geeignet ist und daher einer Raffination bedarf. Sinn macht die Anwendung moderner „soft-column“-Desodorierungsprozesse, die im Hochvakuum bei 40 °C und darunter ablaufen, mit dem Ziel, die vorhandenen Fehl- aromen abzutrennen. Eine Neutralisation zur Abtrennung des erhöhten Anteils FFA erscheint ebenfalls wahrscheinlich. Dieses raffinierte „Lampantöl“ dürfte nach EU-Recht nur in Mischung mit einem nicht näher definierten Anteil nativen Olivenöls unter der Verkehrsbezeichnung „Olivenöl – besteht aus raffiniertem Olivenöl und nati-

vem Olivenöl“ in den Einzelhandel gelangen. Derartige Öle sind –obwohl eigentlich mengenmäßig am häufigsten- aber kaum erhältlich. Es ist davon auszugehen, dass diese Öle unter einer falschen Verkehrsbezeichnung (nämlich als „extra native“ Öle) in den Handel gelangen. Dafür spricht nicht zuletzt, dass das „Lampantöl“ nicht ver- nichtet, sondern auch weiterverarbeitet wird. Der auffällig günstige, in keiner Relation zu den hohen Erntekosten stehende Preis vieler Olivenöle in Supermärkten könnte sich mit einer falschen Verkehrsbezeichnung erklären lassen.

- Verwendung von Oliventresterölen:

Eine weitere Möglichkeit zur Verfälschung von Qualitätsölen ist der Verschnitt mit raffiniertem Oliventresteröl. Dabei handelt es sich um ein raffiniertes, lösemittelextrahiertes oder durch Zweitextraktion mit Wasser gewonnenes Öl, das nur in Mischung mit nativem Olivenöl in den Einzelhandel gelangen darf. Diese Tresteröle besitzen aber einen höheren Wachsgehalt als „nativ“ gepresste Öle –zu denen auch das „Lampantöl“ gehört- und können theoretisch darüber identifiziert werden. Aber durch Winterisieren (Abtrennen der Wachse nach Abkühlen des Öles) lässt sich der erhöhte Wachsgehalt unauffällig senken. Bedauerlicherweise ist diese Behandlung nach aktuellem Stand der Wissenschaft analytisch nicht zu beweisen.

- Falsche Herkunftsdeklaration:

Da einige Provenienzen einen schlechteren Ruf als andere besitzen, ist es lukrativ, Öle unter falscher Herkunftsdeklaration in den Verkehr zu bringen.

Da hierfür keine lebensmitteltechnologischen Kenntnisse erforderlich sind, kann auch jemand ohne Fachkenntnisse derartige Fälschungen erzeugen. Zahlreiche beteiligte Zwischenhändler und Transportfirmen machen zugleich eine exakte Rückverfolgung schwierig. Mit klassisch-analytischen Verfahren ist diese Form der Manipulation bisher nicht zu beweisen. Selbst wenn es hier zuverlässige Methoden gäbe, ist die Beweisführung bei geringen Streckungen mit Ölen anderer Herkunft wohl schwer. Da die EU den Olivenanbau subventioniert und eine größere Menge an Oliven auch höhere Subventionen bedeutet, ist der Zukauf billiger Oliven aus Drittländern, die dann als EU-Ware ausgegeben werden, ein lohnendes Geschäft für Betrüger.

Zur Aufdeckung derartiger Fälschungen im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung gibt es die offiziellen Analysemethoden in der Verordnung VO (EWG) Nr. 2568/91 Anlage 1. Es steht zur Diskussion, ob die dort niedergelegten Verfahren –die ja den wissen-

schaftlichen Stand Jahre vor Erlass der Verordnung widerspiegeln- heute noch effektiv sind. Angesichts der Tatsache, dass selbst in wissenschaftlichen Fachzeitschriften „Rezepte“ publiziert werden, um das Öl (unter Verwendung billigerer Pflanzenöle) so zu panschen, dass dieses bei Anwendung der nach der VO (EWG) Nr. 2568/91 vorgesehenen Analytik nicht beanstandet wird (Aparicio et al. 2000), kann man die Frage nach der Effizienz der offiziellen Analysemethoden nicht mehr vorbehaltlos bejahen. In praxi zeigt sich dies auch in der Statistik des Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, das zwar rund jedes dritte untersuchte Olivenöl 2004 beanstanden musste, aber dabei fielen nur 3% der Proben aufgrund verdächtiger chemischer Parameter auf!

Aufgrund der in der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 festgelegten Pflicht zur sensorischen Beurteilung werden Olivenöle der oberen zwei Güteklassen von staatlicher -aber auch oft von privater Seite (z.B. Feinkost-Zeitschriften, Stiftung Warentest, etc)- einem Sensorik-Test unterzogen. Hier werden die in der Verordnung festgelegten Punkte geprüft und bewertet; ein Öl mit erheblichen Fehlparamen wird dann – nach Beurteilung durch ein staatlich anerkanntes Sensorik-Panel- als ein irreführend gekennzeichnetes Lebensmittel eingestuft, selbst wenn die Laborparameter denen eines „extra nativen“ Öls entsprechen. In Deutschland existiert seit April 2004 ein staatlich anerkanntes Olivenöl-Testpanel am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit am Dienstsitz Oberschleißheim.

2.9 Zusammensetzung des Olivenöls

2.9.1 Hauptkomponenten

2.9.1.1 Fettsäuren und Triacylglyceride

Wie bei jedem anderen Pflanzenöl auch, sind die diversen Triacylglyceride Hauptbestandteil; ihr Anteil im traditionell nicht raffinierten Olivenöl („nativ“ / „extra nativ“) macht – naturgegebene stärkere Schwankungen existieren- etwa 98% der Masse des Öls aus (Bortolomeazzi et al., 2001). Die Triacylglyceride sind Ester aus Glycerin und den im Olivenöl vorkommenden Fettsäuren. Mengenmäßig überwiegt die Ölsäure (18:1) mit einem Anteil von etwa 55-83 % (Angaben jeweils in Gewichtsprozent bezogen auf Gesamtfettsäuren). Auf Platz zwei findet sich die Palmitinsäure (16:0) mit 7,5-20 %. Linolsäure (18:2) ist zu etwa 3,5-21 % enthalten (vgl. Abb. 2.7). Der Rest verteilt sich auf Stearinsäure (18:0; 0,5-5 %), Palmitoleinsäure (16:1; 0,3-3,5 %), α -Linolensäure (18:3; meist bis 1 %) und Spuren an Myristinsäure (14:0; meist bis 0,05 %), Heptadecansäure (17:0; meist bis 0,3 %), Heptadecensäure (17:1; meist bis 0,3 %), Arachinsäure (20:0; meist bis 0,6 %), Eicosensäure (20:1; meist bis 0,4 %), Behensäure (22:0; meist bis 0,2 %) und Lignocerinsäure (24:0; meist bis 0,2 %).

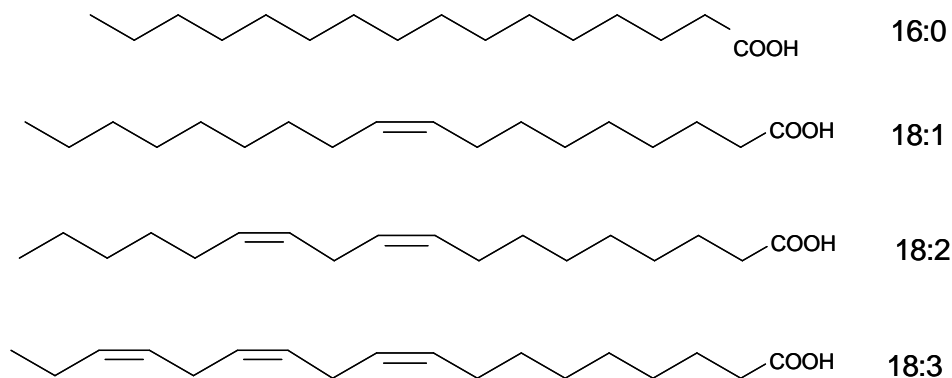


Abb. 2.7: Palmitinsäure (16:0), Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2) und α -Linolensäure (18:3)

Die vorstehenden Gehaltsangaben sind auch Bestandteil der Anlage 1 zu Abschnitt II der Leitsätze für Speisefette und Speiseöle und basieren auf Empfehlungen des internationalen Olivenölrates (IOC, Madrid). Die hierbei angegebenen hohen Schwankungsbreiten werden den vielen verschiedenen Olivensorten und jährlich wechselnden Wetterbedingungen zugeschrieben (Aparicio und Luna, 2002) –sie wurden bei der Erstellung vorliegender Arbeit bestätigt; teilweise wurden bei den von uns gemessenen Olivenölen diese Schwankungsbreiten

sogar noch deutlich überschritten, was aber nicht unbedingt ein Indiz für die Beimischung eines Fremdöls ist, sondern wahrscheinlich die naturgegebenen Schwankungen reflektiert.

Die qualitative und quantitative chromatographische Analyse der Fettsäuren eines Speiseöls –damit auch die Bestimmung der Stabilisotopenverhältnisse– gelingt am einfachsten durch die direkte Methylierung der Fettsäuren im Öl mittels methanolischer Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung (TMS-OH) in einem kleinen GC-Fläschchen. Die erzeugten Fettsäuremethylester (FSME) können dann z.B. mittels Flammenionisationsdetektor (FID) nach gaschromatographischer Trennung detektiert werden (Yamauchi et al., 1979; Butte, 1983; Dron et al., 2004). Nach aktuellen Erkenntnissen ist davon auszugehen, dass diese Methylierungsreaktion quantitativ abläuft –sofern genug Reagenz zugesetzt wird (Dron et al., 2004). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Nutzung zur nachfolgenden Stabilisotopenverhältnisanalyse.

Entscheidend für die physikalisch-chemische Charakteristik eines Öls ist natürlich nicht nur die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Fettsäuren, sondern insbesondere deren Anordnung im Triacylglycerid. Bekannt ist, dass ein aus Glycerin, einem Molekül Ölsäure und aus zwei Molekülen Palmitinsäure bestehendes Triacylglycerid unterschiedliche Eigenschaften aufweist, je nachdem an welcher Position die Ölsäure am Glycerin verestert ist. So hat 1,2-Dipalmito-olein einen Schmelzpunkt von 34,8 °C während 1,3-Dipalmito-olein mit 38,5 °C deutlich darüber liegt (Römpp Online).

Für die jeweiligen Eigenschaften eines Speiseöls sind somit die Häufigkeiten und auch die Verteilungen der einzelnen Fettsäuren im Triacylglycerid von entscheidender Bedeutung. Letztere ergibt sich nicht per Zufall, sondern aus den spezifischen Reaktionen während der Biosynthese in der jeweiligen Pflanze.

Bemerkenswert ist beim Olivenöl das hohe Vorkommen von Ölsäure. Daraus ergibt sich auch die hohe Wahrscheinlichkeit, dass zumindest ein Molekül Ölsäure im Triacylglycerid zu finden ist. Der Anteil an Triolein (OOO) ist höher als in allen anderen Pflanzenölen, wogegen der Gehalt an Trilinolein (LLL) am geringsten ist; die quantitative Bestimmung mittels Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Lichtstreuendetektor (RP-HPLC-ELSD) ist beschrieben (Cunha und Oliveira, 2006). Daneben hat man über die Verwendung der Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (RP-HPLC-FID) und der Hochtemperatur-GC in der Literatur berichtet (Aparicio und Aparicio-Ruiz, 2000).

Die derzeit aktuellste Untersuchung der Triacylglyceridverteilung in Olivenölen lieferten Cunha und Oliveira 2006. Hierin hat Triolein (OOO) einen Anteil von etwa 61 %, gefolgt von circa

20 % 1-Palmito-2,3-diolein (POO). Dazu kommen ungefähr 12 % 1,2-Dioleo-3-linolen (OOL); 1-Steraro-2,3-diolein (SOO) kommt etwa zu 3 %, 1-Palmito-2-linolo-3-olein (PLO) zu 2 % im Olivenöl vor. Bei den übrigen 2 % handelt es sich überwiegend um diverse weitere Kombinationen aus Öl- und Linolsäure.

Ein einfaches Verfahren, um eine Verfälschung des Olivenöls mit sog. Esterölen (zuvor freie abgetrennte Fettsäuren werden hierbei chemisch mit Glycerin verestert) zu erkennen, ist die genannte Triacylglyceridanalyse: Bei Esterölen erfolgt die Verteilung der Fettsäuren auf das Glycerin nach dem Zufallsprinzip, bei der Biosynthese jedoch nicht: hier werden gesättigte Fettsäuren vorwiegend in die sn-1 und sn-3 Position des Glycerins eingebaut; Gehalte höher 2% für Palmitinsäure in den (nach Hydrolyse mit Pankreas-Lipase erhaltenen) 2-Monoacylglyceriden deuten auf die Verwendung von Esterölen hin (Belitz et al. 2001). Nach der VO (EWG) Nr. 2568/91 darf der Anteil gesättigter Fettsäuren in 2-Stellung der Triglyceride einen Wert von 1,5% bei extra nativen Ölen nicht überschreiten.

2.9.1.2 Biosynthese von Fettsäuren und Triacylglyceriden

Die Biosynthese der Fettsäuren mit nachfolgender Bildung der Triacylglyceride (TG) gehört zum Lehrbuchwissen, auch wenn in Detailfragen noch Unklarheiten herrschen. Es ist wohl bekannt, dass bei höheren Pflanzen der Aufbau der Fettsäuren in den Plastiden stattfindet. Es gibt jedoch Hinweise, dass dies bei einigen Arten oder unter besonderen Bedingungen auch im Cytosol erfolgen kann (Sanchez et Harwood, 2002). Außerdem interagieren die Plastiden mit dem sie umgebenden Cytosol und tauschen Zwischenprodukte aus; dieses symbioseartige Verhalten untermauert die Endosymbiotentheorie. Im Folgenden soll der Mechanismus der Fettsäurebiosynthese skizziert und später auf einige interessanten Details und die nicht-statistische Isotopenverteilung eingegangen werden. In Abb. 2.8 findet sich der Reaktionsverlauf schematisch.

Die TG-Biosynthese beginnt mit Acetyl-CoA, an das sukzessiv C_2 -Einheiten „angehängt“ werden. Ist eine Länge von 16 oder 18 Kohlenstoff-Atomen erreicht (Palmitinsäure bzw. Sterarinsäure; bei tierischen Organismen nur bis zu C_{16}), kann eine separate Desaturierung und Elongation stattfinden. Die vorwiegend bei Bakterien und Tieren in geringen Mengen vorkommenden ungeradzahligen Fettsäuren entstehen durch Verlängerung von Propionyl-CoA statt Acetyl-CoA. Bei den verzweigten Fettsäuren der Bakterien spielt der Einbau von Aminosäuren in die Kohlenstoffkette eine Rolle (van der Hoeven et Steffens, 2000).

Ausgehend von Acetyl-CoA wird die C_3 -Verbindung Malonyl-CoA als C_2 -Donor (Decarboxylierung!) benötigt. Letzteres wird in den Plastiden aus Acetyl-CoA und Kohlensäure unter Katalyse der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCCase) gebildet; bei dieser irreversiblen Reaktion wird ATP verbraucht. Der Aufbau dieses Enzyms ist dem bakteriellen Ursprungs sehr ähnlich

(Endosymbiontentheorie!). Bei der Reaktion ist Biotin über seine Carboxy-Gruppe Amid-artig an Lysin-Reste der Carboxylasen gebunden; die Übertragung des Kohlendioxids auf Acetyl-CoA gelingt über dessen Anlagerung am N₁ des Biotins zum sogenannten aktiven Kohlendioxid. Obwohl die ACCase auch im Cytosol präsent ist, kann eine extraplastidäre Fettsäurebiosynthese nicht als gesichert gelten; wahrscheinlicher ist eine Beteiligung dieses Enzyms bei der cytosolischen Flavonoidbiosynthese (Richter, 1996).

Danach folgt wiederum in den Chloroplasten die Verknüpfung von C₂-Einheiten zu den Fettsäuren. Dafür zuständig ist -wie bei den Bakterien- ein Multienzym-Komplex, die Fettsäure-Synthase (FAS; EC 2.3.1.85/86); jeder der zyklischen Teilschritte in der Biosynthese wird von ihr katalysiert. Beim Versuch der Isolierung zerfällt der Komplex. Er beinhaltet auch ein freies, lösliches Polypeptid, an das die Acetyl-Reste und Malonyl-Gruppen gebunden sein müssen, damit die Reaktion ablaufen kann. Das so genannte Acyl-Carrier-Protein (ACP) beinhaltet eine Pantotheinphosphat-Gruppe, an deren Thiol-Gruppe die Acylverbindungen binden. Der Transfer von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA zu Acetyl-ACP und Malonyl-ACP ist energetisch annähernd neutral (Thioester!) und wird durch die Enzyme Acetyl-Transacylase (EC 2.3.1.38) und Malonyl-Transacylase (EC 2.3.1.39) ermöglicht (Richter, 1996).

Im ersten Zyklus der Fettsäurebiosynthese werden Acetyl-ACP und Malonyl-ACP unter Beteiligung der 3-Oxoacyl-ACP-Synthase **1** (EC 2.3.1.41) unter CO₂-Abspaltung zu Acetoacetyl-ACP kondensiert. Die stattfindende exergonische Decarboxylierung treibt die Reaktion voran. Damit kann die Bevorzugung von Malonyl-ACP gegenüber Acetyl-ACP als Reaktionspartner erklärt werden; dieser Umweg zahlt sich an dieser Stelle aus. Der über das CO₂ eingeführte Kohlenstoff wird hier wieder freigesetzt und verändert somit nicht die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse.

In den weiteren Reaktionsschritten geht es um die Überführung der 3-Oxofunktion in eine Methylene-Gruppe. Vom Prinzip her findet quasi eine Umkehrung der β -Oxidation statt, jedoch erfolgt die Reduktion mittels NADPH und wird von anderen Enzymen katalysiert. Dabei überträgt die 3-Oxoacyl-ACP-Reduktase **2** (EC 1.1.1.100) Wasserstoff von NADPH und es entsteht 3-Hydroxybutyryl-ACP, aus welchem sich durch Wasserabspaltung Crotonyl-ACP (trans- Δ^2 -Enoyl-ACP) bildet; das hieran beteiligte Enzym ist die 3-Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase **3** (EC 4.2.1.61).

Die Reduktion zum Butyryl-ACP wird durch die Enoyl-ACP-Reduktase **4** (EC 1.3.1.9/10) möglich und erfolgt indirekt NADPH-abhängig (via FMN!).

Ist der erste Zyklus durchlaufen, so wird in analoger Weise wieder über das Malonyl-ACP ein C₂-Körper an das Butyryl-ACP addiert.

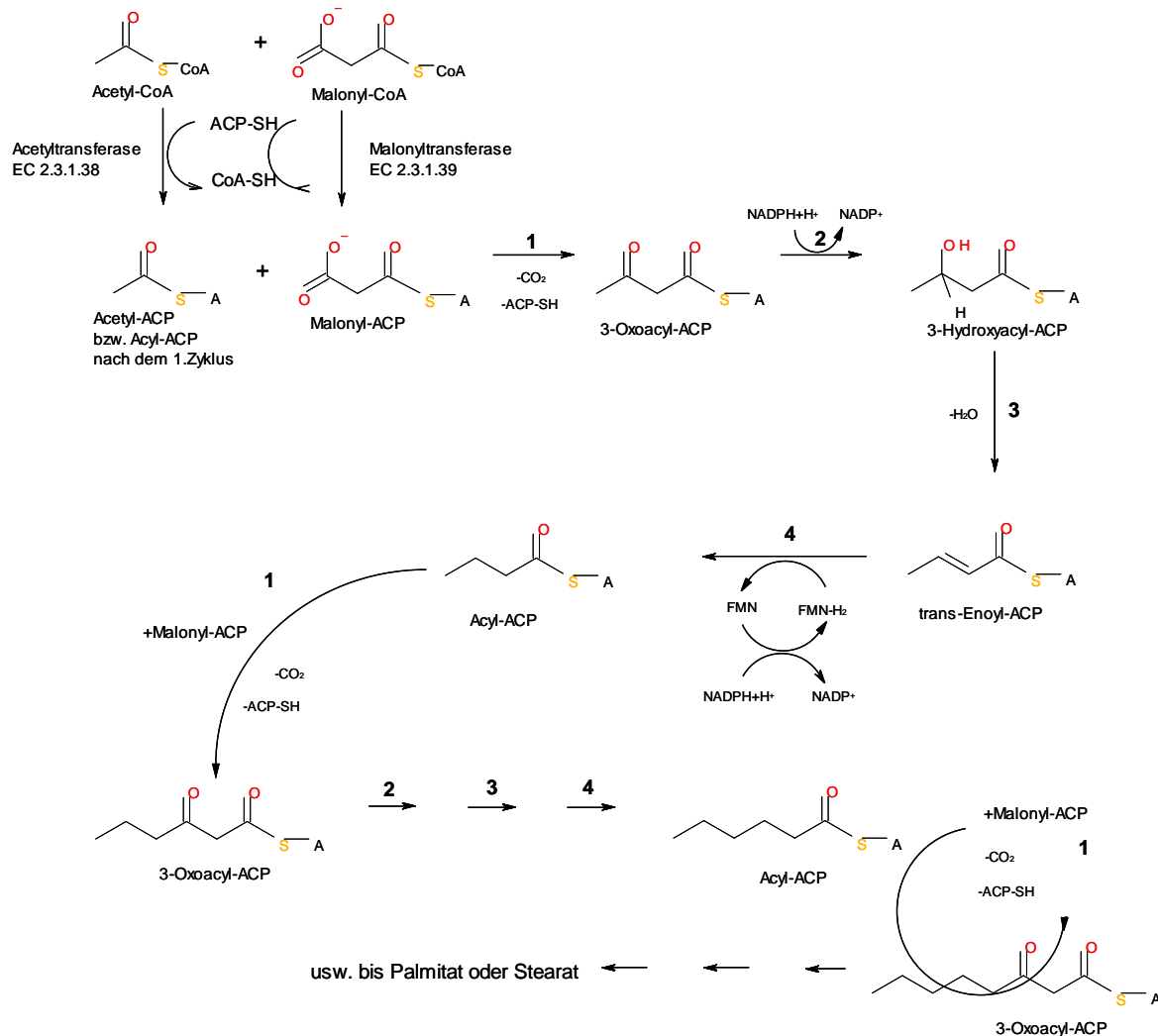


Abb. 2.8: Übersicht zur Biosynthese der Fettsäuren; die fettgedruckten Zahlen beziehen sich auf die Enzyme im Text (Richter, 1996; Giovacchino, 2000)

Ist eine Kettenlänge von 16 oder 18 Kohlenstoffatomen erreicht, so wird das Palmitoyl-ACP bzw. Stearoyl-ACP vom FAS-Komplex nicht mehr als Substrat angenommen und nach Freisetzung durch Thioesterasen wahrscheinlich auf CoA übertragen (zumindest für Bakterien bewiesen, Acyl-CoA-Synthetase!). In Oliven wurde durch Harwood und Sanchez (2000) eine besondere Präferenz der Acyl-ACP-Thioesterase für Kettenlängen mit C₁₈ nachgewiesen; unter anderem dadurch lässt sich das hohe Vorkommen von Fettsäuren mit 18 Kohlenstoffatomen im Olivenöl erklären. Weitere Gründe sind die Aktivitäten und Isoformen der 3-Oxoacyl-ACP-Synthase: in Olivenöl ist offenbar die Isoform besonders effektiv, die Acyl-ACP Reste mit C₁₆ und C₁₈ synthetisiert. Das Triacylglycerid-Muster anderer Pflanzenöle (z.B. Kokos, Shea) zeigt, dass dies auch anders sein kann. In Oliven ist also Ölsäure das Hauptprodukt der plastidären de-novo Fettsäuresynthese.

Nachfolgend kann es zu einer Verlängerung der Kohlenstoff-Kette durch Elongasen kommen (bei Oliven nur von geringer Bedeutung) sowie zu Desaturierungen, die durch verschiedene

Desaturasen katalysiert werden. An den selektiven Desaturase-Aktivitäten liegt es, dass im Olivenöl besonders viel Ölsäure vorhanden ist. Offenbar ist das Enzym, das die Ölsäure aus Stearinsäure generiert, hier besonders aktiv. Die so genannte Stearoyl-ACP-Desaturase ist selbst eine Besonderheit: sie ist im Gegensatz zu anderen Desaturasen löslich, wirkt noch im Chloroplasten (Stroma!) und akzeptiert Stearoyl-ACP als Substrat! Andere Desaturasen sind im ER membrangebunden und spezifisch für komplexe Lipide (Phosphatidylcholin-gebunden) als Substrate. Die Aminosäuresequenz der Stearoyl-ACP-Desaturase gilt als hochkonserviert innerhalb pflanzlicher Spezies und zeigt keine Homologie mit tierischen Desaturasen. Einige identifizierte Sequenzabschnitte sind als typische Eisenbindungsstellen von anderen Enzymen bekannt; man geht deshalb davon aus, dass das Enzym über zwei an Sauerstoff gebundene Eisenatome (binukleäres Eisenzentrum) verfügt (Behrouzian et Buist, 2003). Hier gleicht die Desaturase anderen Enzymen, die von molekularem Sauerstoff abhängige Reaktionen katalysieren, und man vermutet, dass der Elektronentransfer via Valenzwechsel am Eisen ähnlich abläuft. Shanklin et al. konnten 1997 durch Kristallisation das Enzym isolieren und die Struktur studieren; die Sequenzierung der DNA gelang 1997 Angiolillo und Mitarbeitern.

Wie bei den meisten höheren Pflanzen, so werden auch beim Ölbaum die gebildeten Fettsäuren aus den Plastiden ins Cytosol exportiert und bilden dort den Acyl-CoA Pool. Eine weitere Desaturierung der Ölsäure zu Linolsäure sowie die erneute Desaturierung letzterer zu α -Linolensäure findet zum größten Teil durch die membrangebundenen Desaturasen des ER statt. Dort werden jedoch nur komplexe Lipide und keine Acyl-CoA Verbindungen als Substrat akzeptiert (Coochon et al., 1997; Duan et al., 2002). Zwar gibt es auch im Plastiden ähnliche Desaturasen, jedoch stellen diese nur die für die Plastiden benötigten Membranlipide her und fallen mengenmäßig, verglichen mit den Speicherfetten der Olive, kaum ins Gewicht. Den Δ^9 und Δ^{12} -Desaturasen gemein ist ihre syn-Stereospezifität bei der Dehydrogenierung und die Bevorzugung von pro-R Wasserstoff-Atomen; bei den Δ^{15} -Desaturasen ist dies noch nicht bewiesen, gleichwohl wahrscheinlich (Schroepfer und Bloch, 1965; Morris et al., 1968; Mc Innes et al., 1983; Fox et al., 1994; Duan et al., 2002; Behrouzian und Buist, 2003). Die genaue Struktur des katalytischen Zentrums ist noch nicht vollständig geklärt, der Mechanismus der Desaturierung ist daher noch als spekulativ zu betrachten (Behrouzian und Buist, 2003). Man nimmt an, dass ein langsamer initialer Aktivierungsschritt stattfindet, der die C-H-Bindung spaltet; das kurzlebige Kohlenstoffradikal überträgt schnell über eine syn-Disproportionierung einen weiteren Wasserstoff an das Enzym, und das Olefin entsteht. Denkbar wäre hierbei auch eine Nebenreaktion, in der die im ersten Schritt entstandene Eisen-gebundene Hydroxyl-Gruppe nun wieder auf die Fettsäure übertragen wird. Dabei entstünde eine Hydroxy-Fettsäure. Möglicherweise wird diese Nebenreaktion durch die durch das Enzym vorgegebene räumliche Position der Fettsäure (syn!) zurückgedrängt und es findet deswegen eine

Desaturierung statt (Behrouzian und Buist, 2003). Gesichert an dieser Theorie ist durch Isotopenuntersuchungen folgendes: die Reaktion findet in zwei Schritten statt, von denen der erste langsam und geschwindigkeitsbestimmend ist; dies erklärt den beobachteten, starken kinetischen Deuterium-Isotopeneffekt, den man bei allen Desaturasen gefunden hat. Hier sind auch Desaturasen inkludiert, die bei der Pheromon-Biosynthese, der Detoxifizierung (hepatische Cytochrom P450 Enzyme) und der Phytosterol-Biosynthese beteiligt sind (Rettie et al., 1988; Pinilla et al., 1999; Abad et al., 2000; Rahier, 2001; Behrouzian und Buist, 2003)! Alle bisher bekannten Desaturasen beginnen mit dem initialen oxidativen Angriff stets an dem Kohlenstoff-Atom, das dem Acyl-Ende der Fettsäure am nächsten steht; das aktive Zentrum dürfte demnach in allen Desaturasen ziemlich ähnlich, wenn nicht gar gleich sein.

Bei Studien von deuterierten Thia-Derivaten der Fettsäuren fiel der ausgeprägte kinetische Isotopeneffekt besonders auf. Bei Untersuchungen der Stearoyl-CoA Δ^9 -Desaturase betrug der Verhältnis kH/kD etwa 7 am C_9 und war am C_{10} fast zu vernachlässigen (Behrouzian et Buist, 2003); ähnliches ergaben Untersuchungen bei Algen. Bei den Ölsäure-Phosphatidylcholin- Δ^{12} -Desaturasen ist die Datenlage fast identisch. Der kinetische Isotopeneffekt tritt in vergleichbarer Größenordnung auch bei den Δ^{15} -Desaturasen auf. Im Gegensatz zu beiden vorgenannten Enzymen tritt hier jedoch die Besonderheit auf, dass dieses Enzymsystem beliebig lange Fettsäuren jeweils an der ω_3 -Position, also 3 Kohlenstoff-Atome vom Methylende her, desaturiert, während in den Fällen der anderen Desaturasen stets die Acylgruppe den Bezugspunkt darstellt (Reed et al., 2000). Um Missverständnissen vorzubeugen sei nochmals betont, dass der erste Schritt der Desaturierung dennoch immer an dem der Acylgruppe benachbartem Kohlenstoff-Atom auftritt.

Die Bevorzugung des leichteren Wasserstoff-Isotops bei der Desaturierung hat zur Folge, dass die ungesättigten Fettsäuren verglichen mit ihren gesättigten Vorgängern an Deuterium angereichert sind. Da dieser bemerkenswerte Isotopie-Effekt jedoch nur an einem oder beiden Wasserstoff-Atomen auftritt und die Ölsäure jedoch 34 davon besitzt, ist klar, dass der globale Effekt –und nur dieser lässt sich durch IRMS ohne weiteren Aufwand messen– gering ist oder sogar möglicherweise im Rahmen der Messgenauigkeit (oder vielmehr Ungenauigkeit) untergeht.

Dass dieser Effekt nichtsdestotrotz existiert, konnte vielfach mittels SNIF-NMR[®] Untersuchungen belegt werden (Quemerais et al., 1995; Royer et al., 1999; Billault et al., 2001; Du-an et al., 2002); hierbei wird stellungsspezifisch der Deuteriumgehalt in einer Verbindung bestimmt. Da es bei den Fettsäuren jedoch prinzipbedingt zu vielen Signalen und Überlagerungen kommt, wurden früher vorwiegend Cluster untersucht. In neueren Studien kamen Abbaureaktionen zur Anwendung, die letztendlich die Struktur vereinfachen konnten und so eine genauere Messung ermöglichen. Es zeigte sich die bereits bekannte nicht-statistische

Deuteriumverteilung nicht nur an den desaturierten Positionen; an den zahlenmäßig ungeraden Kohlenstoffatomen der Fettsäure (also ursprünglich von der Carboxyl-Gruppe des Acetyl-Restes) stammt der Wasserstoff vollständig von den NADPH-Reduktionsäquivalenten. An den geraden Positionen stammen jeweils ein Wasserstoff-Atom von der Methylgruppe des Acetyl-Restes und das andere aus dem NADPH als Konsequenz des Enoyl-ACP Reduktionsschrittes (Duan et al., 2002). Die Fettsäure-Biosynthese gibt demzufolge eine nicht-statistische Isotopenverteilung vor. Zwei andere Beobachtungen sind darüber hinaus noch erwähnenswert:

Mit zunehmender Länge der Kette bei der Biosynthese sinkt in der Ölsäure (der Sonnenblumen) der Gehalt an Deuterium der jeweils neu hinzugekommenen C₂-Einheiten (Billault et al., 2001). Ferner ist gesichert, dass bei der Ölsäure an der Position C₉ eine starke Anreicherung von Deuterium auftritt; dies stimmt mit dem oben genannten, experimentell beobachteten kinetischen Isotopeneffekt bei den Thia-Derivaten überein (Behrouzian et Buist, 2003). Analog dazu sollte auch am C₁₂ eine Anreicherung auftreten, diese findet sich bei einigen Studien jedoch nur am C₁₃. Die Position am C₁₀ ist bei Ölsäure (von Sonnenblumen) nicht –in Übereinstimmung mit den beobachteten Isotopieeffekten– angereichert, bei Erdnussöl wurde dort hingegen eine nicht einfach zu erklärende Anreicherung gefunden. Sollten die Messungen fehlerfrei verlaufen sein, so ergibt sich ein komplexeres Bild von den jeweiligen Vorgängen bei der Desaturierung, die also von der jeweiligen Fettsäure und zusätzlich von der Pflanzenart abhängig sind. Aufgrund der lückenhaften Datenlage ist eine einfache reaktionskinetische Deutung des Isotopieeffekts bei der Desaturierung, wie oben erwähnt, nicht mehr angebracht, und es bedarf weiterer Untersuchungen, um ein vollständigeres Bild zu erhalten. Auch bei einer 1999 von Royer et al. durchgeführten Studie an Olivenölen konnte nicht gesichert werden, ob bei der Ölsäure nun am C₉ und/oder C₁₀ diskriminiert wird. Sicher ist aber, dass –an welchem Kohlenstoffatom auch immer– an den Ethylen-Gruppen eine Anreicherung von Deuterium stattfindet. Die genaue Position ist bei den global bestimmten Werten im Rahmen dieser Arbeit nur von untergeordneter Bedeutung. Aus älteren Studien ist bekannt, dass auch die Kohlenstoffisotope nicht-statistisch verteilt sind; eine Anreicherung von ¹³C an den olefinischen Positionen wurde zumindest bei Hefen nachgewiesen (Monson und Hayes, 1982a). In einer anderen Studie (1982b) konnten dieselben Autoren auch eine Anreicherung des Carboxy-Kohlenstoff-Atoms im Acetyl-CoA nachweisen, der vermutlich aus der Decarboxylierung von Pyruvat resultiert.

Neben den Isotopenverhältnissen der Precursor-Verbindungen, eventuell stattfindenden Austauschreaktionen und den auftretenden Fraktionierungen bei der Biosynthese spielt NADPH eine entscheidende Rolle. Wie oben dargestellt, gelangen brutto 4, netto 2 (Wassereliminierung!) Wasserstoff-Atome aus NADPH pro durchlaufenen Zyklus in die aufzubauende Fettsäure. Der Wasserstoff des NADP stammt wiederum entweder aus der Elektro-

nenstransportkette der Chloroplasten oder aus der Oxidation der Zucker über den Pentosephosphat-Weg im Cytosol; im ersteren Fall stammt also der Wasserstoff aus dem Wasser selbst, im letzteren Fall ist die genaue Herkunft noch nicht geklärt. Es ist also von mindestens 2 isotopendifferenten NADPH-Pools in der Pflanzenzelle auszugehen. Nun muss man die Frage stellen, welcher Pool für die Fettsäurebiosynthese zuständig ist. Diese Frage kann nicht abschließend beantwortet werden, vielmehr gibt es Hinweise, dass die aktuellen Wachstumsbedingungen der Pflanze eine Steuerfunktion implizieren (Sessions, 2006). Es erscheint logisch, dass im Sommer bei Helligkeit wohl eher die photosynthetisch gewonnenen Wasserstoff-Atome dominieren, während bei Dunkelheit eher die Speicherkohlenhydrate angegangen werden, um den Stoffwechsel aufrecht zu erhalten. Bekannt ist ferner, dass der an Kohlenhydrate gebundene Wasserstoff um etwa 100-170 ‰ an Deuterium angereichert ist, verglichen mit dem Zellwasser (Estep und Hoering, 1981; Yakir und DeNiro, 1990). Unter heterotrophen Bedingungen können aber bis zu 50 % des Wasserstoffs der Zucker mit dem Zellwasser ausgetauscht werden, und es kommt zu einer starken Anreicherung (Yakir und DeNiro, 1990). Die unterschiedlichen NADPH-Pools können möglicherweise auch die Erklärung für die leicht unterschiedlichen Deuteriumgehalte diverser Lipide ähnlicher Biogenese sein (Alkane, Fettsäuren, Fettalkohole); natürlich sind hierbei noch andere Faktoren involviert, da beispielsweise Wachse lediglich in den Epidermiszellen und dort vermutlich nicht in den Plastiden biosynthetisiert werden (Eglinton und Hamilton, 1967; Kolattukudy, 1968; Sessions, 2006).

Erst 2006 konnte Sessions an Untersuchungen von Schlickgras zeigen, dass jahreszeitlich bedingte Schwankungen der Isotopenverhältnisse der Lipide auftreten; konkret wurde in den warmen Monaten ein geringerer Deuteriumgehalt ausgemacht. Es ist davon auszugehen, dass dies durch den zunehmenden Einfluss der reichlich vorhandenen Photosyntheseprodukte in den Sommermonaten zu erklären ist und unterstützt damit die These verschiedener NADP-Pools in Pflanzen. Da eine Wasserpflanze untersucht wurde, gilt, dass Transpirationsverluste, die bei Landpflanzen v.a. in den Sommermonaten zu einer Deuteriumanreicherung führen würden, zu vernachlässigen sind, und der Einfluss schwankender Isotopenverhältnisse im Niederschlagswasser nicht zum Tragen kommt. Für die Wasserstoff-Isotopenzusammensetzung der Fettsäuren sind somit das Niederschlagswasser, Transpirationsverluste, biochemische Prozesse und die Photosyntheserate verantwortlich. Darüber hinaus konnte Sessions zeigen, dass im selben Blatt der untersuchten Pflanze je nach Entfernung zum Blattansatz unterschiedliche Isotopenverhältnisse der Fettsäuren vorliegen. Es ist wohl bekannt, dass die Primärprodukte der Photosynthese relativ stark angereichert sind und bis zur Umwandlung in Stärke eine Anreicherung zu beobachten ist (Yakir und DeNiro, 1990); dies passt zu den von Sessions ermittelten Daten, nach denen es im Sommer zu einer Deuteriumanreicherung kommt. Die aktuellen Ergebnisse werfen in vielen Dingen neue Fragen auf

und lassen erkennen, dass das Bild der Fettsäurebiosynthese nicht so vollständig ist, wie es –ohne Betrachtung von Isotopenverteilungen- zu sein scheint. Die Beobachtungen von Sessions bedürfen weiterer Bestätigung bei höheren Pflanzen um auszuschließen, dass nur Wasserpflanzen dieses Verhalten zeigen.

Für die vollständige Synthese der Speicherfette fehlt sodann nur noch die Veresterung mit Glycerol. Der Mechanismus ist im englischsprachigen Raum auch unter dem Begriff Kennedy-Weg bekannt, in Gedenken an Eugene Patrick Kennedy, der 1961 den Mechanismus der Bildung komplexer Lipide publizierte. Zu seinen zahlreichen Verdiensten gehören inter alia die Untersuchung der Mitochondrien und die Identifizierung dieser als Orte der Fettsäureoxidation und des Citrat-Zyklus.

Im Laufe von vier Reaktionsschritten entstehen aus den Fettsäuren die Triacylglyceride; in Abb. 2.9 findet sich eine schematische Darstellung.

Im ersten Schritt wird ein Fettsäure-CoA Thioester auf Glycerol-3-Phosphat übertragen; diese Reaktion wird von der Glycerol-3-Phosphat:Acyl-CoA-Transferase **1** (EC 2.3.1.15) katalysiert, und es entsteht 1-Acyl-Glycerol-3-Phosphat, welches durch die 1-Monoacylglycerol-3-Phosphat:Acyl-CoA-Transferase **2** (EC 2.3.1.51) mit einem weiteren Fettsäure-CoA-Thioester zu Phosphatidat bzw. Phosphatidsäure umgesetzt wird.

Nach Abspaltung des Phosphat-Restes durch die Phosphatidat-Phosphohydrolase **3** (EC 3.1.3.4) entsteht das freie Diacylglycerid (DG). Hier treten 2 Verzweigungen in der Biosynthese komplexer Lipide auf: aus den DG können Glycosylglyceride und zwitterionische Phospholipide hergestellt werden und aus der Phosphatidsäure ist die Biosynthese von anionischen Phospholipiden möglich (Harwood und Sanchez, 2000).

Das freie 1,2-DG kann nun wiederum mit einer als Acyl-CoA Ester angebotenen Fettsäure unter Katalyse der 1,2-Diacylglycerol:Acyl-CoA-Transferase **4** (EC 2.3.1.20) zum Triacylglycerid umgesetzt werden.

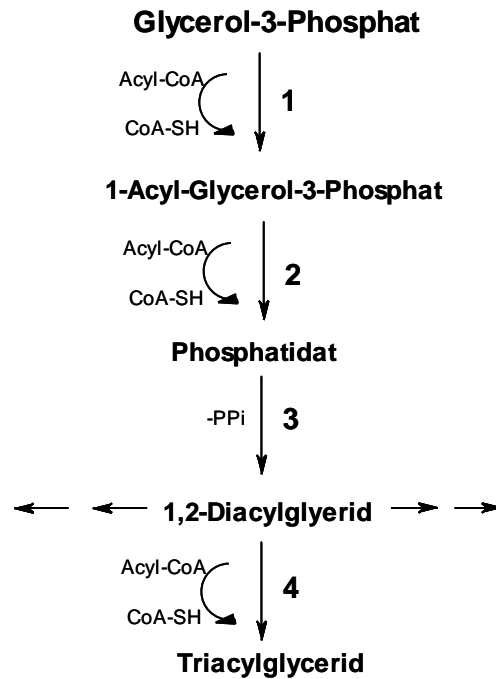


Abb. 2.9: Übersicht Biosynthese der Triacylglyceride (Kennedy-Pathway) die fettgedruckten Zahlen beziehen sich auf die Enzyme im Text. (Richter, 1996; Giovacchino, 2000; Sanchez et Harwood, 2002)

Die Biosynthese mit den vielen unterschiedlichen Enzymen sorgt dafür, dass eine nicht statistische Verteilung der Fettsäuren auf die freien Positionen im Glycerin erfolgt. Empirisch gesichert ist folgendes: die primären Hydroxy-Gruppen des Glycerols in 1- und 3-Position sind bevorzugt mit gesättigten Fettsäuren verestert, Ölsäure und Linolensäure sind gleichmäßig über alle Positionen verteilt und Linolsäure nimmt die noch freien Positionen ein (Roempp online; Belitz, 2001). Da in Olivenöl Linolensäure kaum vorkommt, vereinfacht sich das Schema, und es sollte bevorzugt Ölsäure an der sn-2 Position im Triacylglycerid zu finden sein; Sacchi et al. (1997) geben einen Öl- und Linolsäuregehalt von ca. 99% an der sn-2 Position an. Daran lassen sich u.U. sog. Esteröle erkennen, bei denen die Triglyceride chemisch umgeestert worden sind. Das hohe Vorkommen von Ölsäure im Olivenöl gleicht jedoch die Bevorzugung der gesättigten Fettsäuren an den sn-1 und sn-3 Positionen wohl zumindest zum Teil etwas aus. Beachtenswert sind die Ergebnisse von Brockerhoff und Yurkowski von 1966; die Autoren ermittelten eine deutliche Bevorzugung der Linolensäure für die sn-1 Position verglichen zur der an sn-3 (insgesamt sind dort aber natürlich die gesättigten Fettsäuren dominierender). Dies geht vermutlich auf die ungleichen Selektivitäten der jeweils zuständigen Enzyme zurück. Da das letzte beteiligte Enzym, die 1,2-Diacylglycerol:Acyl-CoA-Transferase, eine relativ geringe Selektivität besitzt, ist es wahrscheinlich, dass der aktuelle Acyl-CoA-Pool sich an der sn-3-Position des TG widerspiegelt (Harwood und Sanchez, 2000).

Durch Untersuchungen der TG-Biosynthese bei verschiedenen Temperaturen ist bekannt, dass sich die Syntheserate ab 40°C drastisch erniedrigt; Harwood und Sanchez zeigten, dass dafür vermutlich die 1,2-Diacylglycerol:Acyl-CoA-Transferase verantwortlich ist und sie damit wohl insgesamt als limitierender Faktor für die Biosynthese auftritt (zusammengefasst in: Harwood und Sanchez, 2000).

Die fertigen TG werden vorwiegend im fleischigen Perikarp der Olive, aber auch im Samen eingelagert. Die Öltröpfchen des Cytoplasma sind in Oliven nicht von einer unilamellaren Membran aus Phospholipiden und Proteinen, sogenannten Oleosinen, umhüllt (Murphy, 1993; Rangel et al., 1997). Die Fettsäurezusammensetzung der Samen ist wahrscheinlich ähnlich, Isotopendaten liegen nicht vor; im Samen wird im Gegensatz zum Perikarp das Öl aber in Oleosinen gespeichert. Die genaue Bildung der Öltröpfchen ist nicht vollständig geklärt; Rangel et al. äußerten 1997 die Hypothese, dass die im Cytoplasma nur von einer dünnen Membran umgebenen Öltröpfchen eventuell nicht im ER gebildet werden, sondern im nicht näher identifizierten „cytosolic matrix material“ (Rangel et al., 1997), das die relativ großen Öltröpfchen umgibt. Mit zunehmender Reife der Oliven verschmelzen die vielen Öltröpfchen im Cytosol zu einem großen unter Auflösung der umgebenden Membran (Murphy, 1993; Rangel et al., 1997); dies kann bei Oleosinen nicht stattfinden.

Eine Verbindungsklasse, die bisher wenig Beachtung fand, sind die Fettsäurealkylester (FAAE); sie entstehen in Oliven durch Veresterung der Fettsäuren mit –im Gegensatz zu den Wachsen- kurzen freien Alkoholen. Es erscheint klar, dass besonders bei Oliven, die nach der Ernte lange gelagert werden, besonders viele freie Fettsäuren und, bedingt durch mikrobiologische Prozesse, mit einem erhöhten Auftreten von niedermolekularen Alkoholen zu rechnen ist. Perez-Camino et al. untersuchten 2008 das Vorkommen von Fettsäuremethyl- und Fettsäureethylestern in Olivenölen. Da die FAAE einen modernen milden Raffinationsprozess, der ansonsten nach den klassischen, legislativ vorgegebenen Analysemethoden nicht erkennbar ist, überstehen, könnten sie nützlich bei der Identifikation von „Lampantölen“ sein, die durch eine nicht erlaubte, milde Raffination zu „nativen“ Ölen aufgewertet werden sollen. Vom Ansatz her interessant, hinterließ die Studie dennoch einige offene Fragen: könnte z.B. eine Neutralisation vor der Extraktion die FAAE-Gehalte beeinflussen (z.B. durch Esterhydrolyse)? Leider wurden nur spanische Olivenöle untersucht, es ist also nicht zwangsläufig gesagt, dass alle Öle dieses Verhalten zeigen. Abgesehen von den absoluten FAAE-Gehalten zeigte sich bei den „Lampantölen“ noch eine Verschiebung des Verhältnisses von Methyl- und Ethylfettsäureestern. Da meist Supermarktöle zum Einsatz kamen, die vielleicht nicht authentisch waren, sind weitere Studien nötig, um zu zeigen, ob die FAAE-Analyse ein geeigneter Weg sein wird, nicht authentische native Olivenöle zu entlarven.

2.9.2 Nebenbestandteile / Unverseifbares

Es ist bekannt, dass mit zunehmender Höhe und/oder sinkender Temperaturen der Anteil an ungesättigten Fettsäuren relativ zunimmt (Aparicio und Luna, 2002). Aber auch der Gehalt an Nebenkomponenten ist höhenabhängig; je niedriger die Anbauhöhe, desto höher soll die Konzentration an Polyphenolen, Sterolen und Tocopherolen sein. Im Gegenzug kann man geringere Gehalte an ungesättigten Fettsäuren und Chlorophyllen nachweisen (Aparicio et al., 1991; Ferreira und Aparicio, 1992; Mousa et al., 1996). Einen niedrigeren Gehalt an Polyphenolen beobachteten Gutierrez et al. (1989) bei der Bewässerung von Olivenbäumen verglichen mit unbewässerten. Zudem gilt, dass je reifer die Oliven, desto geringer der Polyphenol- und Chlorophyllgehalt (Morales et al., 1996; Aparicio und Luna, 2002). Diese vielen Variablen erschweren eine systematische Untersuchung.

2.9.2.1 Aroma / flüchtige organische Verbindungen

2.9.2.1.1 Qualitätsöle

Ein wichtiges Qualitätskriterium insbesondere für „extra native“ Olivenöle ist das Aroma. Raffinierte Speiseöle besitzen dagegen fast kein Aroma mehr, und der Konsument erwartet von einem preisgünstigen Speiseöl einen neutralen Geschmack. „Natives Olivenöl“ ist die Ausnahme, denn es wird –neben möglicher positiver Wirkungen auf die Gesundheit- allen voran wegen seines guten Geschmacks verwendet.

Ähnlich wie bei Wein gibt es auch hier eine große Vielfalt an möglichen Geschmacksrichtungen, die von der Sorte der Oliven und deren Verarbeitung abhängen. Üblicherweise assoziieren die Verbraucher Olivenöl mit einem grün-grasig-fruchtigem Aroma. Wenige schätzen hingegen auch die anderen häufig auftretenden Richtungen, d.h. bitter und scharf-pikant.

Wie bei Wein entscheidet neben der Sorte, die Lage, das Wetter, die Sorgfalt bei der Verarbeitung und der Jahrgang über das Aroma. Schwankungen sind also naturgegeben und führen in den Folgejahren zu einem anderen Aroma, selbst wenn alle anderen Parameter gleich bleiben. Es liegt in der Natur der Sache, dass dies als Chance oder Risiko betrachtet werden kann. Während Produzenten von Billigöl, das ja den größten Marktanteil in Deutschland hat, im Hinblick auf das Aroma überaus dürftige Qualitäten anbieten, die teilweise die typischen Fehleraromen aufweisen, punkten qualitätsbewusste Hersteller mit einem für ein Öl unvergleichlich reichem Bouquet an unterschiedlichem Duft und Geschmack. Dafür sind die sorgfältige Handernte der schadfreien Oliven zum optimalen Reifezeitpunkt sowie die sofortige schonende Ölgewinnung aus der Frucht und die richtige Lagerung des Öls entscheidend. Aus überreifen Oliven, die selbst vom Baum fallen, deren Exokarp womöglich noch durch

Schädlingsbefall mit der Olivenfliege geschädigt ist, lässt sich sicherlich kein gut schmeckendes Öl mehr erhalten. Kommen noch lange Lagerzeiten der Oliven vor der Pressung dazu, so ergibt dies zwangsläufig ein im besten Falle aromaarmes, aber meist ein von deutlichen Fehleraromen charakterisiertes Öl. Die VO (EWG) Nr. 2568/91 schreibt zwar sensorische Prüfungen vor und gestattet gegebenenfalls, die Qualitätsstufe (z.B. extra nativ) aufgrund dessen abzusenken, aber dies geschieht nicht sonderlich häufig, da hierfür die klassischen, untenstehenden Fehleraromen deutlich auftreten müssten. Ein Mangel an Aroma ist hingegen rechtlich betrachtet nicht so schwerwiegend, schmälert aber den Genusswert des Öles erheblich.

Welche Verbindungen sind nun verantwortlich für gutes oder eben schlechtes Aroma? Diese Frage lässt sich heutzutage auf Grund der guten Datenlage relativ ausführlich beantworten. Als grobe Faustregel mag folgendes gelten: Wird das Aromaprofil eines Olivenöles überwiegend von den aus der Lipoxygenase-Kaskade (LOX) entstehenden C₆-Verbindungen geprägt, lässt sich das Aroma als arttypisch einstufen. Diese C₆-Verbindungen sollen 60-80 % der gesamten flüchtigen Verbindungen ausmachen (Aparicio und Luna, 2002). Schlechte Öle enthalten kaum oder im Extremfall keine C₆-Verbindungen (was bei einem Billigöl im Rahmen dieser Arbeit auch beobachtet werden konnte). Damit wurde bereits die wichtigste Substanzklasse der aromaaktiven Verbindungen und deren Genese in Olivenöl angesprochen. Das Aroma eines Öls, das aus bis zu 180 Verbindungen bestehen kann (vgl. Tab. 2.2), wird mengenmäßig von den Verbindungen Hexanal, (E)-2-Hexenal, Hexanol und 3-Methylbutanol geprägt (Kiritsakis, 1998). Diese sind –neben anderen C₆- und C₅ Verbindungen- für das fruchtig-grüne Empfinden ausschlaggebend, während Bitterkeit und Schärfe überwiegend auf Secoiridoide und Polyphenole zurückgehen sollen (Angerosa, 2002). Üblicherweise korreliert der Gehalt an Aromastoffen mit der Polyphenolkonzentration (Kiritsakis, 1998).

Dominierende Aromabestandteile sind Aldehyde. Deren Gehalt beträgt in grünen Oliven 50%, in dunkelvioletten sogar 75% (Kiritsakis, 1998). Bei unreifen Oliven ist das grün-grasige Aroma noch ausgeprägter, jedoch auch die Bitterkeit und Schärfe (Angerosa, 2002). Ein Mischen mit weniger aromatischen Ölen ist deshalb gängig. Reife Oliven liefern hingegen weniger Grünnoten, sind aber sanfter in Bezug auf Bitterkeit und Schärfe. Ein beliebtes Verfahren, die „grüne“ Note im Aroma zu steigern, ist die Beimischung von 2-3 Gew.-% Ölbaumblätter vor der Extraktion des Öls. Der Qualität ist dies insgesamt nicht zwangsläufig abträglich (Angerosa, 2002; Giovacchino et al., 1996).

Den Enzymselektivitäten der LOX und Hydroperoxid-Lyase (HPL) in Oliven ist es zu verdanken, dass vorwiegend C₆-Verbindungen entstehen. Zwar wird durch die LOX bevorzugt das 9-Hydroperoxid gebildet, aber durch die HPL ausschließlich das 13-Hydroperoxid gespalten. (Z)-3-Nonenal und (Z,E)-3,6-Nonadienal sind praktisch nicht vorhanden (Olias et al., 1993).

Tabelle 2.2 : Flüchtige Verbindungen in Olivenöl, nach: Angerosa, 2002

<i>Aldehyde</i>	<i>Ester</i>	<i>Ketone</i>	<i>Alkohole</i>
Acetaldehyd	Butylacetat	Aceton	Methanol
Propanal	Ethylacetat	2-Butanon	Ethanol
Butanal	Ethylphenylacetat	2-Hexanon	Propanol
Pentanal	Ethylpropionat	2-Heptanon	Butanol
Hexanal	Ethylbutyrat	2-Octanon	Pentanol
Heptanal	Ethylheptanoat	2-Nonanon	Hexanol
Octanal	Ethyl-octanoat	3-Pentanon	Heptanol
Nonanal	Ethyl-nonanoat	3-Octanon	Octanol
Decanal	Ethyl-decanoat	3-Methyl-2-butanon	Nonanol
Acrolein	Ethylpalmitat	6-Methyl-5-hepten-2-on	Decanol
2-Butenal	Heptylacetat	4-Methyl-2-pentanon	3-Pentanol
(E,Z)-2-Pentenal	Hexylacetat	Penten-3-on	3-Octanol
(E,Z)-2-Hexenal	Methylacetat	Octen-3-on	2-Pentanol
(Z)-3-Hexenal	Methylbutanoat	2-Methyl-2-hepten-6-on	(E)-2-Hexenol
(E,Z)-2-Heptenal	Methylpentanoat	Acetophenon	(Z)-3-Hexenol
(E)-2-Octenal	Methylhexanoat		4-Hexenol
(E,Z)-2-Nonenal	Methylheptanoat		1-Penten-3-ol
(Z)-3-Nonenal	Methyloctanoat		1-Octen-3-ol
(E)-2-Decenal	Methylnonanoat		Methylpropanol
(E)-2-Undecenal	Methyldecanoat		2-Methyl-1-butanol
2-Methylbutanal	Methyloleat		3-Methyl-1-butanol
3-Methylbutanal	Methyl-lineolat		3-Methyl-1-pentanol
2-Methyl-2-butenal	Octylacetat		2-Phenylethanol
2,4-Hexadienal	Propylpropanoat		
2,4-Heptadienal	Butyl-2-methylbutanoat		
2,4-Nonadienal	Ethyl-2-methylpropanoat		
2,4-Decadienal	Ethyl-2-methylbutanoat		
Benzaldehyd	Ethyl-3-methylbutanoat		
Phenylacetaldehyd	Methyl-2-methylbutanoat		
	Methyl-3-methylbutanoat		
	3-Methyl-2-butenylacetat		
	2-Methylbutylacetat		
	3-Methylbutylacetat		
	2-Methylbutyl-2-methylpropanoat		
	2-Methylbutylpropanoat		
	2-Methylpropylacetat		

<i>sonstige</i>	<i>Ester (Fortsetzung)</i>	<i>Säuren</i>	<i>Thioverbindungen</i>
2-Propylfuran	Ethylbenzoat	Essigsäure	2,5-Dithiophen
2-Propyldihydrofuran	Methylsalicylat	2-Methylpropionsäure	2-Isopropenyl- thiophen
2-Pentyl-3-methyl- furanethylfuran	(Z)-3-Hexenylacetat	3-Methylbuttersäure	2-Ethyl-5- hexylthiophen
3-(4-Methyl-3- pentenyl)-furan	Ethylcyclohexanoat	Propionsäure	2-Ethyl-5- hexyldihydrothiophen
Anisol	Propyl-2-methylpropanoat	Buttersäure	2-Octyl-5- methylthiophen
Veratrol	2-Methylpropyl-2- methylpropanoat	Hexansäure	
Linalool		Heptansäure	
α -Terpineol			
1,8-Cineol			
Lavandulol			

Bei Ölen minderer Qualität finden sich entweder generell sehr wenige Aromastoffe, oder aber sehr viele flüchtige Verbindungen, jedoch kaum Grünnoten und C₅-Komponenten. Stattdessen tragen C₆- bis C₉-Dienale, C₇- bis C₁₁- ungesättigte Aldehyde, verzweigte C₅-Aldehyde und einige C₈-Ketone überdurchschnittlich zum –weniger hochwertigen- Aroma bei (Solinas et al., 1987; Solinas et al., 1988; Angerosa et al., 1996; Angerosa et al., 1999a; Aparicio et al., 2000; Angerosa, 2002).

Die Olivensorte ist -neben einer sorgfältigen Verarbeitung- sehr bedeutsam für das Gesamtaroma, da hierbei genetisch die enzymatischen Bedingungen für die Bildung der flüchtigen „Grünnoten“ gesetzt werden (Montedoro et al., 1978).

Interessant ist die Tatsache, dass das bei der Ölgewinnung angewandte Verfahren einen nicht unerheblichen Einfluss auf das Aroma des Öls hat. So spielen die Effektivität des Zermahlungsprozesses, die Temperatur und Standzeit der Pulpe eine wichtige Rolle (Angerosa, 2002). Metallische Mühlen zerkleinern die Oliven feiner und setzen somit primär mehr Öl aus den Zellen frei, jedoch herrschen, verglichen mit dem Mahlprozess durch Mühlensteine, um etwa 10 °C höhere Temperaturen im Brei. Hierdurch werden die Aktivitäten der an der LOX-Kaskade beteiligten Enzyme vom Standpunkt der Aromaerzeugung ungünstig verändert: Öle, die durch das traditionelle Verfahren mittels Steinmühle gewonnen werden, weisen signifikant mehr flüchtige organische Verbindungen auf als solche, die mit metallischen Mühlen behandelt werden. Insbesondere sind hiervon die wichtigen Verbindungen (E)-2-Hexenal, Hexenal und (Z)-3-Hexenol betroffen (Amirante et al., 1993; Catalano et al., 1995; Giovacchi-

no et al., 1996; Angerosa et al., 1997b; Salas und Sanchez, 1999; Sanchez und Salas, 2000).

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass bei mittels 3-Phasen-Dekanter gewonnenen Ölen weniger flüchtige Aromastoffe enthalten sind, als bei Ölen, die man traditionell durch Pressung gewonnen hat. Hiervon sind besonders die aromaaktiven Alkohole (E)-2-Hexenol und Hexanol berührt. Vermutlich liegt dies darin begründet, dass der 3-Phase-Dekanter die Zugabe von Wasser erfordert, welches wohl einen hohen Anteil der wasserlöslichen Alkohole fortschleppt (Giovacchino und Serraiocco, 1995; Angerosa, 2000). Dies veranlasste die Hersteller, verbesserte 2-Phasen-Dekanter anzubieten, die keine Zugabe von Wasser erfordern. Es ist klar, dass die technologischen Prozesse der Ölextraktion bedeutenden Einfluss auf das Aroma des Öls haben. Dennoch unternahm 2005 Luna et al. einen Versuch, anhand 64 flüchtiger Verbindungen (Analyse mittels Headspace-HRGC!) mittels fortgeschrittener statistischer Methoden eine Zuordnung des Aromaprofils zu einzelnen Olivensorten zu erzielen. Trotz 39 untersuchter Öle muss auch hier die praktische Bedeutung kritisch betrachtet werden. Umfangreichere (blinde) Testreihen fehlen und sortenreine Olivenöle sind sehr selten im Handel anzutreffen, vom Handelsvolumen gar fast zu vernachlässigen. Die Problematik, wie mit Mischungen umzugehen ist, sowie der technologische Einfluss der Extraktion auf die Effizienz der Analysemethode ist bisher nicht hinreichend geklärt.

2.9.2.1.2 Fehleraromen

Im Folgenden sind die wichtigsten Fehleraromen samt der verantwortlichen Verbindung –so weit bekannt- skizziert.

Verursacht durch schadhafte Oliven

Weit verbreitet, sehr gefährlich und gefürchtet ist die Olivenfliege (*Bactrocera oleae*; vormals bezeichnet als *Dacus oleae* G.), die ihre Larven ab Frühsommer in die Oliven ablegt. Im Laufe der Entwicklung der Larven werden die Schäden an der Olive immer größer, bis schließlich die Larve am Ende ihrer Entwicklung das Exokarp der Olive in einem charakteristischen Muster perforiert. Aus solch geschädigten Oliven lässt sich kein qualitativ hochwertiges Öl mehr gewinnen. Die Stabilität der hieraus gewonnenen Öle leidet und sowohl der Gehalt an flüchtigen Verbindungen als auch der Polyphenolanteil werden negativ beeinflusst. Es bilden sich überdurchschnittlich viele Carbonylverbindungen und Alkohole. Das hierbei auftretende Fehleraroma wird als „grubby“ (dreckig/schmuddelig) bezeichnet (Montedoro et al., 1985; Angerosa et al., 1992; Angerosa, 2002). Als Maß für den Grad der Schädigung kann das Verhältnis von Hexanal zum Gesamtgehalt an Alkoholen gelten (Angerosa et al., 1992).

Verursacht durch fehlerhaft ausgeführte Ernte

Wie eingangs erwähnt, macht die Ernte einen erheblichen Teil der Kosten eines Olivenöls aus, da sie -im Idealfall- von Hand zu erfolgen hat. Sind die Bäume jedoch zu groß, die Ansprüche an Ölqualität gering und kommt keine maschinelle Ernte in Frage, so wird oft eine Art passive Ernte praktiziert: Man wartet einfach, bis alle Oliven von selbst abgefallen sind und sammelt sie dann mit Maschinen oder mit Hilfe vorher untergelegter Netze. Dabei kommt es auch vor, dass die Oliven bis Ende der Frühlings liegen bleiben, bis endlich sämtliche Früchte abgefallen sind (Giovacchino, 2000). Durch diesen langen Kontakt mit dem Boden kommt es letztendlich zu einem Öl, das ein erdig-moderiges Aroma aufweist und dadurch im Genusswert erheblich gemindert ist. Es konnte gezeigt werden, dass hierfür ein starker Anstieg der flüchtigen Alkohole und Carbonylverbindungen verantwortlich ist (Angerosa et al., 1995; Angerosa, 2002). Die Intensität dieses Fehlparfums korreliert im übrigen gut mit dem Gehalt an Benzaldehyd (Angerosa, 2002).

Verursacht durch Mängel oder Verzögerung bei der Lagerung der Oliven

Unabdingbar für gute Ölqualität ist die sofortige Verarbeitung der geernteten Oliven. Da jedoch die Ölmöhlen zur Erntezeit stark ausgelastet sind, ist es leider üblich, die Oliven längere Zeit in Säcken zu lagern, bis freie Kapazitäten in den Fabriken zur Verfügung stehen. Werden die Steinfrüchte bei etwa 5°C in Jutesäcken trocken gelagert, hält sich der Qualitätsverlust in Grenzen (Kiritsakis et al., 1998). Aufbewahrung unter dem Gefrierpunkt ist aber abträglich, da hierbei Antioxidantien geschädigt werden sollen (Angerosa, 2002).

Eine lange oder unsachgemäße Lagerung hat im besten Falle „nur“ den Verlust wertvoller Aromabestandteile des Öls, allem voran (E)-2-Hexenal, zur Folge. Die durch die LOX-Kaskade entstehenden „Grünnoten“ sind damit stark betroffen. Zu der insgesamt verminderten Konzentration tritt eine Verschiebung im Profil der einzelnen aromawirksamen Komponenten auf (Gutiérrez et al., 1981; Angerosa et al., 1989; Angerosa et al., 1990; Angerosa et al., 1996; Angerosa, 2002).

Eine semiquantitative Einschätzung der Situation ermöglicht eine Studie von Angerosa et al. aus dem Jahr 1989: der prozentuale Verlust aller flüchtigen Verbindungen in Ölen, deren Oliven 6, 13, 21 und 27 Tage vor der Extraktion gelagert wurden, wurde ermittelt. Es zeigte sich, dass bereits nach nur 6 Tagen Lagerung 24 % der flüchtigen organischen Verbindungen verloren gingen; nach 13 Tagen 44 %. Mehr als die Hälfte, nämlich 54 % Verlust trat nach 21 Tagen auf, extreme 83 % Minderung nach 27 Tagen.

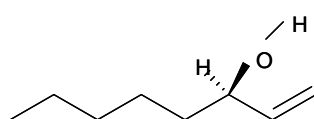
Neben dieser Schmälerung des Aromas können, bedingt durch mikrobielle Prozesse, auch störende, typische Fehleraromen auftreten. Werden Oliven in Säcke gepackt -neben Jutesäcken werden oft auch luftdichte Plastiksäcke verwendet- und bei Umgebungstemperatur gelagert, so tritt Autolyse ein, und das Exokarp verliert seine Barrierefunktion. Hefen, Pilze und Bakterien haben dann, auch auf Grund der hohen Feuchte, ideale Bedingungen.

Der Befall mit Hefen verursacht durch Bildung von Ethanol und Ethylacetat einen äußerst unangenehmen Aromadefekt, der als weinartig („winey“) bezeichnet wird. Die Präsenz von *Acetobacter* ist für den Essigstich („vinegary“) verantwortlich, der auf die gebildete Essigsäure zurückzuführen ist (Angerosa et al., 1996).

Die Kontamination der gelagerten Oliven mit *Enterobacteriaceae*, *Clostridia* oder *Pseudomonas* verursacht die Produktion von verzweigten Aldehyden, verzweigten Alkoholen und den korrespondierenden Säuren. Überschreiten diese Verbindungen im Öl die jeweiligen Geruchsschwellenwerte, wird der daraus resultierende Aromadefekt als stichig-angegoren („fusty“) bezeichnet (Tressl und Jennings, 1972; Tressl und Drawert, 1973; Angerosa et al., 1990; Angerosa, 2002). Eine Korrelation des „fusty“-Defekts mit der Konzentration von 2- und 3-Methylbutanol wurde beschrieben (Angerosa et al., 1990).

Eine Besiedelung mit Schimmelpilzen, die pektolytische Aktivität besitzen, führt zu einem modrig-feuchten, an Schimmelpilze erinnernden, Aromadefekt, der als „musty“ bezeichnet wird. Beteiligt sind meist *Penicillium*- und *Aspergillus*-Spezies (Marsilio und Spotti, 1987).

Die Enzyme der Pilze konkurrieren mit denen der Olive: mit steigendem Pilzwachstum sinken die Konzentrationen der C₆-Verbindungen („Grünnoten“), während stetig mehr und mehr für Pilze typische, durch LOX-Kaskade entstehende, C₈-Verbindungen entstehen. Dies liegt an der von den Oliven differenten Selektivität der an der LOX-Kaskade beteiligten Enzyme (Kaminski et al., 1974; Wurzenberger und Grosch, 1984; Börjesson et al., 1993; Angerosa, 2002). Die Verbindungen Propanol, 2-Methylpropanol, 3-Methylbutanol sowie deren korrespondierende Säuren und Ester treten mit zunehmendem Pilzwachstum in höheren Konzentrationen auf. Die Konzentration von (-)-(R)-1-Octen-3-ol im Verhältnis zu allen C₈-Komponenten korreliert gut mit dem Auftreten des „musty“-Defekts (Angerosa et al., 1999a; Angerosa, 2002).



(-)-(R)-1-Octen-3-ol

Verursacht durch unsachgerechte Extraktion

Da die Olivenernte meist von Dezember bis Februar stattfindet, also in einer Zeit, in der nicht optimale Wetterbedingungen herrschen, kann es zu einer Kontamination der Oliven mit Schlamm oder Erde kommen. Daher ist es geboten, die Oliven vor der Extraktion sorgfältig zu waschen. Gelegentlich, besonders bei sehr reifen Oliven, unterbleibt dies jedoch mit dem Ziel, Verluste von Fruchtfleisch zu vermeiden. Dann kommt es zu negativen Auswirkungen auf das Aroma des fertigen Öles; das entstandene Fehl aroma erinnert an nasse Erde (Giovacchino, 1996). Eine dafür verantwortliche Verbindung oder eine Korrelation mit der Konzentration einer bestimmten Verbindung konnte bislang noch nicht ausgemacht werden (Angerosa, 2002).

Kommen bei der Extraktion des Öles nagelneue oder generalüberholte Maschinen zum Einsatz oder wird in einer älteren Fabrik erstmalig in der Saison Öl gewonnen, so wurde oft ein metallisches Fehl aroma beschrieben. Man vermutet, dass die im Öl enthaltenen freien Fettsäuren eine auf der Oberfläche von neuen oder lange nicht benutzten Edelstahl-Geräten haftende Eisenoxidschicht zu lösen vermögen. Bei der ersten Extraktion der Saison soll der Eisengehalt im Öl etwa 4- bis 5-fach über dem Wert späterer Extraktionen liegen (Solinas et al., 1987; Angerosa, 2002).

Steht der zu extrahierende Olivenbrei zu lange oder bei zu hohen Temperaturen, so kommt es zu einem Erhitzungsgeschmack („heated“). Dieser steht in Verbindung mit der Entstehung von größeren Mengen 2- und 3-Methylbutanal durch Umsetzung von Aminosäuren (Angerosa et al., 2001; Angerosa, 2002).

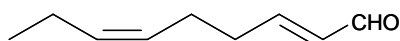
Speziell bei den durch Pressung gewonnenen Ölen, die -wie oben beschrieben- mehr flüchtige Verbindungen aufweisen, kann es zu einem weiteren Defekt kommen: der sogenannte Pressmattengeschmack („pressing mats“). Früher wurden Matten aus Naturstoffen verwendet, heute finden meist Kunststoffe Verwendung. Bleiben darin längere Zeit Reste von Trester hängen, so kommt es zu Abbaureaktionen und Fermentation. Dies führt zum Pressmattengeschmack. Bei kontinuierlich arbeitenden Anlagen kann dieser auch auftreten, wenn Tresterreste in Filtern längere Zeit stehen (Giovacchino, 2000; Angerosa, 2002).

Verursacht durch falsche Öllagerung

Der bekannteste Defekt eines zu lange oder unsachgemäß gelagerten Öles ist die Ranzigkeit. Dieser geht auf die Oxidation der Fettsäuren und die Spaltung von Hydroperoxiden zurück. Die daraus entstehenden, kurzkettigen aromawirksamen Verbindungen sind für die

Ranzigkeit verantwortlich. Zugleich sinken mit längerer Lagerzeit auch die Konzentrationen der durch die LOX-Kaskade entstandenen C₆-Aldehyde und C₆-Alkohole (v.a. (E)-2-Hexenal); dagegen steigen die Konzentrationen gesättigter und ungesättigter Aldehyde mit Kettenlänge zwischen 5 und 11 konstant an. Letztere weisen niedrige Geruchsschwellenwerte auf und schädigen das Ölbouquet enorm. Ungesättigte Carbonylverbindungen können weiter oxidiert werden und sind dann für neue Nuancen der Ranzigkeit, wie fischig oder nach Farbe schmeckend, verantwortlich (Frankel, 1985; Solinas et al., 1987; Guth und Grosch, 1990; Morales und Tsimidou, 2000; Morales und Przybylski, 2000). Aus dem Verhältnis von Hexanal zu Nonanal, wobei letzteres in frischen Ölen allerhöchstens in Spuren zu finden ist, soll sich eine beginnende Ranzigkeit erkennen lassen (Morales et al., 1997). Als möglichen Marker für das Fortschreiten der Oxidation wurde auch (E)-2-Heptenal, das in frischen Ölen ebenfalls abwesend ist, vorgeschlagen (Solinas et al., 1987; Solinas et al., 1988; Kiritsakis, 1998).

Besonders bei langer Lagerung in Metallbehältern kann der sogenannte Gurkengeschmack auftreten, der auf die Bildung von 2,6-Nonadienal zurückgeführt wird (IOOC, 1996).



(E,Z)-2,6-Nonadienal

Da Olivenöle oft „naturtrüb“, also nur grob gefiltert, angeboten werden, setzt sich im Verlauf der Lagerung ein Sediment unten im Behälter ab. In diesem sind neben Wasser auch Zucker, Enzyme und eventuell Mikroorganismen enthalten. Unter erhöhten Lagertemperaturen kann es hier zu einer Fermentation kommen. Details über die beteiligten Mikroorganismen sind bis heute kaum bekannt. Es erscheint wahrscheinlich, dass auf Grund des Vorkommens von Buttersäureverbindungen und 2-Ethylbuttersäurederivaten Bakterien der Gattung *Clostridium* (streng anaerob, Sporenbildner!) beteiligt sind, die typischerweise eine Buttersäuregärung betreiben (Roempp Online, Angerosa, 2002). Das hierbei entstehende, wenig angenehme Aroma wird als „schlammig“ bezeichnet („muddy sediment“).

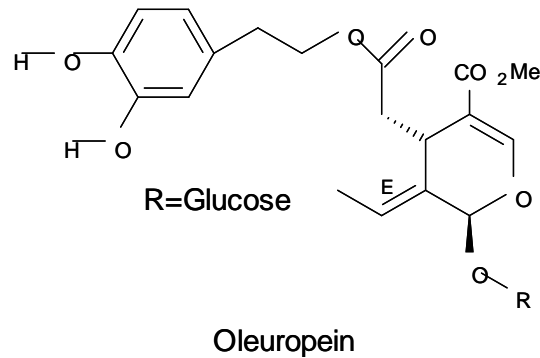
2.9.2.2 Polyphenole

Die Polyphenole des Olivenöls sind für dessen scharfen und bitteren Geschmack verantwortlich. Die Polyphenolzusammensetzung eines Olivenöls ist dabei sehr komplex und variabel. Es bestehen zahlreiche Abhängigkeiten von der Olivensorte, Reife, Geographie, Klima, Ern-

zeitpunkt und von den Extraktionsbedingungen. Letzteres wird am Beispiel eines 3-Phasen-Dekanters, der die Zugabe von Wasser erfordert besonders deutlich: Mit dem abzentrifugierten Wasser werden auch gewisse Mengen an Polyphenolen abgetrennt. Die Malaxation bei Raumtemperatur verändert auch -je nach Bedingungen- die nativ in der Olive vorkommenden Polyphenole (Montedoro und Garofolo, 1984; Bruni et al., 1994; Ciquanta et al., 1997; Esti et al., 1998; Caponio et al., 1999; Lesage-Meessen et al., 2001; Tovar et al., 2001; Artajo et al., 2006a; Christophoridou und Dais, 2006). Aufgrund der Komplexität soll das Thema hier nur kurz gestreift werden.

Neben den Aromaeigenschaften sollen die Polyphenole für die herausragende oxidative Stabilität und die postulierten positiven Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit verantwortlich sein; bei letzteren Effekten werden allerdings auch der hohe Squalengehalt und die Dominanz der Ölsäure diskutiert (Montedoro et al., 1992; Tsimidou, 1998; Owen et al., 2000(a,b&c); Aparicio und Luna, 2002). Die in Oliven enthaltenen Polyphenole lassen sich in vier Gruppen einteilen (Christoforidou (sic!) et al., 2005; Christophoridou (sic!) und Dais, 2006; Artajo et al., 2006 a&b): Phenole (z.B. Tyrosol, Hydroxytyrosol, Kaffeesäure, Ferulasäure), Secoiridoide (z.B. Oleuropein-Glycosid, Ligustrosid und deren Hydrolyseprodukte), Lignane (z.B. (+)-Pinoresinol, (+)-1-Acetoxypinoresinol, Syringaresinol) und Flavonoide (z.B. Apigenin, Luteolin, Quercetin und deren Glycoside). Tyrosol und Hydroxytyrosol entstehen dabei vermutlich aus der Hydrolyse der Secoiridoide (Montedoro et al., 1993; Cert et al., 2000).

Mengenmäßig am bedeutsamsten sind hierbei mit weitem Abstand Tyrosol, Hydroxytyrosol (jeweils frei und verestert vorhanden) und Oleuropein (Tuck und Hayball, 2002; Murkovic et al., 2004; Christophoridou und Dais, 2006); letzteres ist hauptverantwortlich für die Bitterkeit (Aparicio und Luna, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass „extra native“ Olivenöle verglichen mit raffinierten einen höheren Gesamtgehalt an Polyphenolen aufweisen (durchschnittlich 232 ppm vs. 62 ppm) und sich auch die Anteile der vier obig genannten Verbindungsgruppen hieran erheblich unterscheiden (Hydroxytyrosol & Tyrosol: 42 ppm vs. 5 ppm; Secoiridoide: 28 ppm vs. 9 ppm; Lignane: 42 ppm vs. 7 ppm) (Owen et al., 2000c). Macht man nun die Polyphenole für die nachgesagten positiven Wirkungen auf die Gesundheit verantwortlich, so könnte man daraus schließen, dass raffiniertes Olivenöl aufgrund der geringeren Gehalte keine bzw. erheblich geringere Effekte zeigt. Owen et al. (2000c) konnten ebenfalls zeigen, dass ein methanolischer Polyphenolextrakt aus Olivenöl erheblich höhere antioxidative Wirkungen *in vitro* aufweist als der anderer Pflanzenöle.



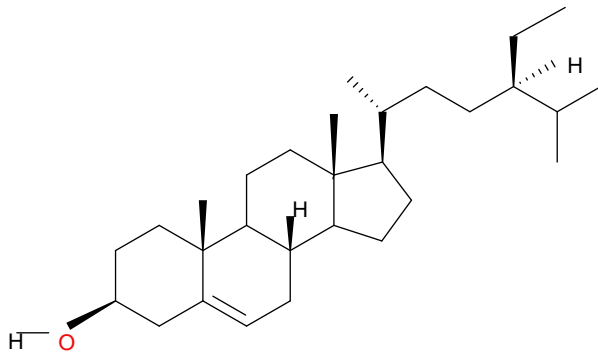
Die Analyse der Polyphenole erfolgt vorwiegend mittels Flüssigchromatographie (Cortesi et al., 1995; Owen et al., 2000c; Murkovic et al., 2004; Hümmer, 2009), jedoch ist auch die Derivatisierung mit einem phosphorhaltigen Reagenz und nachfolgende ^{31}P -NMR zur qualitativen und quantitativen Analyse beschrieben worden (Christophoridou und Dais, 2006). Auch GC-Methoden kommen zur Anwendung (Solinas, 1987). Ein kritischer Punkt ist die korrekte Isolierung, die oft mittels Flüssig-Flüssig Extraktion durchgeführt wird, was aber zu Verlusten und Veränderungen der Polyphenole führen kann; als Alternative gab es Versuche mittels Festphasenextraktion (SPE) (Cortesi, 1995; Pirisi et al., 1997).

Um die „bioaktiven“ Polyphenole nicht zu beeinträchtigen, sollte das Öl stets dunkel gelagert werden. Unter Lichteinfluss sollen nach nur 4 Monaten Lagerzeit 45% der Polyphenole zerstört sein (Okogeri und Tasioula-Margari, 2002).

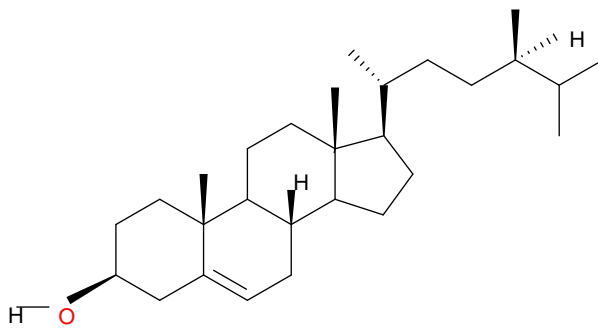
2.9.2.3 Sterole

Phytosterole kommen frei oder mit Fettsäuren verestert in allen Pflanzenölen vor. Auch ihnen werden positive Wirkungen auf die Gesundheit nachgesagt; beispielsweise sollen sie, als Nahrungsbestandteil oder Nahrungsergänzungsmittel zu sich genommen, die Resorption von Cholesterin aus dem Darm hemmen und so zu einem niedrigeren Cholesterinspiegel im Blut führen (Kamal et al., 1998; Abidi, 2001; Ostlund et al., 2002; Jong et al., 2003; Richelle et al., 2004). Auf dem deutschen Markt befindet sich seit einiger Zeit als „functional food“ eine mit Sterolen angereicherte Margarine, welche die Cholesterinaufnahme senken soll. Abschließende Untersuchungen, ob dieser isoliert zu betrachtende Effekt einen Einfluss auf die Todesrate hat, stehen hingegen aus. Ferner hat man gezeigt, dass die Einnahme von Pflanzensterolen die Resorption von Carotinen und Tocopherolen hemmt (Richelle et al., 2004). In der Literatur sind für Pflanzensterole auch antiinflammatorische, antibakterielle, antifungale, antioxidative und antitumorale Effekte beschrieben worden (Awad et al., 2000; Stuchlík und Zák, 2002).

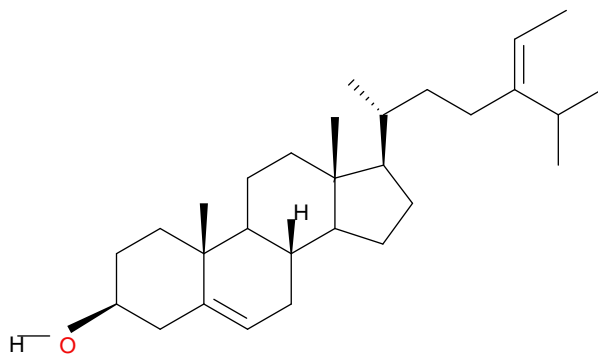
Im nativen Olivenöl dominieren β -Sitosterin, Δ^5 -Avenasterol und Campesterol (vgl. Abb. 2.10). Als Minorkomponenten sind Cholesterin, Brassicasterol, Stigmasterol, Clerosterol, Δ^7 -Stigmasterol und Δ^7 -Avenasterol beschrieben worden.



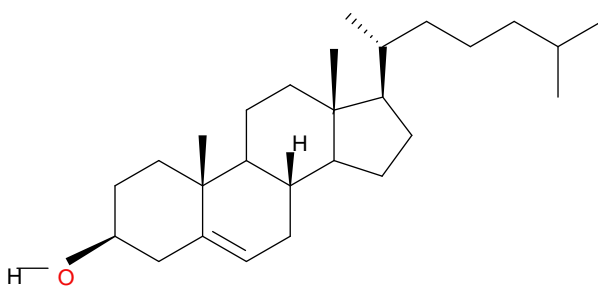
Sitosterin



Campesterol



Avenasterol



Cholesterin

Abb. 2.10: Struktur ausgewählter Sterole.

In Olivenöl sind 80% der vorhandenen Sterole frei, also nicht verestert; mit zunehmender Reife soll der Gehalt freier und veresteter Sterole abnehmen (Cunha et al., 2007). Dies wird durch Untersuchungen von Gordon und Miller (1997) bestätigt, die Olivenöl unter allen Pflanzenölen in die Gruppe mit dem niedrigsten Vorkommen an Sterylestern der Sterole einstuften.

Quantitative Angaben finden sich in der Literatur recht häufig; jedoch unterscheiden sich die angegebenen Mengen erheblich. So ermittelten Cunha et al. 2007 bei der Untersuchung von 9 Olivenölen mit geschützter Herkunftsbezeichnung folgende Sterol-Gehalte:

Tabelle 2.3: Gehalte an verschiedenen Sterolen in Olivenölen, nach: Cunha et al., 2007

<i>Verbindung</i>	<i>verestert</i>	<i>frei</i>
Cholesterol	2,6 – 6,4 ppm	0,9 – 3,6 ppm
Campesterol	2,0 – 9,7 ppm	21,8 – 26,4 ppm
Stigmasterol	nicht detektiert	19,8 – 21,4 ppm
β -Sitosterol	84 – 187,1 ppm	600,0 – 755,4 ppm
β -Sitostanol	1,6 – 5,0 ppm	5,2 - 9,3 ppm

Diese Angaben sind als exemplarisch zu betrachten, da es je nach Sorte und Reife der Oliven starke Schwankungen gibt. Der Gehalt an β -Sitosterol wird beispielsweise von Aparicio und Aparicio-Ruiz (2000) mit bis zu 2610 ppm angegeben, während der Durchschnittswert nach Angaben des Chemie-Lexikons Römpp online bei 732 ppm liegen soll; für Δ^5 -Avenasterol wird dort ein Durchschnittswert von 75 ppm in Olivenöl genannt.

Veränderungen der Sterolzusammensetzung treten u.a. bei Hitzeeinwirkung auf, wie sie bei einer Raffination stattfinden kann. Ein durchlaufener Raffinationsprozess soll zu einer Abnahme der freien Sterole und zugleich einer Erhöhung der Konzentration an veresterten Sterolen führen (Cunha et al., 2007). Im Gegensatz dazu gaben 1976 Leone et al. an, der Sterolgehalt vermindere sich durch Raffination insgesamt. Dies ist jedoch als überholt anzusehen. „Lampantöle“, die ja als eine Art Zwischenprodukt noch nicht raffiniert sind, lassen sich durch einen geringeren Gehalt an freien Campesterol und freiem Stigmasterol von nativen Ölen unterscheiden (Grob et al., 1990; Verleyen et al., 2002). Einen Schritt weiter gingen de Blas und Gonzalez (1996), indem sie erklärten, die analytische Differenzierung zwischen „nativen“, raffinierten und lösemittel-extrahierten Olivenöl gelänge lediglich anhand der Sterolverteilung. Sie berichteten, dass nach Quantifizierung von Stigmasterol, Clerosterol, Δ^5 -Avenasterol, Δ^7 -Avenasterol und Δ^7 -Stigmasterol stets eine eindeutige Zuordnung möglich gewesen sein soll. 1987 berichteten Lanzon et al, dass eine bloße Neutralisation des

Öles keinen Einfluss auf die prozentuale Sterolzusammensetzung haben soll, ganz im Gegensatz zu Bleicherden, die eine dosisbezogene Veränderung der Sterolzusammensetzung verursachen.

Lanzon et al. (1994) untersuchten ebenfalls die Auswirkungen einer Raffination auf die Sterolzusammensetzung. Sie konnten zeigen, dass die Sterole bei der Entfärbung und Desodorierung der Öle Dehydratisierungsreaktionen unterliegen. Beispielsweise entsteht aus β -Sitosterol das 3,5-Stigmastadien, aus Campesterol das 3,5-Campestadien und aus Stigmasterol das 3,5,22-Stigmastatrien (Lanzon et al. 1994; Cert et al., 1994; Aparicio und Aparicio-Ruiz, 2000; Moreda et al., 2001). Wie von Lanzon et al. bereits 1989 vorgeschlagen, kann man 3,5-Stigmastadien als Marker für die Streckung von nativen Olivenölen mit anderen, stark raffinierten Pflanzenölen einsetzen. Mariani et al. entwickelten 1995 eine Methode, um auch einen geringen Zusatz von entsterolisiertem „high-oleic“-Sonnenblumenöl, das eine dem Olivenöl ähnliche Triglyceridzusammensetzung aufweist, zu entdecken, indem sie die dabei aus den Δ^5 -Sterolen entstehenden Δ^{14} - und $\Delta^{8(14)}$ -Sterole untersuchten.

Zum instrumentell-analytischen Vorgehen der Sterolanalytik finden sich in der Literatur viele Methoden und Vorgehensweisen. Zu beachten ist, dass das Vorkommen von freien und veresterten Sterolen verschiedene Ansätze hervorgebracht hat: Einerseits lassen sich veresterte Sterole mittels Hochtemperatur-Gaschromatographie direkt analysieren, oder man bestimmt den Sterolgehalt vor und nach der Verseifung, um detailliertere Informationen zu erhalten. Daneben sind HPLC-GC-Kopplungen, RP-HPLC-UV, HPLC-HPLC-GC-MS, GC-FID nach Silylierung, HPLC-ELSD, SPE-GC-MS nach Silylierung, LC-GC-FID und TLC in der Literatur beschrieben worden (de Blas und Gonzalez, 1996; Lercker und Rodriguez-Estrada, 2000; Aparicio und Aparicio-Ruiz, 2000; Moreda und Perez-Camino, 2000; Torres et al., 2005; Cunha et al., 2007).

2.9.2.4 Kohlenwasserstoffe

2.9.2.4.1 Alkane / Alkene

Die Kohlenwasserstoffe sind Verbindungen geringster Polarität, die erstmals im Unverseifbaren von Pflanzenölen in den 40er Jahren des vergangenen Jahrhunderts von Jasperson und Jones entdeckt worden sind (Jasperson und Jones, 1947). Im Olivenöl wurden Kohlenwasserstoffe zum ersten Mal 1963 durch Capella et al. ausführlicher beschrieben. Spätere Untersuchungen bestätigten die Anwesenheit von n-Alkanen von C_{10} bis C_{35} , wobei ungerade Kettenlängen weit häufiger auftraten als gerade (Eisner et al., 1965; Fedeli, 1977; Bastic et al., 1978; Lanzon et al., 1994; Moreda et al., 2001; Bortolomeazzi et al., 2001). Daneben

wurden auch andere Kohlenwasserstoffe wie n-Alkene, Sesquiterpene (z.B. α -Farnesen), Terpene, Carotine, aromatische Verbindungen sowie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe nachgewiesen (Moreda et al., 2001).

Man vermutet, dass Alkane Biosyntheseprodukte der Pflanze sind, indem langkettige Fettsäuren decarboxyliert werden (Kolattukudy, 1976; Iyer et al., 1998; Moreda et al., 2001). Sollte dies der Fall sein, wäre eine Untersuchung der Stabilisotopenverhältnisse besonders interessant, da eine relativ starke Diskriminierung bei Decarboxylierungen zu erwarten sein sollte (Appel, 2008). Aufgrund der geringen Konzentrationen der Alkane ist ein solches Vorgehen jedoch äußerst mühsam und wohl nicht von praktischer Bedeutung für die Authentizitätskontrolle.

In pflanzlichen Ölen finden sich zumeist die n-Alkane mit der Kettenlänge von C_8 bis C_{35} , insbesondere jedoch C_{21} bis C_{35} (Bastic et al., 1978; McGill et al., 1993; Lanzon et al., 1994; Moreda, 2001). Exemplarisch seien einige der im Olivenöl ermittelten Konzentrationen (Moreda et al. 2001) angegeben: n- C_{23} : 19 ppm; n- C_{25} : 18 ppm; n- C_{27} : 16 ppm; n- C_{29} : 12 ppm; n- C_{31} : 9 ppm; n- C_{33} : 6 ppm. Die geradzahigen Alkane ab C_{22} (außer C_{24} mit hier 9 ppm) kommen nur bis max. 2 ppm vor, die kürzeren lediglich in Spuren um 0,1 ppm. Diese Tendenzen werden von Lanzon et al. (1994) bestätigt; es handelte sich hierbei um eine sehr ausführliche Untersuchung von 250 spanischen extra nativen Olivenölen. Die Schwankungsbreiten der Alkane aller 250 Proben wurden ermittelt. Hierbei ergaben sich starke Differenzen in der Zusammensetzung, was mutmaßlich an Sorte und Herkunft der Oliven liegen könnte. Interessant wäre der Einbezug von anderen Anbauländern außer Spanien.

Guinda et al. untersuchten 1996 das Alkanprofil fünf ausgewählter spanischer Olivensorten; eine Unterscheidung der Sorte soll via Alkangehalt möglich sein. Da nur wenige, dazu nur spanische Olivensorten untersucht wurden, muss der praktische Nutzen und die Durchführbarkeit der Methode bei allgemeiner gehaltenen Fragestellungen der Herkunftsanalytik in Frage gestellt werden. Versuche, am Alkanprofil die Beimischung fremder Öle zu beweisen, sind in der Literatur zu finden (Webster et al., 2000), aber wegen der großen Schwankungsbreiten im Olivenöl und des oft nur geringen Alkangehalts anderer Pflanzenöle nur bedingt aussagekräftig. Bortolomeazzi et al. (2001) fanden starke Differenzen im Gesamtalkangehalt, der nach Sorte und Herkunftsland variiert. So enthielten spanische und italienische Öle nur 30 – 65 ppm, während tunesische und griechische Öle aus Oliven der Sorte Koroneiki zwischen 140 und 175 ppm enthielten.

Noch geringere Konzentrationen besitzen die Alkene im Olivenöl. Sie bewegen sich im Bereich von 0,5 bis 2 ppm (Bortolomeazzi et al., 2001). Bei den Verbindungen handelt es sich wahrscheinlich um Alkene der Kettenlänge 23 bis 27, mit der Doppelbindung am C_9 und insbesondere 8-Heptadecen sowie um 6,10-Dimethyl-1-undecen (bis zu 8 ppm; Moreda et al.,

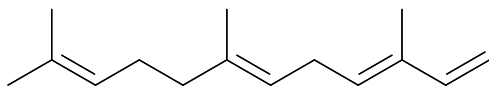
2001) (Goh und Gee, 1986; Lanzon et al., 1994; Moreda et al., 2001; Bortolomeazzi et al., 2001). Neuerdings hat man einige n-1 Alkene mit Kettenlängen von C₁₂ bis C₂₄ beschrieben (Moreda et al., 2001). Die Konzentration der einzelnen Olefine soll -zumindest bei den dort untersuchten Ölen- sortenabhängig sein (Bortolomeazzi et al., 2001). 6,10-Dimethyl-1-undecen konnte in Aromaextrakten einiger von uns untersuchter Öle auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden.

Bei raffinierten Ölen sollen zudem weitere Alkene wie Pentadecen, Octadecen, Pentadecadien, Octadecadien, n-Hexacoasien und Neophytadien enthalten sein (Moreda et al., 2001)

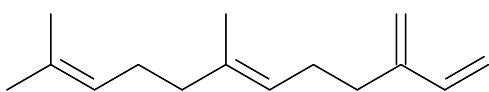
Sämtliche Konzentrationsangaben sind nur als semiquantitativ anzusehen, da bei den durchgeführten HRGC-FID-Bestimmungen nie genaue Response-Faktoren ermittelt wurden, sondern dieser einfach näherungsweise 1 gesetzt wurde.

2.9.2.4.2 Sesquiterpene

Bortolomeazzi et al. konnten 2001 mittels HRGC-MS-Untersuchungen 31 Sesquiterpene in verschiedenen nativen Olivenölen nachweisen und davon 24 identifizieren. Die darunter am häufigsten vorkommende Verbindung (bis zu 90% des Sesquiterpengehalts ausmachend) war in der Regel α -Farnesen, ein vierfach ungesättigtes acyclisches Sesquiterpen; daneben fanden sich auch dessen zwei Isomere (E/Z)- β -Farnesen.



α -Farnesen



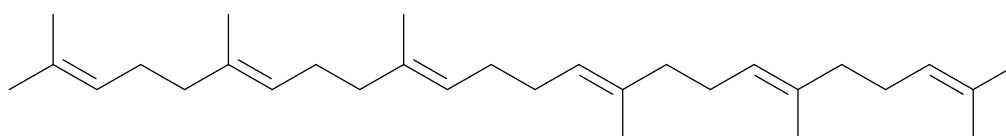
β -Farnesen

Die anderen am häufigsten vorkommenden Sesquiterpene waren α -Copaen, Eremophilen und α -Muurolen. Beinahe alle 31 gefundenen Sesquiterpene fanden sich in allen Olivenölen wieder, jedoch in stark unterschiedlichen Konzentrationen. Die Gehalte an Sesquiterpenen insgesamt variierten von 2 ppm bis 31 ppm (Bortolomeazzi et al., 2001; Moreda et al., 2001). Bei von Lanzon et al. 1994 analysierten raffinierten Olivenölen wurde festgestellt, dass diese keine Sesquiterpene mehr enthielten. Da die Raffination jedoch heute milder erfolgt als frü-

her oder gar nur eine Teilraffination durchgeführt wird, um z.B. unerlaubt „Lampantöl“ zu „nativem“ Öl aufzuwerten, ist dieser Befund nicht allgemein übertragbar.

2.9.2.4.3 Squalen

(all-E)-2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaen, besser bekannt unter dem Trivialnamen Squalen, ist eine stark ungesättigte Verbindung der Summenformel $C_{30}H_{50}$ aus der Gruppe der Triterpene.



Squalen

Die Verbindung kommt in größeren Mengen im Leberöl von Haifischarten (*Squalus*) vor und ist eine zentrale Schlüsselsubstanz im Sekundärstoffwechsel von Mensch, Tier und Pflanze. Aus Squalen entstehen Sterole wie das Cholesterol und die Steroid-Hormone. Es ist auch in vielen Pflanzenölen enthalten, darunter in relativ hohen Mengen im Olivenöl (ca. 0,5 %) und im Hautfett (12 %) (Lexikon der Chemie; Lercker und Rodriguez-Estrada, 2000; Moreda et al., 2001). Die meisten Autoren geben einen Squalengehalt von etwa 0,8 – 12 g pro kg Olivenöl an; auch hier sind starke Schwankungen eher Regel als Ausnahme (de Leonardis et al., 1998; Cert et al., 2000; Nenadis und Tsimidou, 2002; Murkovic et al., 2004). Owen et al. (2000 c) geben einen mittleren Squalengehalt von 2,9 g pro kg Olivenöl an. Die Raffination hat einen signifikanten, aber vergleichsweise geringen Einfluss auf den Squalengehalt (Owen et al., 2000c). Moreda et al. (2001) berichteten, dass hierbei Isomerisierungen auftreten, die mehrere Verbindungen mit den Molekularmassen 408 und 410 entstehen ließen; es wird vermutet, dass Dehydrierungsprodukte des oxidierten Squalens dafür verantwortlich sind. Oxidationsprodukte des Squalen, Epoxy-Squalene, können bei der Isolierung der Tocopherole durch Coelution stören (Lercker und Rodriguez-Estrada, 2000).

Aus Squalen lässt sich Squalan, ein technisches, oxidationsunempfindliches Schmiermittel, durch Reduktion herstellen. Daneben findet Squalen in der Pharmazie (z.B. als Salbengrundlage oder Adjuvans beim „Schweinegrippe“-Impfstoff) sowie in der Kosmetik Verwendung (Römpp online, Moreda et al., 2001).

Aufgrund seiner nachgewiesenen antioxidativen Eigenschaften wird Squalen als Nahrungsergänzungsmittel beworben, mit diffus-dubiosen Hinweisen auf nicht eindeutig belegbare gesundheitliche Wirkungen, wie anticarcinogene, antiinflammatorische und immunstimulie-

rende Effekte. Von dieser Seite wird dem Squalen auch eine angebliche Wirkung gegen das atopische Ekzem zugesprochen.

Anzunehmen, aber nicht bewiesen, ist der Beitrag von Squalen zu der -verglichen mit anderen Ölen- relativ hohen Oxidationsbeständigkeit von Olivenöl. Bei der in-vitro-Untersuchung der antioxidativen Wirkung von methanolischen Extrakten aus Olivenöl konnten Owen et al. (2000c) eine im Vergleich zu anderen Pflanzenölen weitaus höhere antioxidative Wirksamkeit nachweisen; der genaue Grund hierfür wurde nicht gefunden, und es liegt im Rahmen des Spekulativen, das im methanolischen Extrakt enthaltene Squalen hierfür verantwortlich zu machen.

Es wurde oftmals postuliert, dass der aussergewöhnlich hohe Squalengehalt im Olivenöl für dessen angebliche gesundheitsfördernde Wirkungen verantwortlich sei. Diese pauschale Aussage negiert jedoch die zu vermutenden Synergieeffekte mit den anderen „bioaktiven“ Inhaltsstoffen. Dennoch ist diese Hypothese nicht völlig von der Hand zu weisen.

Im Darm resorbiertes Squalen wird zur Haut transportiert und dort gespeichert (Owen et al., 2000c; Lu et al., 2004). Wie eingangs erwähnt, ist bekannt, dass Sebum bis zu 12 % Squalen enthalten kann. Dort könnte das Squalen durch Abfangen von UV-generierten Singulett-Sauerstoff möglicherweise eine präventive Wirkung gegen Hautkrebs aufweisen (Owen et al., 2000c); zur Bestätigung erwähnen die Autoren eine in-vivo-Studie an Nagern (ohne Quellenangabe) und führen die angeblich geringe Inzidenz dieser Krebsart bei Bewohnern im Mittelmeerraum an. 1997 postulierte Newmark bereits eine anticarcinogene Wirkung von Squalen, die auf der Inhibierung der HMG-CoA Reduktase basieren soll, was wiederum im Verlauf die Expression des *ras* Onkogens vermindern soll.

Die Analyse gelingt mittels Flüssig- oder Gaschromatographie und verschiedensten Detektoren wie dem Diodenarray-Detektor (DAD) oder dem massenselektiver Detektor (MS) (de Leonardis et al., 1998; Cert et al., 2000; Moreda et al., 2001; Nenadis und Tsimidou, 2002; Lu et al., 2004). Eine reine Laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (LDI-TOF-MS) Methode wurde 2006 von Zambonin et al. beschrieben.

Squalen ist bei Pflanzen und Tieren ein Zwischenprodukt bei der Biosynthese von Sterolen (z.B. Cholesterol, Sitosterole), Herzglykosiden (z.B. Digitoxin, Cymarin), Steroidalkaloiden (z.B. Tomatidin, Solanidin) und Saponinen (z.B. Ursolsäure). Diese Verbindungen entstehen durch Einwirkung der Squalen-Monoxidase auf Squalen in Gegenwart molekularen Sauerstoffs. Das dadurch gebildete 3,4-Oxidosqualen, ein Epoxid, leitet einen sich stufenweise fortsetzenden Zyklisierungsprozess (fünffache Wagner-Meerwein-Umlagerung) ein, der letzten Endes bei Tieren zu Lanosterol, einem C₃₀-Sterol, führt. Letzteres kann durch oxidative Abspaltung dreier Methylgruppen zu Cholesterin umgewandelt werden. Bei Pflanzen ist das Zwischenprodukt nicht Lanosterol, sondern Cycloartenol. Die Reaktion findet vollständig im endoplasmatischen Retikulum statt. Das gebildete Cholesterol ist biosynthetische Vorstufe

aller anderen menschlichen und tierischen sowie vieler pflanzlicher Steroide. Für einen sehr detaillierten Einblick in die Biosynthese von Sterolen und Triterpenen sei hier auf die äußerst umfangreiche Übersicht von Brown verwiesen (1998). Die Fähigkeit lebender Organismen zur Squalen-Cyclisierung und Steroid-Synthese hat sich im Rahmen der Evolution vermutlich sehr früh entwickelt (Bakterien!) (Richter, 1996).

Für die von uns im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Isotopenverhältnisbestimmungen des Squalens ist die Frage nach dessen Biosynthese interessant. Bei dieser wird, ausgehend von Acetyl-CoA, die C₆-Verbindung Mevalonat gebildet. Dieses wird zu Isopentenyl-diphosphat, dem „aktiven Isopren“ umgewandelt. Aus dieser Verbindung werden alle Isoprenoide aufgebaut. Wenn nun zwei Moleküle aktives Isopren kondensieren, entsteht Geranyl-diphosphat, aus dem durch weitere Addition eines Moleküls aktiven Isopren die C₁₅-Verbindung Farnesyl-diphosphat entsteht. Zwei Moleküle Farnesyl-diphosphat werden durch die Squalen-Synthase schließlich zu Squalen kondensiert. Man kann an dieser Stelle für eine detailliertere Betrachtung die Bildung von Squalen in 4 Stufen einteilen: Bildung von Mevalonat, Entstehen des aktiven Isoprens, Kondensationen zu Farnesyl-diphosphat und Bildung von Squalen; dieser Stoffwechselweg wird als MVA-Weg bezeichnet (Richter, 1996).

Wie in Abb. 2.11 dargestellt, kondensieren im ersten Schritt im endoplasmatischen Retikulum 2 Moleküle Acetyl-CoA unter Abspaltung von CoA zu Acetoacetyl-CoA. Katalysiert wird diese Reaktion von der Acetyl-CoA-C-Acyltransferase **1** (EC 2.3.1.16). Nach Hinzutritt (Aldo-laddition!) eines weiteren Moleküls Acetyl-CoA, katalysiert via Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase **2** (EC 4.1.3.5), entsteht die Verbindung 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Durch das Schlüsselenzym HMG-CoA-Reduktase **3** (EC 1.1.1.34) wird simultan HMG-CoA vom Coenzym gelöst und reduziert (NADPH-abhängig); es entsteht Mevalonat (3,5-Dihydroxy-3-methylpentansäure).

Mevalonat wird als nächstes durch Mevalonat-Kinase **4** und Phosphomevalonat-Kinase **5** unter ATP-Verbrauch zu Mevalonyl-diphosphat umgewandelt. Letzteres unterliegt einer ATP-verbrauchenden Decarboxylierung (Diphosphomevalonat-Decarboxylase) zu Isopentenyl-diphosphat (Isopent-3-enylpyrophosphat, IPD oder auch IPP), dem aktiven Isopren (Lynen et al., 1958; Rilling et al., 1958; Rilling und Bloch, 1959). Wie Lynen et al. 1958 nachwiesen, entsteht aus IPD durch Isomerisierung unter Beteiligung der Isopentenyl-diphosphat- $\Delta^{2,3}$ -Isomerase das 3,3-Dimethylallyl-diphosphat DMAP (syn.: Prenyldiphosphat, Isopent-2-enyldiphosphat). Hierbei handelt es sich nach Lynen et al. (1958) um eine Gleichgewichtsreaktion zugunsten von DMAP.

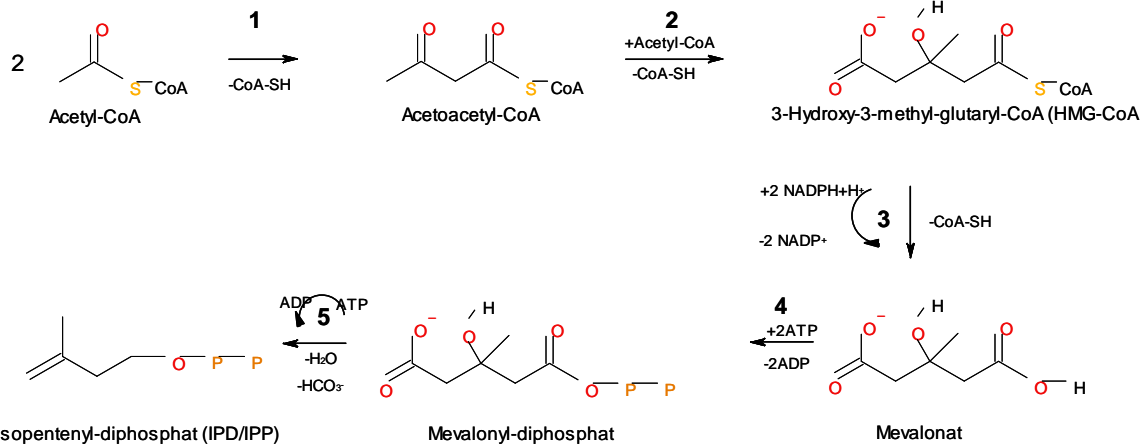


Abb. 2.11: Biosynthese von Mevalonat die fettgedruckten Zahlen beziehen sich auf die Enzyme im Text. (Richter, 1996)

Seit 1996 (Schwender et al., 1996) gilt ein weiterer Bildungsweg von IPD in Pflanzen, Algen, Cyanobakterien, Eubakterien und einigen Parasiten, über den vorher bereits aus Untersuchungen an Bakterien (Endosymbiontentheorie!) Hinweise vorlagen (Rohmer et al., 1993), als gesichert. In diesen Untersuchungen mit diversen stabilisotopenmarkierten Substraten wurden bestimmte Isoprenoide (u.a. Pigmente wie Chlorophylle, Carotinoide sowie Prenylchinone, Mono-, Di-, Tetraterpene und einige bestimmte Sterole; jedoch keine Sesquiterpene oder Triterpene) weiterhin biosynthetisiert (Estevez et al., 2001), obwohl die Biosynthese von Mevalonat durch ein Antibiotikum wirksam inhibiert wurde. Das Muster der Stabilisotopenmarkierung wich von dem erwarteten aus dem bekannten MVA-Weg ab. Dazu konnte nach Gabe von Isotopen-markiertem Mevalonat auch eine Absenz desselben in vielen Isoprenoiden beobachtet werden (Schwender et al., 1996). Mit dem damaligen Kenntnisstand waren derartige Ergebnisse nicht in Einklang zu bringen, und man vermutete einen non-Mevalonat Bildungsweg. Es handelt sich dabei, wie man heute weiß, um den so genannten MEP oder DOXP Weg, benannt nach seinen Intermediaten Methylerythritol bzw. syn. 1-Desoxyxylulose-5-phosphat; dieser tritt außer bei den untersuchten Algen auch bei höheren Pflanzen auf. Bereits jetzt sei erwähnt, dass die Detailinformationen dieses Stoffwechselweges in weiten Teilen spekulativ sind. Explizite Isotopenverhältnisuntersuchungen sind rar; dies relativiert sich aber durch die Tatsache, dass -nachdem man davon ausgeht, dass gewisse Verbindungen nur über den MEP-Weg synthetisiert werden- keine besonders ungewöhnlichen Isotopenverhältnisse für eben diese Verbindungen gefunden wurden. Erschwerend für die Einstufung der Relevanz hinsichtlich Isotopendiskriminierung dieses plastidären Stoffwechselweges (Endosymbiontentheorie!), der wohl älter als der MVA-Weg ist, sind die Verflechtungen zwischen beiden nun bekannten Stoffwechselwegen („cross-talk“), die dazu führen, dass Zwischenstufen ausgetauscht werden können (Eisenreich et al., 1998)), sowie die Tatsache,

dass nicht in allen Organismen beide Stoffwechselwege aktiv sind. Obwohl für Oliven keine Daten vorliegen, spricht einiges dafür, dass –wie bei den höheren Pflanzen üblich– sowohl der MVA als auch der MEP-Weg existieren; welcher von beiden der dominierende Weg ist und welche Verbindungen über welchen Weg biosynthetisiert werden, kann nicht beantwortet werden. Interessant ist, dass in einer Alge einige Sterole im Plastid via MEP synthetisiert werden, während der Rest der Sterole im Endoplasmatischem Reticulum (ER) des Cytosol gebildet wird (Estevez et al., 2001); theoretisch ist also eine Biosynthese der Sterole im Plastid möglich, und es liegt im Rahmen der Spekulation zu behaupten, dass der genetisch ältere MEP-Weg im Laufe der Entwicklung verloren ging und der MVA-Weg seine Aufgaben bei höheren Pflanzen übernommen hat. Bei Zellkultur-Versuchen wurde festgestellt, dass *Croton stellatopilosus* (*Euphorbiaceae*) einmal nur MVA-Aktivität zeigte und in anderen Untersuchungen jedoch MVA- und MEP-Stoffwechsel nachweisbar waren (Kongduang et al., 2008); der Teufel steckt im Detail: bei erstgenannter Untersuchung wurde eine Plastid-freie Zellkultur untersucht, bei letzterem Versuch eine Kallus-Kultur, die Plastiden enthielt. In Übereinstimmung mit den vorgenannten Fakten wurde hier also experimentell bestätigt, dass Plastiden vorhanden sein müssen, damit es einen MEP-Stoffwechselweg geben kann. Überraschend war bei diesen Untersuchungen jedoch, dass bei den Kallus-Kulturen Stigmasterol und β -Sitosterol über den MVA- und MEP-Weg biosynthetisiert wurden. Dies zeigt, dass entweder der Chloroplast dazu befähigt ist (und es wohl im „Normalfall“ nicht tut) oder dass ein Austausch („cross-talk“) der isotopenmarkierten Substrate erfolgte.

Bei der Aufklärung der Herkunft der jeweiligen Isoprenoide kommt der Isotopenverhältnisanalyse zukünftig erhebliches Potential zu (zur Synthese von isotopenmarkiertem MEP siehe Hoeffler et al., 2000). Auch wenn man im Allgemeinen davon ausgeht, dass die Biosynthese von IPD in den Plastiden über den MEP-Weg abläuft und im Cytosol der MVA-Weg beschriftet wird, bedarf es also noch genauer Untersuchungen über die Situation bei Ölbäumen. Da vielfache Ausnahmen existieren, ist im Prinzip jede Pflanze separat zu untersuchen; so zeigte sich bei Erdbeeren und Himbeeren (*Rosaceae*), denen es nicht möglich ist, IPD aus dem Plastid zu schleusen, dass Monoterpene ausnahmsweise dort im Cytosol produziert werden können (Hampel et al., 2007). Eisenreich et al. (1998) berichteten darüber, dass IPD aus dem MVA-Weg sich auch in Verbindungen findet, die aus dem MEP-Weg entstehen und umgekehrt. Auch im „Normalzustand“ stammt, wie Markierungsversuche ergaben, nicht jedes Molekül IPD streng aus dem „zuständigen“ (besser: dominierenden) Stoffwechselweg, sondern ein kleiner Teil (z.B. 6% bei β -Sitosterol bei *C. roseus*) entspringt dem jeweils nicht-dominierenden Stoffwechselweg (Arigoni et al., 1997; Eisenreich et al., 1998). Dieser Austausch und die Tatsache, dass nicht in jeder Pflanze alle Isoprenoide nach der gleichen Stoffwechselroute biosynthetisiert werden, macht es äußerst schwierig, wenn nicht nach derzeitigem Wissensstand sogar unmöglich, gemessene Isotopenverhältnisse vor

dem Hintergrund ihrer Biosynthese zu deuten. Diesen widrigen Bedingungen zum Trotz konnten Sessions et al. 2002 einen Lichtblick bieten: Bei Untersuchungen am Methan-atmenden Bakterium *Methylococcus capsulatus* konnte bei den Isoprenoiden ein den meisten anderen Pflanzen ähnlicher Fraktionierungsfaktor nachgewiesen werden; dies ist beachtenswert, da das Bakterium im Gegensatz zu den Pflanzen nur über den MEP-Weg zur Isoprenoidbiosynthese verfügt. Dies impliziert nun, dass zwischen dem MEP- und MVA-Weg aus „Isotopensicht“ kein effektiver Unterschied vorliegt und die Verhältnisse ähnlich sein müssten. Da in Pflanzen das MEP-synthetisierte Phytol jedoch bekanntermaßen um etwa 50 bis 100 ‰ (VSMOW) verglichen mit den Sterolen an Deuterium angereichert ist, muss, falls wirklich, wie hier postuliert, ähnliche Fraktionierungsfaktoren vorliegen, diese Differenz andere Ursachen haben als z.B. Fraktionierung von Wasser, NADPH (mehrere Pools?) und / oder Diskriminierungen bei den organischen Substraten. Aktuelle Isotopenuntersuchungen (2008) an Carotinoiden von Kroll et al. können möglicherweise weiterhelfen: es zeigte sich hierbei, dass die untersuchten Carotinoide (darunter auch eine Probe aus Algen) Wasserstoff-Isotopenverhältnisse von -180 bis -275 ‰ gegen VSMOW aufwiesen. Die Tatsache, dass die Carotinoide ebenfalls dem MEP-Biosyntheseweg entspringen und die beobachteten Verhältnisse im Bereich derer von Sterolen liegen, ergänzen und untermauern also die oben genannten Ergebnisse und Schlussfolgerungen von Sessions et al. (2002); will man vorsichtiger sein, so ist festzustellen, dass die Ergebnisse sich zumindest nicht widersprechen. Zudem wird diese Hypothese durch Folgendes untermauert: Aus den Carotinen können in der Pflanze die aromawirksamen Ionone entstehen; vor kurzem wurden von diesen die Stabilisotopenverhältnisse publiziert (Caja et al., 2007), die sich in Himbeeren im Bereich -176 bis -221‰ (VSMOW) bewegten, also im angegebenen Bereich der Carotine. Hempel et al. konnten 2007 zeigen, dass die Ionone in der Himbeere aus dem MEP-Weg stammen. Zusammenfassend gibt also nach dem derzeitigen Wissensstand begründete Hinweise dafür, dass die Isotopendiskriminierung des neu entdeckten MEP-Stoffwechselweges denen des MVA-Weges stark ähnelt und eventuelle Abweichungen nicht direkt dem IPD zuzuschreiben sind.

Ein interessantes Detail ist sicherlich, dass der Malaria-Parasit *Plasmodium falciparum* und der Tuberkulose-Erreger *Mycobacterium tuberculosis* nur des MEP-Biosynthesewegs befähigt sind, während dem Menschen lediglich über den MVA-Mechanismus eine Isoprenoid-Biosynthese möglich ist (Wanke et al., 2001; Hunter, 2007; Munos et al., 2009); dies könnte ein interessanter Therapieansatz bei der Malariabekämpfung sein.

Sich entwickelnde Chloroplasten sind befähigt, im Plastid die Isoprenoid-Biosynthese mittels MVA-Stoffwechsel durchzuführen; dieses verwirrende Ergebnis und der Nachweis einer Mevalonat-Kinase in diesen Chloroplasten deuten darauf hin, dass die Gene, die die Enzyme

des MVA-Wegs in jungen Chloroplasten kodieren, im Entwicklungsstadium des Plastiden exprimiert werden können (Heintze et al., 1994). Mit dieser Erkenntnis gelangt man zu der noch nicht geklärten Frage, ob dies reifen Plastiden unter gewissen Bedingungen auch gelingen mag. Ferner ist der MEP-Weg noch verantwortlich für die Thiamin- und Pyridoxol-Biosynthese (Lange und Croteau, 1999).

Der Mechanismus der Biosynthese von IPD über den MEP-Weg sei im Folgenden kurz skizziert (vgl. Abb. 2.12) (Eisenreich et al., 1998; Lange und Croteau, 1999; Estevez et al., 2001; Wanke et al., 2001; Hunter, 2007; Lauw et al., 2008; Munos et al., 2009); da aktuellste Erkenntnisse vorliegen (Munos et al., 2009), welche die früher postulierte α -Ketol-Umlagerung obsolet erscheinen lassen, wird diese hier nicht mehr dargestellt, obwohl sie im Schrifttum noch vielfach anzutreffen ist.

Im ersten Schritt erfolgt eine Kondensation von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP); katalysiert wird die Reaktion von der Thiamin-abhängigen 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase **1** (DXS). DOXP wird durch die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase **2** zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) umgewandelt; nach Erkenntnissen von Munos et al. (2009) geschieht dies über eine Retroaldol-Aldol-Umlagerung. MEP reagiert mit Cytidintriphosphat (CTP) anschließend zu 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol (CDP-ME). Die 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-Cytidyltransferase **3** katalysiert diese Umsetzung. Sodann tritt die 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-Kinase **4** in Erscheinung, und es bildet sich 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (CDP-ME-2P), welches im nächsten Schritt über die 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase **5** zu 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat reagiert. Daraus entsteht IPD und möglicherweise direkt DMAPP; die letzten Schritte sind noch nicht im Detail bekannt. Man nimmt an, dass nun in zwei Schritten reduziert und eliminiert wird. Dies geschieht über die Enzyme 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Synthase und die 4-Hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase. Das letztendlich entstehende IPD kann wiederum zu DMAPP isomerisieren und geht, wie das über Mevalonat gebildete IPD, in den weiteren Reaktionsweg ein.

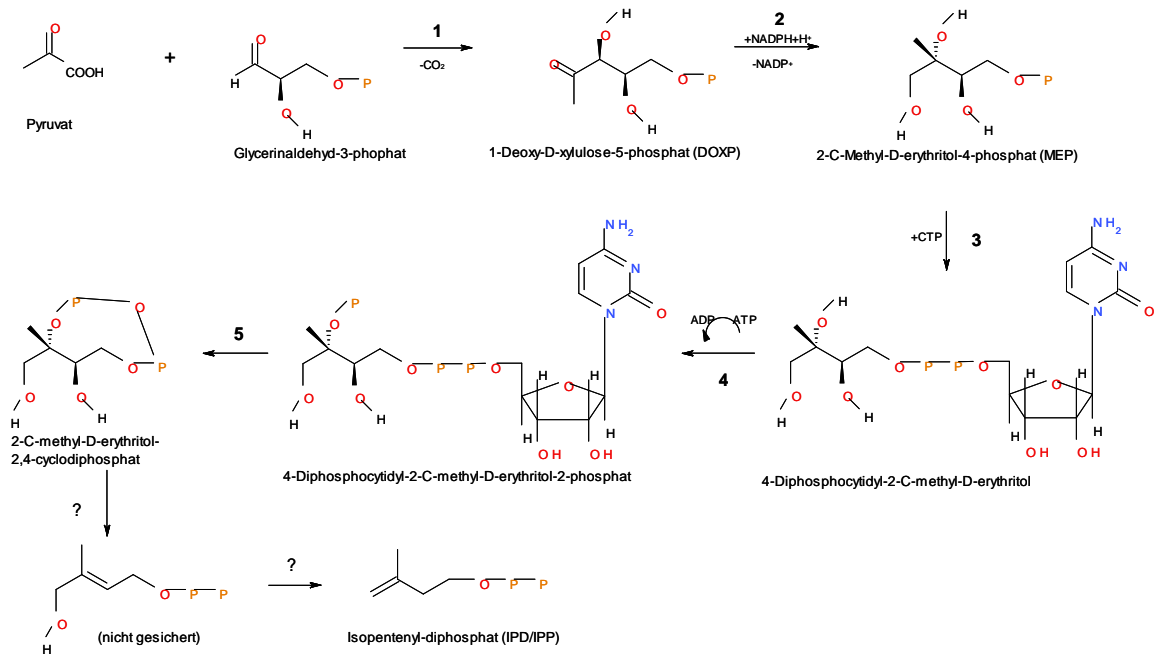


Abb. 2.12: Biosynthese von IPD/IPP via MEP/DOXP-Weg; die fettgedruckten Zahlen beziehen sich auf die Enzyme im Text. (Eisenreich et al., 1998; Lange und Croteau, 1999; Estevez et al., 2001; Wanke et al., 2001; Hunter, 2007; Lauw et al., 2008; Munos et al., 2009)

Im weiteren Verlauf der Biosynthese kommt es zu einer Kopf-Schwanz-Verknüpfung von DMAP und IPD; hierbei soll nach der Abspaltung des Diphosphat-Restes aus DMAP ein Carbokation entstehen, das Prenyl-Kation (Allyl-Carbokation). Dieses reagiert mit der terminalen Doppelbindung des IPD, und es bildet sich nach Protonenabgabe unter Einwirkung der Geranyldiphosphat-Synthase die C_{10} -Verbindung Geranyl-diphosphat. Dieses Enzym ist nur in Chloroplasten aktiv, was die Tatsache stützt, dass die aus Geranyl-diphosphat entstehenden Monoterpene nur dort gebildet werden können. Nun wird ein weiteres Molekül DMAP mit Geranyl-diphosphat Kopf-Schwanz verknüpft und es entsteht Farnesyl-diphosphat. Die Reaktion wird vermutlich durch die Geranylgeranylphosphat-Synthase katalysiert (Hunter, 2007).

Die nachfolgende Reaktion, die durch Kopf-Kopf-Verknüpfung (im Gegensatz zu den vorher vorherrschenden Kopf-Schwanz-Verknüpfungen!) zweier Moleküle Farnesyl-diphosphat (FPP) von statten geht, ist deutlich besser aufgeklärt. Dabei entsteht unter Einfluss der Squalen-Synthase (EC 2.5.1.21) der Kohlenwasserstoff Squalen (vgl. Abb 2.13). Primär entsteht durch Angriff der Doppelbindung am C_{12} des Farnesyl-diphosphats am C_{15} Atom des anderen Moleküls unter Abspaltung des Diphosphat-Restes die Zwischenstufe Präsqalendiphosphat (PSPD); hierbei findet sich in der Mitte des Moleküls ein Cyclopropan-Ring, an dem der Diphosphat-Rest noch gebunden ist (Poulter et al., 1989; Poulter, 1991; Zhang und

Poulter, 1995; Jarstfer et al., 1996; Richter, 1996; Radisky und Poulter, 2000). Durch Reduktion mit NADPH nach Abspaltung von Diphosphat und Umlagerung des Ringes entsteht letztendlich das Squalen. Diese Reaktion wird wieder vom selben Enzym, der Squalen-Synthase, katalysiert (Poulter, 1991; Jarstfer et al., 1996; Richter, 1996; Radisky und Poulter, 2000).

Durch Versuche mit zellfreien Membranpräparaten ist bekannt, dass es sich bei der Squalen-Synthase um ein membrangebundenes Enzym handeln muss (Poulter und Rilling, 1981; Poulter, 1991; Richter, 1996; Radisky und Poulter, 2000). 1988 konnte das Enzym erstmals durch Sasiak und Rilling aus Hefe isoliert werden. Drei Jahre später, 1991, gelang es Jennings et al., das Gen des Enzyms zu identifizieren. Dabei wurde deutlich, dass es weit in das Cytosol hineinragt und nur durch eine kleine transmembrane Helix in der Membran verankert ist. Es gelang daraufhin zwei Gruppen, das Enzym rekombinant in nicht membrangebundener Form herzustellen (Zhang et al., 1993; LoGrasso et al., 1993). Dies ermöglichte das intensive Studium der Wirkungsweise der Squalen-Synthase, obgleich bis heute nicht alle Details geklärt werden konnten. Bemerkenswert an der Squalen-Synthase ist die Tatsache, dass hier ein einzelnes Enzym zwei unterschiedliche Reaktionen katalysiert. Studien deuten darauf hin, dass das PSPP zwischendurch nicht freigesetzt wird –was ja aufgrund des reaktiven Cyclopropanringes möglicherweise Nebenreaktionen zur Folge haben könnte, sondern bereits zu Beginn der Reaktion gleich zwei Moleküle FPP an zwei nicht äquivalente Bindungszentren im Enzym binden; es bildet sich so vermutlich im ersten Schritt ein Komplex aus NADPH, 2 Molekülen FPP und dem Enzym (Mookhtiar et al., 1994; Radisky und Poulter, 2000). Obwohl für den ersten Reaktionsschritt nicht notwendig, scheint die Anwesenheit von NADPH die Synthese von PSPP zu aktivieren (Shechter und Bloch, 1971; Muscio et al., 1974; Agnew und Popjak, 1978; Sasiak und Rilling, 1988; Zhang et al., 1993; Mookhtiar et al., 1994; Radisky und Poulter, 2000). NADPH bindet nachweislich erst nach FPP am Enzym (Radisky und Poulter, 2000). Bei den beiden nicht äquivalenten Bindungsstellen handelt es sich vermutlich um eine Stelle als Prenyl-Donor und eine für den Prenyl-Akzeptor, wobei sich unterschiedliche Affinitäten zeigten, was auf eine Reihenfolge bei der Bindung schließen lassen könnte (Mookhtiar et al., 1994).

Radisky und Poulter (2000) vermuten, dass die Squalen-Synthase nur ein aktives Zentrum besitzt; damit stünde sie im Gegensatz zu anderen bekannten Enzymen, die zwar zwei Reaktionen katalysieren, dafür aber an unterschiedlichen Bindungsstellen (z.B. Tryptophan-Synthase). Letztgenannte Enzyme sind deswegen typischerweise sehr große Proteine oder besitzen mehrere Untereinheiten; die Squalen-Synthase ist jedoch nur ein relativ kleines Monomer (Shechter et al., 1992; Zhang et al., 1993). Eine Diskussion über mögliche Auswirkungen dieses Mechanismus auf die Stabilisotopenverhältnisse des erzeugten Squalens finden sich im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit.

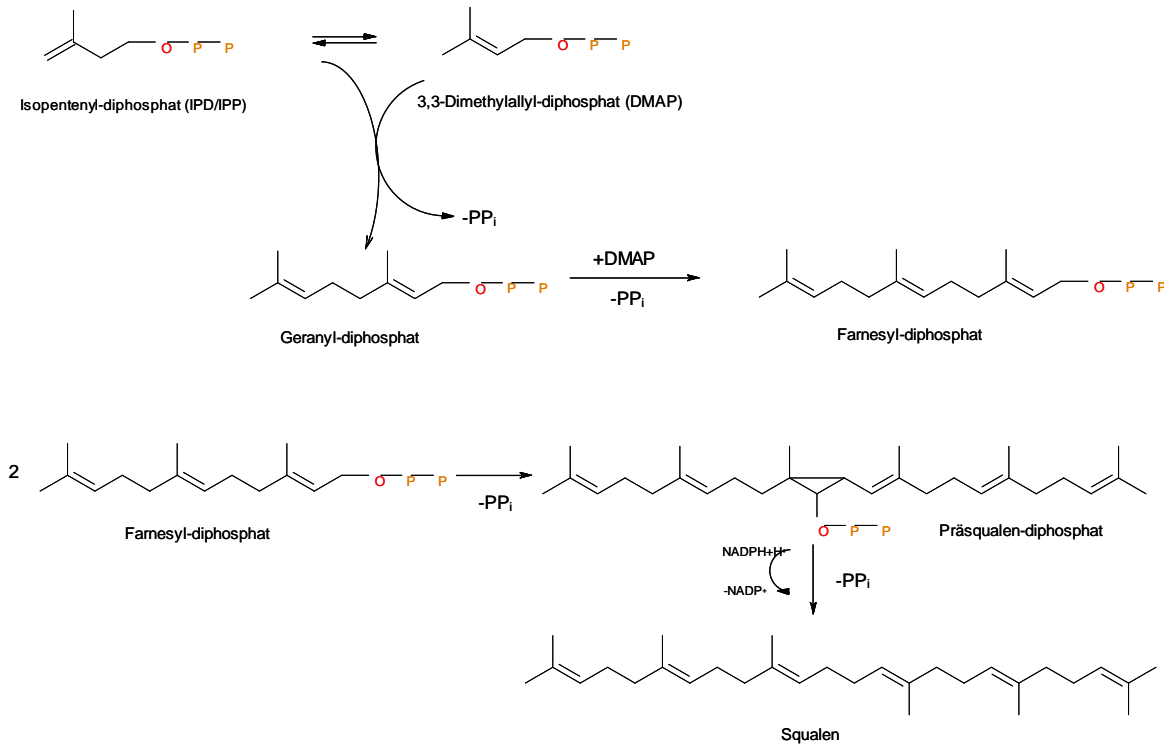


Abb. 2.13: Biosynthese von Squalen ausgehend von IPD/IPP & DMAP. (Richter, 1996; Radisky und Poulter, 2000)

Zum Schluss sei noch angemerkt, dass detaillierte Aussagen über eine Isotopendiskriminierung bei der Isoprenoid-Biosynthese nur äußerst schwer zu treffen sind. Die genauen Diskriminierungsschritte des MEP-Weges sind, wie bereits angesprochen, nicht bekannt. Dennoch kann man für das Endprodukt anhand der erwähnten empirischen Studie an den Carotinen limitierte Aussagen über die effektive Diskriminierung wagen. Jedoch liegt auch bei der augenscheinlich gut erforschten Isoprenbiosynthese vieles im Dunkeln. Affek und Yakir konnten 2003 nachweisen, dass eine direkte Kopplung der Isoprenbiosynthese zur Photosyntheserate nicht gegeben ist; vielmehr erfolgt noch stundenlange Abgabe von Isopren in CO_2 -freier Atmosphäre. Bei Gabe von unterschiedlich stark angereicherter $^{13}CO_2$ fiel eine variable Diskriminierung auf, die stark auf das Vorhandensein einer alternativen Kohlenstoffliefernden Quelle neben der Photosynthese hindeutet. Als Quelle konnte cytosolisches IPP sicher ausgeschlossen werden; diskutiert wird die Rolle von Glucose als Kohlenstoffquelle. Da diese Quelle bis zu ca. 30 % des Kohlenstoffs beitragen kann und der daraus stammende Kohlenstoff relativ stark angereichert (ca. -42 ‰ gegen VPDB, aber stets konstant) ist, ergeben sich hieraus weitere Schwierigkeiten bei der Interpretation der Stabilisotopenverhältnisse der Biosynthese von Isopren und Derivaten, die bei rein empirischer Betrachtung nicht auffallen würden.

2.9.2.5 Tocopherole

Tocopherole sind in 2-Stellung mit einem 4,8,12-Trimethyltridecyl-Rest substituierte Chroman-6-ole (3,4-Dihydro-2H-1-benzopyran-6-ole, *all-R*-Konfiguration), die als Antioxidantien in Fetten und Ölen wirksam sind (vgl. Abb 2.14). Vitamin E-Charakter weisen hierbei α -Tocopherol und im geringeren Umfang β -, γ - und δ -Tocopherol auf; α -, β - und γ -Tocotrienole, die eine ungesättigte Prenyl-Seitenkette besitzen, zeigen diese Wirkung ebenfalls (Syväoja et al., 1986; Römpp online; Aparicio und Aparicio-Ruiz, 2000; Cert et al., 2000; Lercker und Rodriguez-Estrada, 2000).

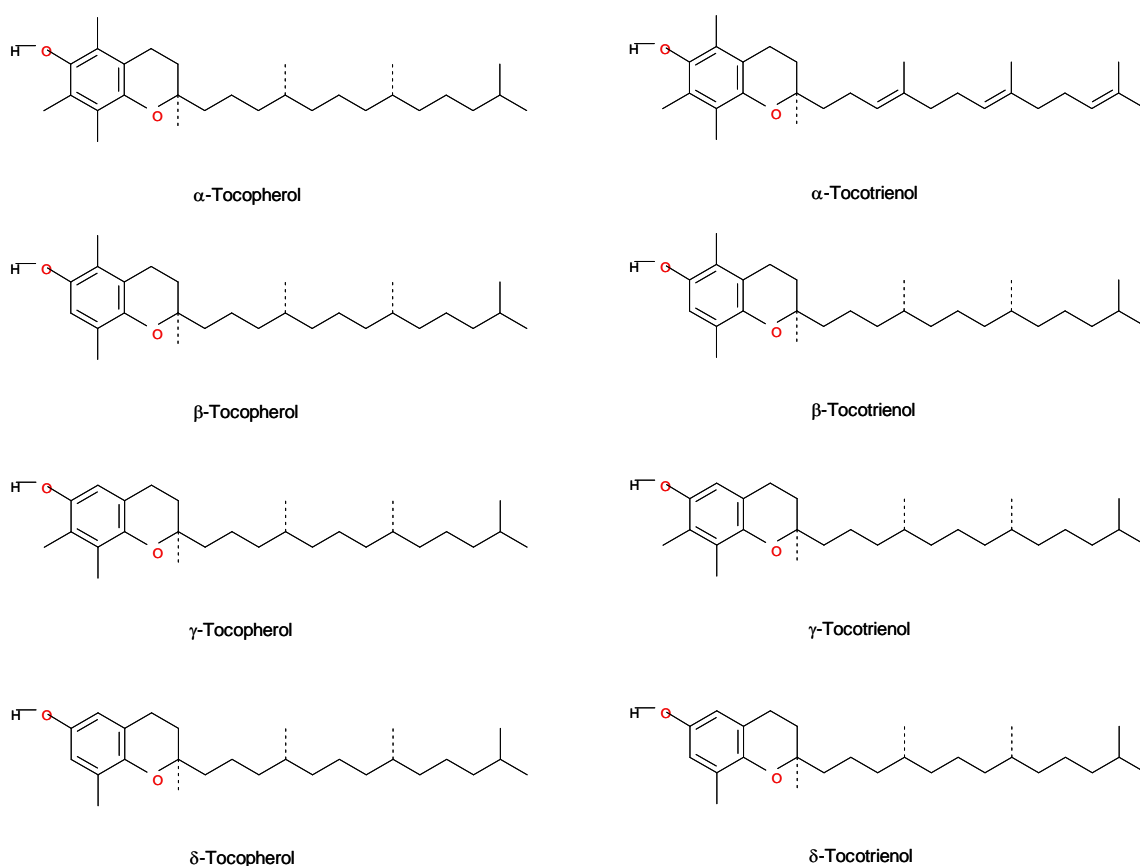


Abb. 2.14: Strukturen wichtiger Tocopherole und Tocotrienole.

Besonders viel Tocopherol enthalten Weizenkeimöl, Palmöl und die Lipidfraktion des echten Orleans, aus dem der Farbstoff Annatto gewonnen wird. Die Gesamtkonzentration der Tocopherole in pflanzlichen Ölen wird mit 70 – 1900 mg/kg angegeben (Syväoja et al., 1986). Im Olivenöl finden sich durchschnittlich 119 mg/kg α -Tocopherol, 1 mg/kg β -Tocopherol, 8 mg/kg γ -Tocopherol sowie Spuren an δ -Tocopherol und 120 mg/kg α -Tocotrienol (Römpp online).

Hohe Tocopherolgehalte im Speiseöl werden aufgrund der Vitamin E-Wirkung im Allgemeinen als positiv für die Gesundheit angesehen. Leider wird ein Teil der Tocopherole bei der Raffination des Öls zerstört und steht somit nicht mehr als Vitamin E zur Verfügung; hinzu kommt ein möglicher Abbau während der Lagerung insbesondere durch Lichteinfluss (Coors und Montag, 1988; Cert et al., 2000).

Der Tocopherolgehalt bei Pflanzenölen schwankt stark, je nachdem aus welcher Saat oder welchem Keimling sie hergestellt wurden; in tierischen Ölen finden sich Tocopherole nur in nicht nennenswerten Mengen. Weizenkeimöl weist etwa 2500mg je kg Tocopherole und Tocotrienole auf (Römpp online). Da jedoch die Vitamin E-Aktivitäten der Tocopherole nicht gleich sind (α -Tocopherol 100 %, β -Tocopherol 15-27 %, γ -Tocopherol 3-20 % und δ -Tocopherol 0,3-2 %) (Rehner und Daniel, 2002), kommt es also besonders auf die genaue Zusammensetzung der Tocopherolfraktion an. Nicht jedes Tocopherol findet sich in jedem Pflanzenöl! Daher erlaubt eine Untersuchung der Tocopherolverteilung in einzelnen Fällen eine Aussage über die Authentizität eines Öles. Zumischungen von Ölen mit anderen Verteilungen lassen sich so möglicherweise erkennen, besonders wenn das außergewöhnlich γ -Tocopherol-reiche Sojaöl dafür Verwendung findet. Bei Olivenöl liegt der Anteil an β -Tocopherol stets über dem von γ -Tocopherol; außerdem enthält es nur Spuren von δ -Tocopherol. Haselnussöle sind aufgrund des sehr ähnlichen Triglyceridmusters potentiell geeignet zum illegalen Verschnitt von Olivenöl. Jedoch wird dabei das Verhältnis von β -Tocopherol zu γ -Tocopherol verändert und zudem enthalten Haselnussöle deutlich höhere Konzentrationen an δ -Tocopherol, das im Olivenöl nur in Spuren vorkommt. Mariani et al. (1999) konnten so Hinweise auf die Verfälschung von Olivenöl mit Haselnussöl finden.

In der Literatur finden sich zahlreiche Methoden zur quantitativen Analyse der Tocopherole. Die Gaschromatographie findet hierbei eher weniger Anwendung, da eine Verseifung des Öles und eine Derivatisierung (Silylierung!) der Tocopherole erfolgen muss, damit diese ausreichenden Dampfdruck aufweisen. Die Detektion kann über FID (Mariani et al., 1991) oder MS (Mariani und Bellan, 1996) erfolgen. Oft wurde vor der Injektion noch dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt (De Greyt et al., 1998). Die Extraktion mittels SPE wurde von Lechner et al. 1999 beschrieben. Eine HPLC-GC-Kopplung zur Analyse nutzten Artho et al. (1993). FID-Detektion und MS-Detektion nach supercritical fluid chromatography (SFC) der Tocopherole beschreiben Snyder et al. (1993) und Turner et al. (2001).

Gängiger ist dagegen die Fluoreszenz-Detektion nach hochdruckflüssigchromatographischer Trennung (HPLC) auf Normalphase. Alternativ kann ein UV-Detektor verwendet werden, mit dem Hauptnachteil der geringeren Empfindlichkeit (Gertz und Herrmann, 1982; Coors und Montag, 1988). Ende der 80er Jahre wurde von der IUPAC und AOCS eine Analysenmethode standardisiert (siehe Literaturverzeichnis unter IUPAC bzw. AOCS). Die Analyse auf einer Umkehrphase ist problematisch, da hier β -Tocopherol und γ -Tocopherol sowie deren

Tocotrienole nicht voneinander getrennt werden können (Zonta und Stancher, 1983; Andrikopoulos et al., 1991; Rovellini et al., 1997). Ein Ausweg soll die Verwendung von Diol-Phasen sein (Balz et al., 1992). Die Detektion mittels ELSD oder amperometrisch hat sich als wenig geeignet erwiesen (Chase et al., 1994; Dionisi et al., 1995).

Damit auch möglichst viel wertvolles Tocopherol beim Konsumenten ankommt, sollten Öle stets dunkel und auch nicht im diffusen Licht gelagert werden. Wird dies nicht beachtet, so sollen bereits nach 4 Monaten Verluste an α -Tocopherol in Höhe von 79% auftreten (Okogeri und Tasioula-Margari, 2002).

2.9.2.6 Wachse

Wie bei vielen anderen Pflanzen, findet sich auch bei den Oliven eine auf der Außenseite der Epidermis liegende Wachsschicht. Damit soll die Olive vor Wasserverlust und Befall von Mikroorganismen geschützt und die mechanische Festigkeit der Epidermis verstärkt werden. Eine Schutzwirkung vor Luftschadstoffen wie Ozon, Schwefeldioxid und Stickoxide soll ebenfalls durch die Wachse gegeben sein (Richter, 1996). Möglicherweise kann die Reflexionswirkung der Wachse, die UV-B-Strahlung kaum zu absorbieren vermögen, auch zum Schutz der Pflanze beitragen. Berichtet wurde von einer Induktion der Wachsbiosynthese durch erhöhte UV-B-Strahlung (Bornman und Teramura, 1993).

Nach der Definition der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) ist der Begriff Wachse eine Sammelbezeichnung für Ester langkettiger Fettsäuren (C_{24} – C_{36}) (Wachssäuren) mit langkettigen Alkoholen (C_{15} – C_{36}). Im Oliventresteröl dominieren vor allem C_{40} -, C_{42} -, C_{44} - und C_{46} -Wachse mit unverzweigten aliphatischen Alkoholen; von diesen Wachsen hat man im nativen Öl nur relativ geringe Konzentrationen gefunden. (Cert et al., 2000).

Bei der Ölgewinnung gehen die Wachse der Olive zum Teil in das Öl über und können bei niedrigen Temperaturen eine Trübung verursachen, die von Konsumentenseite gelegentlich fälschlicherweise als Verderb interpretiert wird. Daher wird oftmals eine Entfernung der Wachse durchgeführt, die sogenannte Winterisierung; dabei handelt es sich schlicht um ein Abfiltrieren der ausgefallenen Wachse bei niedrigen Temperaturen. Da bei lösemittel-extrahierten Ölen (sog. Tresterölen) die lipophilen Wachse durch das Lösungsmittel ebenfalls gut gelöst werden, enthalten so hergestellte Öle -verglichen mit nativen Ölen- relativ viel Wachs. Diese Tatsache nutzt die VO (EWG) Nr. 2568/91: liegt der Wachsgehalt bei über 250 ppm, so fällt das Öl nicht mehr in die Kategorien nativ oder extra nativ. Leider hinterlässt eine partielle Winterisierung, die den Wachsgehalt unter den Schwellenwert senken kann, keine Spuren, so dass eine sorgfältig bereitete Fälschung hieran nicht zu erkennen wäre. Es wurde be-

richtet, dass Wachse auch während der Lagerung aus freien Fettsäuren und langkettigen Alkoholen gebildet werden können (Fiebig, 2009); dabei soll sich der Gesamtgehalt an Wachsen und veresterten Sterolen binnen 18 Monaten sogar verdoppeln können (Mariani und Venturini, 1996).

Die Analyse der Wachse gelingt nach Extraktion und Vortrennung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Mariani und Fedeli, 1986; Mariani et al., 1987; Mariani und Fedeli, 1989) oder an mit Silbernitrat imprägniertem Kieselgel (Henon, 1986; Kiosseoglou und Boskou, 1990). Die Extraktion mittels SPE wurde von Reiter et al. (1999) und Nota et al. (1999) beschrieben. Auch mit superkritischem Kohlenstoffdioxid wurde eine erfolgreiche Extraktion beschrieben (Garcia et al., 1996). Die nachfolgende Analyse kann mittels NP-HPLC (Amelio et al., 1993; Amelio et al., 1998) oder mit HRGC-FID oder MS erfolgen (Mariani et al., 1987; Amelio et al., 1993; Nota et al., 1999; Reiter et al., 1999). Auch die Verwendung der Kopplung HPLC-GC zur Extraktion und Analyse ist in der Literatur beschrieben (Grob et al., 1989).

2.9.2.7 Pigmente

Die wichtigsten im Olivenöl enthaltenen Pigmente sind Chlorophylle und Carotinoide. Letztere gliedern sich noch in die Carotine (reine Kohlenwasserstoffe, Tetraterpene) und Xanthophylle (mit Sauerstoff im Molekül).

Die wichtigsten Carotinoide des Olivenöls sind β -Carotin und Lutein (Cert et al., 2000); ihre Strukturen sind der Abb. 2.15 zu entnehmen. Im Zusammenspiel mit dem grünen Chlorophyll entsteht so die typisch grünlich-gelbe Farbe bei unraffinierten Olivenölen. Es ist naturgegeben, dass die Farbe nie gleich ausfällt, und von blass bis intensiv grün alle Zwischentöne, unabhängig von der Ölqualität, auftreten. Um bei sensorischen Prüfungen die Tester nicht zu beeinflussen, erfolgt die Verwendung von blauen Gläsern, die die Farbe überdecken. Olivensorte, Reife und Umwelteinflüsse entscheiden über die genaue Farbgebung (Cert et al., 2000; Moreda et al., 2001).

Die Carotinoide und Chlorophylle geben dem Öl nicht nur eine angenehme Farbe, sondern haben auch anderweitig Bedeutung: Chlorophylle sollen als Quencher Singulett-Sauerstoff, der durch Chlorophyll-induzierte Photooxidation (Typ-2 Photooxygenierung) entstehen kann, abfangen und so einen Beitrag zur Lagerstabilität der Öle leisten (Rahmani und Saad, 1989; Rahmani und Saari-Csallany, 1991; Gutierrez-Rosales et al., 1992; Belitz et al., 2001, S.190).

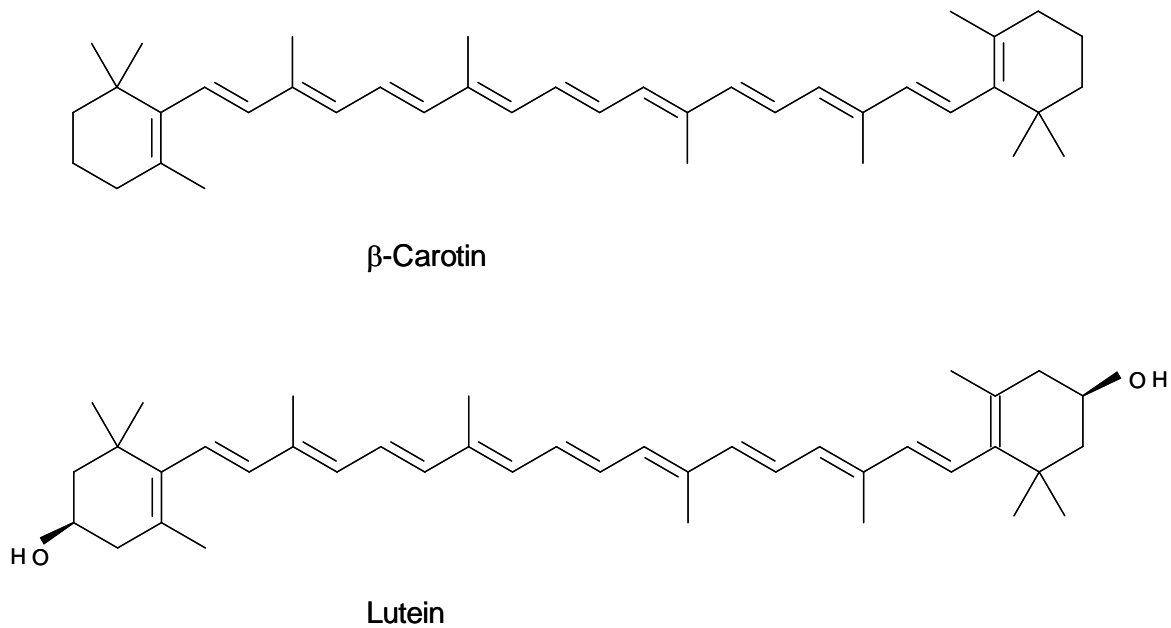


Abb. 2.15: Hauptcarotinoide im Olivenöl.

Üblicherweise erfolgt die Analyse der Carotinoide nach kalter Verseifung; höhere Temperaturen zerstören die empfindlichen Verbindungen (Lercker und Rodriguez-Estrada, 2000; Morada et al., 2001; Kroll et al., 2008). Die Verseifung beeinträchtigt die Carotinoide nicht (Morada et al., 2001; Kroll et al., 2008). Nachfolgend kann mittels RP-HPLC (Zonta und Stancher et al., 1987; Kroll et al., 2008) oder NP-HPLC (Rahmani und Saari-Csallany, 1991; Psomiadou und Tsimidou 1998) aufgetrennt werden. Die Detektion erfolgt typischerweise mit einem UV-Detektor. Oft gelingt eine Trennung aller Carotinoide in einem Lauf nicht in ausreichendem Maß, besonders problematisch ist die Trennung von α - und β -Carotin. Eine gute, aber selten genutzte Möglichkeit ist die Verwendung von C_{30} -Umkehrphasen, die überraschenderweise vorwiegend nach geometrischer Form des Carotinoids trennen (Kroll et al., 2008). Über eine C_{18} -SPE-basierte Extraktion und flüssigchromatographische Analyse berichteten Minguez-Mosquera et al. (1992).

Für die Analyse der Chlorophylle existiert eine von der IUPAC standardisierte spektralphotometrische Methode (Pokorny et al. 1995). Alternativ kommen NP- oder RP-HPLC/UV-Methoden zum Einsatz (Rahmani und Saari-Csallany, 1985; Psomiadou und Tsimidou, 1998).

Auf den ersten Blick wirkt das Vorkommen der Chlorophylle im Olivenöl trivial. Dass dem keineswegs so ist, zeigen die von C. Gertz, Untersuchungsamt Hagen, seit 2005 angewandten Methoden zum Nachweis einer Hitzebehandlung des Olivenöls (Raffination!). Durch Bildung von Chlorophyllabbauprodukten, die bereits unter relativ geringem Temperatureinfluss

entstehen, soll eine Hitzebehandlung des Öls, v.a. eine schonende Desodorierung erkennbar sein. Die Tatsache der Entstehung ist bereits seit langem bekannt; so berichtete Aitzetmüller bereits 1989 von Chlorophyllabbauprodukten in pflanzlichen Ölen (vgl. Abb. 2.16).

Er stellte bei der Untersuchung von industriell raffinierten Rapsölen mittels HPLC-Fluoreszenzdetektor fest, dass diese kaum noch intaktes Chlorophyll a oder b enthielten. Stattdessen rührte die grünliche Farbe wohl von den Phäophytinen.

Diese entstehen aus den Chlorophyllen durch Verlust des zentralen Magnesium-Ions bei einer leichten Einwirkung von Säure (freie Fettsäuren im Öl!). Das folgende Auftreten von Abbauprodukten der Phäophytine wurde dort nicht weiter untersucht; nach Abspaltung des Phytin-Restes entstehen die Phäophorbide. Nach Verseifung entsteht aus den Phäophorbiden freie Porphyrindicarbonsäure, die nach weiterem Abbau eine der Etioporphyrine ähnelnde Struktur aufweisen soll (Roempp online).

Für das Auftreten weiterer Abbauprodukte, deren Struktur nicht klar ist, könnte die Beobachtung von Aitzetmüller sprechen, nach der beim Bleichen chlorophyllhaltiger Öle die Fluoreszenz erlosch. Man muss also die vorausgegangene Schilderung, dass neben den Carotinoiden die Chlorophylle verantwortlich für die Färbung des Öles sind, dahingehend erweitern, dass man Chlorophyll-Abbauprodukte mit einschließt.

Nachteilig ist hingegen, dass Chlorophyll und seine Abbauprodukte die oxidative Stabilität von Ölen beeinträchtigen können (Aitzetmüller, 1989; Belitz et al., 2001, S.190)

Neben den Phäophytinen sind bei thermischer Behandlung eines Öles oder bei Gemüse (Blanchieren!) die Epimere (am C₁₀) Chlorophyll a' und b', die aus den Chlorophyllen a und b entstehen, zu finden (Strain, 1958; Strain und Svec, 1966; Scholz und Ballschmiter, 1981; Aitzetmüller, 1989).

Daraus können bei Säureeinwirkung die Phäophytine a' und b' entstehen, analog kommt es zur Bildung von a und b. Längeres Erhitzen auf höhere Temperaturen (gesichert ist die Bildung ab 100°C) führt zu den entsprechenden Pyro-Verbindungen (Decarboxylierungsreaktion!) Pyrochlorophyll a/b und Pyrophäophytin a/b; die a'- und b'-Verbindungen entfallen, da die Möglichkeit der Isomerisierung am C₁₀ entfällt (Pennington et al., 1964; Strain und Svec, 1966; Aitzetmüller, 1989).



Chlorophyll a	R ₁ = CH ₃	R ₂ = COOCH ₃	R ₃ = H	Phäophytin a	R ₁ = CH ₃	R ₂ = COOCH ₃	R ₃ = H
Chlorophyll a'	CH ₃	H	COOCH ₃	Phäophytin a'	CH ₃	H	COOCH ₃
Chlorophyll b	CHO	COOCH ₃	H	Phäophytin b	CHO	COOCH ₃	H
Chlorophyll b'	CHO	H	COOCH ₃	Phäophytin b'	CHO	H	COOCH ₃
R ₄ =Phytol				Pyrophäophytin a	CH ₃	H	H
				Pyrophäophytin b	CHO	H	H

Abb. 2.16: Struktur von Chlorophyllen, Phäophytinen und Pyrophäophytinen, nach: Aitzetmüller, 1989.

Somit wäre die Quantifizierung von Chlorophyllen, Phäophytinen und Pyrophäophytinen eine Möglichkeit zur Kontrolle auf Hitzebehandlung bei Pflanzenölen. Serani und Piacenti konnten 2001(a) zeigen, dass bei einer Hitzebehandlung der Gehalt an Pyrophäophytin a weitaus höher ansteigt, als der absolute Gehalt an Phäophytin a erwarten lässt. Pyrophäophytin entsteht demnach in geringen Mengen auch bei der Lagerung eines Öles bei Raumtemperatur. Eine lineare Korrelation der Verbindungen untereinander hat man bei nicht-behandelten Ölen verschiedener Herkunft nachgewiesen. Dieses Verhältnis wird durch Hitzebehandlung verändert. Die Bestimmungen erfolgten über Hochdruck-Flüssigchromatographie an einer Umkehrphase mit UV-Detektion nach vorausgegangener Abtrennung mittels Silicagel-SPE. Die Menge an Pyrophäophytin a lag bei den unbehandelten Ölen zwischen 0,1 und 3 ppm, während der Totalgehalt an Phäophytin zwischen 0,5 und 35 ppm schwankte, jedoch war ein hoher Gehalt an Pyrophäophytin a stets mit einem hohen Gehalt an Phäophytin verbunden. Der absolute Gehalt an Pyrophäophytin a bei den vermutlich hitzebehandelten Ölen war zwar nicht unbedingt höher, doch lag die Konzentration an Phäophytin deutlich darunter. Mittels einer einfachen mathematischen Operation lassen sich die absoluten Verhältnisse ausgleichen, und man erhält einen numerischen Wert, den sogenannten Cold-Index, der umso höher liegt, je mehr vom natürlichen Verhältnis Phäophytin zu Pyrophäophytin abgewichen wird; bei nicht behandelten Ölen liegt dieser nahe bei Null.

Da die Methode (noch) nicht zu den Analyseverfahren der VO (EWG) Nr. 2586/91 gehört, ist eine Anwendung aus rechtlicher Sicht, problematisch. Eine Beanstandung von Amts wegen allein aufgrund des Cold-Index steht auf unsicherem Boden. Daher wurde bisher bei entsprechend hohen Cold-Indices eine Beanstandung über die mangelnde Rückverfolgbarkeit versucht. Es ist wahrscheinlich, dass es daher langfristig zu einer rechtlichen Klärung vor Gericht kommen wird.

Einen anderen Weg beschritten 2008 Cerretani und Mitarbeiter. Sie zeigten, dass es bei den von ihnen untersuchten sechs italienischen Olivenölen, die jeweils aus nur einer einzelnen Olivensorte bestanden, quantitative Unterschiede in der Pigmentzusammensetzung (Chlorophylle und Carotinoid-Fraktion) gab. Durch die Anwendung statistischer Methoden (Hauptkomponentenanalyse, principal compound analysis Abk. PCA) wurde eine Zuordnung zur Sorte möglich. Das überraschende Ergebnis muss jedoch aus verschiedenen Gründen relativiert werden. Es wurde versäumt, Oliven mehrerer Jahrgänge zu untersuchen; somit handelt es sich um eine Momentaufnahme. Zudem wurde nicht berücksichtigt, dass sich –wie oben erwähnt- während der Lagerung die Chlorophylle abbauen. Damit wären die Verhältnisse verändert, und die Sicherheit der Methode kann nicht mehr garantiert werden. Eine nachträgliche Zuordnung und die Identifikation bei genauer Kenntnis der Sorten sind nicht unbedingt aussagekräftig. Blindtests mit einer hohen Probenanzahl müssten durchgeführt werden, um das Ergebnis zu bestätigen. Hauptkritikpunkt ist aber, dass sortenreine Olivenöle mengenmäßig (ganz im Gegensatz zu z.B. Single Malt Whiskeys) im Handel praktisch keine Rolle spielen. Mischungen verschiedener Olivensorten lassen sich mit dieser Methode wohl nicht mit der erforderlichen Zuverlässigkeit untersuchen.

2.9.2.8 Diacylglyceride

Durch nicht vollendete Biosynthese und Triacylglycerid-Hydrolyse bei der Extraktion kommen im Olivenöl natürlicherweise etwa 1 bis 3 Gew.-% Diacylglyceride (DG) vor (Kitchcock und Nichols, 1971; Perez-Camino et al., 2001); in Einzelfällen hat man bis zu 8% gefunden (Harwood und Sanchez, 2000). Die stabileren 1,3-DG machen hierbei initial nur einen geringen Teil aus; stattdessen dominieren die weniger stabilen, aus unvollständiger Biosynthese stammenden 1,2-DG, die etwa um den Faktor 8-16 häufiger vorkommen als die 1,3-DG. Spyros et al. fanden bei der exemplarischen Untersuchung von fünf griechischen Ölen absolute Gehalte an DG von 16 – 29 g/kg Öl. Dabei kamen die 1,3-DG initial in Konzentrationen von 1,0 – 3,6 g/kg Öl vor, die 1,2-DG zu 14,5 – 25,7 g je kg Öl (Spyros et al., 2004).

Aus früheren Veröffentlichungen ist bekannt, dass bei der Lagerung von Ölen Isomerisierungen der 1,2-DG zu den stabileren 1,3-DG und Hydrolyse der Triacylglyceride (TG) auftreten

(Amelotti et al., 1989; Sacchi et al., 1991; Catalano et al., 1994; Perez-Camino et al., 2001). Bei der Raffination sollen keine neuen DG erzeugt werden (Cert et al., 2000), jedoch verschiebt sich bei einer Neutralisation das stöchiometrische Verhältnis von DG und freien Fettsäuren (FFA) (Aparicio und Aparicio-Ruiz, 2000). Bis zu einem FFA-Anteil von 0,4 % finden sich entsprechende Mengen DG (1 Molekül DG zu 1 Molekül FFA), wohingegen bei FFA-Gehalten über 0,4% der theoretische Maximalwert nicht erreicht wird (Perez-Camino et al., 2001). Dadurch scheint eine Bestimmung der DG im Vergleich zu den FFA doch nicht geeignet, eine Neutralisation nachzuweisen. Somit eignet sich die Bestimmung der DG prinzipiell zur Klärung der Frage, ob es sich um ein frisch gewonnenes Öl, oder aber um ein qualitativ weniger hochwertiges, altes Öl handelt. Eine über semiquantitative Angaben hinausgehende, genaue Datierung des Öles dürfte sich als äußerst schwierig erweisen, da zu viele Faktoren die Kinetik der Isomerisierung beeinflussen. So bewiesen Perez-Camino et al. (2001), dass der Gehalt an freien Fettsäuren und die Temperatur einen gewissen Einfluss auf die Isomerisierungsgeschwindigkeit haben. Dies konnte 2001 (b) von Serani et al. und 2004 von Spyros et al. bestätigt werden. Hierzu kommen noch der Einfluss des Lichtes und die Hydrolyse der TG, die dann durch den Gehalt an FFA auch die DG-Isomerisierung (in Richtung 1,3-DG) beschleunigen. Um diese Problematik zu klären, untersuchten Spyros et al. (2004) fünf griechische Olivenöle mit jeweils unterschiedlichen FFA-Anfangsgehalten (0,2 % - 0,8 %); die quantitativen Analysen erfolgten nach Derivatisierung mittels ^{31}P -NMR Spektroskopie; die Methode wurde bereits früher in der Literatur beschrieben (Spyros und Dais, 2000; Christoforidou et al., 2001; Fronimaki et al., 2002; Vigli et al., 2003). Die Ergebnisse lauten zusammengefasst wie folgt: Mit zunehmender Lagerung nimmt die Konzentration der 1,2-DG zu Gunsten der 1,3-DG ab; hierbei wurde Temperaturabhängigkeit beobachtet. Bei kalt gelagerten Ölen (5°C) blieb der Gehalt an DG insgesamt und an FFA auch nach 18 Monaten praktisch konstant. Bei denselben Ölen trat bei deren Lagerung bei Raumtemperatur im Dunkeln jedoch eine linear mit der Zeit fortschreitende Erhöhung der Gehalte an DG total und FFA ein; bei höheren Temperaturen scheint also die TG-Hydrolyse eine Schlüsselrolle zu spielen. Betrachtet man dieselben Öle bei Raumtemperatur unter Lichteinfluss gelagert, so treten auch hier im Lauf der Zeit höhere Gehalte an FFA und DG auf, jedoch um den Faktor 2 bis 3 höher als bei den dunkel gelagerten Proben. Die gelagerten Öle wiesen, obwohl der DG-Gehalt insgesamt annähernd konstant blieb, dennoch die 1,2 \rightarrow 1,3-Isomerisierungen auf. Generell war zu beobachten, dass der Anstieg der DG total und die Isomerisierung umso schneller voranschritten, je mehr FFA initial im Öl vorhanden waren; bei einem FFA-Gehalt von ca. 0,1 % konnten Perez-Camino et al. (2001) zwar nur eine sehr geringe Neubildung von DG total beobachten, gleichwohl verschob sich das 1,2/1,3-Verhältnis erkennbar. Glycerin konnte in keinem dieser Öle nachgewiesen werden; Monoacylglyceride (MG) wurden nur in geringen Mengen bis maximal 1,8 g/kg Öl in einer einzigen Probe (die zudem den höchst-

ten Gehalt an FFA initial aufwies) nach langer Lagerzeit detektiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass unter normalen Bedingungen MG und Glycerin praktisch keine Rolle spielen, da ihre Bildung zu langsam abläuft. Bei der Bildung der DG aus TG-Hydrolyse sei noch angemerkt, dass 1,2-DG statistisch doppelt so häufig entstehen wie die 1,3-DG. Außerdem haben die DG keinen direkten Effekt auf die Sensorik.

Für die Qualitätsbewertung von nativen Ölen besonders interessant ist die von Serani et al. (2001b) gemachte Beobachtung, dass nach –nicht erlaubter- Neutralisation von Olivenölen die Isomerisierung der DG besonders schnell voranschreitet. Eine HRGC-FID-Methode zur Analyse der DG nach Silylierung lieferten Serani et al. (2001c).

2.10 Stabilisotopenmassenspektrometrie von Olivenöl

Es gibt vergleichsweise wenige Arbeiten über die Anwendung stabilisotopenmassen-spektrometrischer Techniken zur Erkennung von verfälschtem Olivenöl, und derzeit existiert keine zuverlässige Methode zur Beschreibung der geographischen Herkunft eines Olivenöles oder zur Authentizitätskontrolle. Erschwerend kommt hinzu, dass mit Ausnahme von Mais alle wichtigen ölliefernden Pflanzen C₃-Pflanzen sind und so Unterschiede in der Kohlenstoff-Isotopenzusammensetzung a priori vergleichsweise gering sind.

Erstmals befassten sich Bianchi, Angerosa et al. im Jahr 1993 mit diesem Thema; untersucht wurden selbst hergestellte, „extra native“ sortenreine Olivenöle aus 4 verschiedenen Olivensorten, die zu je 6 unterschiedlichen Reifestadien (Oktober bis Januar) geerntet wurden. Zur Kategorisierung der Reife steht der so genannte Jaèn-Index zur Verfügung. Gemessen wurden das Kohlenstoff-Isotopenverhältnis des kompletten Öles sowie des Glycerins, der Sterole und der enthaltenen Alkohole. Die Fraktionen des Unverseifbaren wurden nach den Methoden in der VO (EWG) Nr. 2568/91 abgetrennt (Präparative Dünnschichtchromatographie nach Verseifung des Öles); wie Angerosa et al. 1993 (mit Co-Autor Bianchi) und 1997 (b) berichteten, werden hierbei keineswegs reine Fraktionen erhalten; zumindest die so genannte Alkohol-Fraktion im Sinne der VO (EWG) Nr. 2568/91 besteht nur zu etwa 50% aus Alkoholen (Angerosa et al., 1997b). Daher kann man das Vorgehen nur als eine Art standardisierte Probenvorbereitung verstehen und nicht geeignet als absolute Isotopenverhältnismessung der gesamten Sterole oder Alkohole. Bianchi, Angerosa et al. gaben in der Studie von 1993 an, dass der Reifegrad der Oliven und der Erntezeitpunkt keinen Einfluss auf die Kohlenstoffisotopenverhältnisse der o.g. Verbindungsklassen und des Gesamtöles haben; die gemessenen Werte lagen im Erwartungsbereich für C₃-Pflanzen und bewegten sich im Bereich von -25 bis -29 ‰ gegen VPDB. Eine Korrelation der Werte mit der Olivensorte konnte statistisch nicht gesichert werden. Es war zu beobachten, dass -verglichen mit dem Gesamtöl- die Sterolfraction leicht angereichert und Glycerin hingegen leicht abgereichert an ¹³C war. Eine Identifizierung von gefälschten Ölen oder falsch deklariertes Herkunft konnte mit dieser Methode nicht erbracht werden.

Im Jahr 1997 veröffentlichten Angerosa et al. (b) einen Bericht über die Anwendung von Kohlenstoff-Isotopenverhältnismessungen zur Identifizierung von Olivenölen, die mit Oliventresteröl gestreckt waren; nach den Experimenten der Autoren mit derart manipulierten Ölen könne man dadurch Verfälschungen ab 5% Beimischung entdecken. Die VO Nr. (EWG) 2568/91 sieht hierfür u.a. die Bestimmung der Triterpentialkohole Uvaol und Erythrodiol vor. Diese Methode ist nach Ansicht der Autoren nicht zuverlässig, da spezielle Raffinationsbehandlungen die im Tresteröl erhöhten Gehalte dieser Verbindungen auf unverdächtige Konzentrationen senken können. Daher wurden von den Autoren in weiteren Experimenten das

Gesamtöl, die Sterolfraction sowie die Fraction der aliphatischen Alkohole -wie bereits bei Bianchi et al. 1993 beschrieben- auf ihre Kohlenstoffisotopenverhältnisse hin untersucht; neu war hierbei die Einbeziehung raffinierter Öle und Tresteröle. Zwischen „nativem Olivenöl“ und raffiniertem Olivenöl ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Kohlenstoff-Isotopenverhältnis feststellen, jedoch ergaben sich bei Tresteröl -gegenüber „nativem“ und raffiniertem Olivenöl- leicht abgereicherte Werte bei die Fraction der aliphatischen Alkohole. Deutlich wurde dies, indem man vom δ -Isotopenwert der Alkoholfraction den δ -Isotopenwert des Gesamtöls arithmetisch abzog: für native und raffinierte Öle ergab dies einen leicht positiven, für Tresteröl einen negativen Wert.

Dieses auf den ersten Blick erfreuliche Ergebnis muss jedoch schnell relativiert werden: Da es sich bei den isolierten Fractionen, wie bereits beschrieben, um nicht reine Fractionen handelt und sich in extrahierten Ölen andere Gehalte an aliphatischen Alkoholen als in „nativem“ Ölen finden, ist die Methode eher als exemplarisch zu betrachten.

Im Jahr 1999 versuchten Angerosa et al. (b) anhand der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse und der Sauerstoff-Isotopenverhältnisse des Gesamtöls, der Sterolfraction sowie der Fraction der aliphatischen Alkohole die geographische Herkunft verschiedener Olivenöle abzusichern; dies ist die erste Studie, in der systematisch Sauerstoff-Isotopenverhältnisse von Olivenölen bestimmt wurden. 41 italienische Olivenöle und 42 Olivenöle aus dem Mittelmeerraum wurden hierzu untersucht. Es gelang nur für das Gesamtöl Sauerstoff-Isotopenverhältnisse zu ermitteln; dies ist nach Meinung der Autoren durch den geringen Sauerstoffgehalt der Alkohol- und Sterolfraction bedingt. Bemerkenswert ist die relativ große Streubreite der Kohlenstoff-Isotopenwerte italienischer Öle; diese Tatsache konnte auch von uns in vorliegender Arbeit für eine hohe Anzahl Proben unterschiedlicher Jahrgänge bestätigt werden. In den graphischen Darstellungen der ermittelten Isotopenverhältnisse ließen sich Clusterbildungen erahnen, jedoch gab es starke Überschneidungen.

Leider konnte in Angerosas Studie (1999b) keine Zuordnung nach Ländern aus politischer Sicht getroffen werden, jedoch sind grobe Informationen über das Klima des Herkunftsortes erhalten worden; so fanden sich –in Übereinstimmung mit den Modellen der Isotopen-diskriminierung und daher wenig überraschend- in Ölen heißer und trockener Anbauggebiete tendenziell höhere Gehalte am schwereren Isotop ^{18}O . Die gemessenen Werte sollten nach Meinung Angerosas in Studien an späteren Jahrgängen abgesichert werden, was aber offensichtlich ausgeblieben ist. Dies führt zur Problematik des Einflusses wechselnder klimatischer Faktoren am selben Standort.

Einen anderen Ansatz verfolgten Spangenberg und Mitarbeiter mit ihrer 1998 veröffentlichten Studie: Darin untersuchten sie 27 „extra native“ Olivenöle aus 4 Ländern und verglichen die-

se mit einigen raffinierten Ölen und Tresterölen. Problematisch hierbei ist, dass es sich bei den meisten verwendeten „nativen“ Ölen um Supermarktware handelte und aufgrund des generell hohen Verfälschungspotentials bei Olivenölen an deren Authentizität berechnigte Zweifel bleiben. In der genannten Studie wurden die Öle recht „unsanft“ behandelt: nach 3 Stunden Verseifung bei 70°C und Isolierung der Fettsäuren wurde eine Methylierung mit BF₃ in Methanol durchgeführt. Anschließend wurden die Fettsäuremethylester (FSME) mit Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) getrennt und vermessen, um Informationen über die quantitative Verteilung der Fettsäuren zu erhalten; die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse der Methylester der Ölsäure und der Palmitinsäure wurden mit Kapillargaschromatographie-Combustion-Isotopenmassenspektrometrie (HRGC-C-IRMS) bestimmt. Bei dieser wenig schonenden Behandlung ist kritisch anzumerken, dass durch das lange Erhitzen des Öles und bei der Verseifung prinzipiell Informationen verändert oder verloren gehen können. Gerade wenn man nachweisen will, dass das Öl kaltgepresst ist (d.h. die Temperatur bei der Ölgewinnung nach EU Recht nicht über 27°C lag), ist es aus grundsätzlichen Erwägungen unvorteilhaft, jede Ölprobe (egal ob nativ oder raffiniert) zu erhitzen. Zudem finden bei der alkalischen Verseifung der Öle Austauschreaktionen statt, die die ursprünglich vorhandenen Sauerstoff-Isotopenverhältnisse verfälschen können (nucleophiler Angriff des Hydroxid-Ions am Carboxyl-Kohlenstoffatom bei der Hydrolyse!). Das Resultat enthüllt weitere Schwachstellen in der Probenaufarbeitung: Die der obenstehenden Probenzubereitung unterzogenen Öle enthielten Anteile von bis zu 5% Elaidinsäure (trans 18:1), die in natürlichen Ölen nicht vorkommt. Dies ist wohl die unmittelbare Folge der langen Erhitzung und kann (als nicht vollständige Umsetzung) die gemessenen Isotopenverhältnisse beeinflussen. Eine eindeutige Identifikation von Qualitätsölen durch die Bestimmung der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse der Fettsäuremethylester (FSME) (Ölsäure und Palmitinsäure) und der des Gesamtöls gelang nicht; daher wurde neben diesen Werten noch die Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren berücksichtigt und mittels Principal Compound Analysis, einem statistischen Verfahren, ausgewertet. Eine Clusterbildung war dabei nicht zu erkennen.

Im Jahr 2001 untersuchten Spangenberg et al. nach ihrer eben genannten Methode noch weitere Olivenöle verschiedener Länder und sonstige Pflanzenöle. Interessant war hierbei, dass zwei Olivenöle, die sich nur im Jahrgang unterschieden (bei sonst gleicher Sorte und Gewinnung) einen Unterschied von 4‰ (sic!) beim Kohlenstoff-Isotopenverhältnis derselben Verbindung zeigten. Eine derart große Abweichung ist in der Theorie nicht einfach zu erklären. Sollten diese Abweichungen wirklich naturgegeben sein, so müsste die Einbeziehung der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse bei der Herkunfts- und Authentizitätsbewertung grundsätzlich in Frage gestellt werden.

Spangenberg et al. postulieren in beiden Studien, dass zwischen Palmitinsäure und Ölsäure aufgrund der Biosynthese (Elongation und Desaturierung) nur ein geringer Unterschied bei den Kohlenstoff-Isotopenverhältnissen existieren sollte, der kleiner als der analytische Fehler ist; demnach sollten FSME von Ölsäure und Palmitinsäure nach ihrer Meinung annähernd gleiche Gehalte an ^{13}C aufweisen. Eine Abweichung der Isotopenwerte könnte daher ein Indikator für Fälschungen sein. Dem gegenüber findet sich in einer Veröffentlichung von Ogrinc et al. von 2003, an der auch Spangenberg mitgewirkt hat, die widersprüchliche Aussage, dass die Palmitinsäure im Gegensatz zur Ölsäure eine leichte Abreicherung an ^{13}C aufweisen würde. In der dortigen graphischen Darstellung ist zu sehen, dass das angebliche Verhältnis von 1:1 nur schwer zu halten ist. Hier sei auch auf die Studie von Monson und Hayes 1982(a) verwiesen, nach der neben den Wasserstoffisotopen auch die Kohlenstoffisotope einer Fettsäure nicht-statistisch verteilt sind; eine Abreicherung von ^{13}C an den olefinischen Positionen wurde -zumindest bei Hefen- nachgewiesen. Die Bedeutung dieser Abreicherung an den ungesättigten Stellen sagt direkt zwar nichts über die globalen Werte aus, widerspricht aber dennoch den Angaben von Ogrinc et al., die ja für die ungesättigte Ölsäure eine leichte Anreicherung postulieren. Demnach müssten, um beide Hypothesen in Einklang zu bringen, die 2 zusätzlichen Kohlenstoffatome in der Kette stark angereichert sein und den Effekt der olefinischen Abreicherung kompensieren.

1999 wurden von Royer et al. ebenfalls Gesamtöl und FSME vermessen; im Gegensatz zu Spangenberg et al. (1998; 2001) wurde hierbei eine andere Probenvorbereitung verwendet und der Linolsäuremethylester ebenfalls vermessen. Eine genaue geographische Zuordnung der Öle anhand der gewonnenen Kohlenstoffisotopendaten gelang nicht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bianchi, Angerosa et al. (1993) sehen Royer und Mitarbeiter (1999) jedoch eine Abhängigkeit der Kohlenstoffisotopenwerte vom Reifegrad; die genaue experimentelle Klärung dieses Sachverhalts erfolgte bisher nicht und ist eine zukünftige Aufgabe der Stabilisotopenmassenspektrometrie.

Eine jüngere Studie von Aramendia et al. (2007) konzentriert sich auf die Sauerstoff- und Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse andalusischer Olivenöle. Von den Jahrgängen 2004/05 und 2005/06 wurden die Öle verschiedener, regional typischer Olivensorten untersucht und die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse mit denen des Sauerstoffs korreliert. Ohne Anwendung statistischer Methoden war nach Meinung der Autoren eine deutliche Unterscheidung einiger wichtiger Sorten zu erzielen; leider wurden in dieser Grafik nicht beide Jahrgänge berücksichtigt, sondern nur der Jahrgang 2004/05. Nimmt man die Werte von 2005/06 aus der Tabelle hinzu, so stellt man bei einigen der selbst hergestellten und unter gleichen Bedingungen (mit Ausnahme des Jahrgangs!) gewonnenen Ölen eine Abweichung der Sauerstoff-

Isotopenverhältnisse von bis zu 3,2 ‰ gegen VSMOW fest, wohlgermerkt bei der gleichen Olivensorte am selben Standort! Da alle Bedingungen mit Ausnahme des Wetters gleich blieben, muss man sich die Frage stellen, ob diese im Gesamtkontext großen Abweichungen zwischen den Jahrgängen eine Zuordnung nicht von vornherein unmöglich machen. Die Autoren befanden, dass auch eine Zuordnung der geographischen Herkunft der Öle innerhalb Andalusiens möglich sei. Da jedoch die meisten Öle Mischungen verschiedener Herkunft und Sorten sind, stellt sich hier die Frage nach der Relevanz dieser Methode für die praktische Arbeit der Lebensmittelüberwachung. Nimmt man die in dieser Arbeit bestimmten Werte für Sauerstoff- und Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse hinzu, so liegen diese ebenfalls im Bereich der andalusischen Öle. Somit eignet sich die beschriebene Methode allenfalls für die theoretische, isolierte Fragestellung, ob eine korrekte Sortendeklaration bei andalusischen Olivenölen vorliegt, ohne zugleich eine Aussage über die Richtigkeit der deklarierten Herkunft Andalusien treffen zu können.

Im Jahr 2010 veröffentlichten Camin et al. (a) eine umfangreiche Studie. Darin wurden 267 Olivenöle der Erntejahre 2005 und 2006 sowie 314 dazugehörige Wasserproben auf die Isotopenverhältnisse der Elemente Wasserstoff, Sauerstoff und ggf. Kohlenstoff untersucht. Die Herkunft der Ölproben aus der gesamten EU war jeweils genau bekannt, ebenso die meteorologischen (Feuchte, Temperatur) und geographischen Daten (Höhe, Entfernung zum Meer). Ziel der Untersuchung war es, eine Aussage über die Herkunft der Öle zu machen. Dies gelangt unter Verwendung statistischer Methoden und der Berücksichtigung der Gehalte an 14 Elementen in den Ölen (Mg, K, Ca, V, Mn, Zn, Rb, Sr, Cs, La, Ce, Sm, Eu, U); die Wahl der Elemente erfolgte willkürlich.

Nach Angaben der Autoren gelang es so, 95 % der Proben im Nachhinein korrekt zuzuordnen. Diese Trefferquote erscheint zwar hoch, aber es gilt zu berücksichtigen, dass ja nur die Proben zugeordnet wurden, die an der Erstellung des Modells beteiligt waren. Eine Überprüfung unter realistischen Bedingungen, d.h. mit Handelsware, bei der naturgemäß genaue meteorologische und geographische Daten nicht greifbar sind, erfolgte nicht. Zudem wurden nur die Jahrgänge 2005 und 2006 untersucht. Jahrgangsbedingte Schwankungen der Isotopenzusammensetzung der Öle und des Wassers oder veränderte Wetterlagen blieben unberücksichtigt. Insbesondere die von den Autoren betonte Notwendigkeit des dazugehörigen Niederschlagswassers und die aufwendige Bestimmung des Gehaltes von 14 Elementen lassen Zweifel an der Routinetauglichkeit der Methode im Rahmen der Lebensmittelüberwachung aufkommen.

Vorab sei schon darauf hingewiesen, dass der Vergleich der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Isotopendaten mit denen von Camin et al. sehr interessant ist: Am auffälligsten ist die Tatsache, dass bei Ölen, die sich nur im Jahrgang unterscheiden, bei Camin et

al. nur minimalste Schwankungen in der Isotopenzusammensetzung gefunden worden sind. Dies steht im Gegensatz zu den von uns ermittelten Daten, nach denen bei 2 identischen Ölen, die sich nur im Jahrgang unterschieden, doch erhebliche Schwankungen auftraten. In der Literatur sind derart große Abweichungen bereits beschrieben worden (Spangenberg et al., 2001). Der Grund, weshalb diese Variationen bei der Studie von Camin et al. nicht beobachtet wurden, ist unklar.

Eine interessante Beobachtung machten Bontempo et al. in ihrer 2009 veröffentlichten Studie. Darin wurden 196 italienische Olivenöle aus drei Jahrgängen (es bleibt unklar, ob es sich um Handelsware handelt) hinsichtlich der Stabilisotopenverhältnisse von Wasserstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff untersucht. Die Öle stammten jeweils aus einem 30km breiten Streifen von der Ost- und Westküste Italiens in Richtung Landesinnere; eine Zuordnung der Proben in Nord-Süd-Richtung führten die Autoren überraschenderweise nicht durch. Durch Korrelation mit meteorologischen Daten stellten die Autoren verschiedene Abhängigkeiten der Sauerstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse fest, die eine Unterscheidung der Öle von der West- und Ostküste Italiens möglich machen könnten.

Auch hier ist kritisch anzumerken, dass sozusagen Idealbedingungen herrschten: die meteorologischen Daten waren bekannt, es handelte sich um nicht verschnittene Öle eng definierter Regionen (Abstand zum Meer max. 30 km). Daher stellt sich auch hier die Frage, inwieweit ein derartiges Vorgehen für die Authentizitätskontrolle von Handelsware relevant sein kann.

Darüber hinaus finden sich interessante Beobachtungen der Autoren. So lagen die Wasserstoff-Isotopenverhältnisse zwischen -153 und -141 ‰ ($\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$); die Schwankungen zwischen den drei Jahrgängen und zwischen den Küsten lagen unter 10 ‰, also im Bereich der Messunsicherheit. Sinngemäß gilt dies auch für die Sauerstoff-Isotopenverhältnisse. Bei den Kohlenstoff-Isotopenverhältnissen zeigte sich –außer an einem Jahrgang– ebenfalls eine auffallend hohe Konvergenz der Werte.

Um es vorweg zu nehmen: Diese engen Schwankungsbreiten konnten bei unseren Studien nicht bestätigt werden, nicht zuletzt deshalb, weil die Herkunft der Öle nicht von vornherein dermaßen eingeschränkt war.

Ebenfalls limitiert bezüglich Herkunft der Proben ist eine aktuelle Studie von Aramendia et al. (2010). Darin wurden spanische und italienische Olivenöle zweier Jahrgänge hinsichtlich ihrer Stabilisotopenverhältnisse von Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlenstoff untersucht; ergänzend hierzu wurde mittels NMR-Untersuchungen der Gehalt an Fettsäuren und 1,2-/1,3-DG bestimmt. Nach Meinung der Autoren seien die Stabilisotopenverhältnisse aller drei genannten Elemente unabhängig vom Reifestadium der Oliven; die Olivensorte sei hingegen

ausschlaggebender Faktor für die Verhältnisse der Stabilisotopen der drei Elemente. Da traditionell in unterschiedlichen Höhenlagen auch verschiedene Sorten angebaut werden, konnte kein klarer Zusammenhang zwischen Anbauhöhe und Einfluss auf die Isotopenverhältnisse beobachtet werden. Die Fettsäurezusammensetzung hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Isotopenzusammensetzung. Es gelang den Autoren lediglich, spanische Olivenöle eines Jahrgangs von italienischen Olivenölen desselben Jahrgangs anhand ihrer Wasserstoff-Isotopenverhältnisse zu unterscheiden. Dieser Zusammenhang muss jedoch angesichts unserer nachfolgend dargestellten Erkenntnisse kritisch betrachtet werden. Anhand der Kohlenstoff- und Sauerstoff-Isotopenverhältnisse gelang keine Differenzierung.

Alonso-Salces et al. (2010) beschäftigten sich intensiver mit der Entwicklung statistischer Verfahren, um die mittels IRMS und SNIF-NMR erhaltenen Isotopendaten von Olivenölen verschiedener Anbauländer auszuwerten. Sie bedienten sich der Diskriminanzanalyse und konnten so nach eigenen Angaben über 90 % der Ölproben richtig zuordnen. Eine Kontrollanalyse mit Handelsware wurde allerdings nicht durchgeführt.

Eine weitere Studie aus 2010 von Camin et al. (b) beschäftigt sich mit den Isotopenverhältnissen des Squalen. Außer in Oliven kommt Squalen auch in der Leber von Haifischen vor. Da die nicht überall erlaubte Gewinnung aus Haifischleber kostengünstig ist, suchten die Autoren nach einer Möglichkeit, Squalen aus Haifischleber und Olivenöl zu unterscheiden. Es zeigte sich, dass Squalen aus Haifischleber mit durchschnittlich -20‰ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$) weniger stark abgereichert war, als die aus Olivenöl gewonnene Verbindung (durchschnittlich -28‰ $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$). Die Wasserstoff-Isotopenverhältnisse unterschieden sich nicht signifikant und wiesen einen Mittelwert von -178‰ ($\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$) auf. Dies deckt sich gut mit unseren im Kapitel 3.4 beschriebenen Werten für Squalen in Olivenöl; auffallend hierbei ist, dass die Werte auch hier relativ eng zusammenliegen. Eine Diskussion über die möglichen Ursachen findet sich ebenfalls in Kap. 3.4.

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchung von 165 Handelsproben Olivenöl beschrieben. Darunter befanden sich neben Proben der wichtigsten Herkunftsländer in- und außerhalb der EU auch so genannte Billigöle. Dabei handelt es sich um als „extranativ“ deklarierte Öle, die im Discount Einzelhandel zu sehr niedrigen Preisen angeboten werden. Diese Öle erregen besonderes Interesse, da es nach Meinung von Fachleuten nicht möglich ist, diese hochwertige Ölkategorie derart kostengünstig anzubieten; der Verdacht der –zumindest teilweisen– Verwendung von z.B. raffinierten Ölen oder Tresterölen kommt hierbei auf.

Zur Kontrolle von Herkunft und Authentizität wurden die Proben auf ihre Isotopenverhältnisse untersucht und die Ergebnisse nach Ländern bzw. Ölqualität getrennt ausgewertet. Damit werden Schwankungen in der Isotopenzusammensetzung erfasst, die aufgrund unterschiedlicher Standorte oder unterschiedlicher technologischer Behandlung der Öle zu Stande kommen können. Ergänzend zu den ermittelten Isotopenverhältnissen wurden die Daten mittels statistischer Verfahren verknüpft und ausgewertet.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Gesamtöl

Für das Gesamtöl wurden mittels EA-C/P-IRMS für Wasserstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff die in den nachfolgenden Abbildungen gezeigten Isopenverhältnisse bestimmt (Einzeldaten siehe Anhang); die gemessenen Werte lagen im Bereich von $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -114$ bis -161 ‰, $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -26,1$ bis $-31,7$ ‰ und $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} = 31,1$ bis $15,8$ ‰. Die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse lagen in dem für alle C_3 -Pflanzen erwarteten Intervall. Der Deuterium-Gehalt war, wie bei Lipiden üblich, im Vergleich zu anderen Verbindungsklassen relativ niedrig. Die ermittelten δ -Werte der drei Bioelemente lagen im Bereich derer, die man bei vorhergehenden Untersuchungen des Gesamtöls in der Literatur beschrieben hat.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden jedoch erstmals alle drei Elemente erfasst und graphisch, teils mittels dreidimensionaler Abbildungen, ausgewertet. Dabei wurde eine Differenzierung desselben Probenkanons einerseits nach Ölqualität und andererseits nach Herkunft vorgenommen. In den zweidimensionalen Abbildungen wurden jeweils Kohlenstoff & Wasserstoff, Kohlenstoff & Sauerstoff und Wasserstoff & Sauerstoff korreliert; im ersten Tripel wurde nur die Eigenschaft Billigöl und Qualitätsöl gekennzeichnet; im zweiten Tripel wurde zudem noch die Herkunft der einzelnen Qualitätsöle in den Abbildungen gekennzeichnet. Wie aus den Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3 ersichtlich ist, sind die δ -Isotopenwerte der Billigöle und der Qualitätsöle im selben Bereich angesiedelt. Dies macht eine Erkennung von verfälschten Ölen nur anhand der Isotopenverhältnisse des Gesamtöls unmöglich. Da die Öle jeweils zu etwa 98% aus Triacylglyceriden bestehen und diese bei den eventuell stattfindenden Raffinationsschritten, die bei „Olivenöl“ legal, aber bei „nativen“ Olivenölen illegal sind, nicht in ihrer absoluten Isotopenzusammensetzung verändert werden, ist eine Differenzierung nicht möglich. Die Veränderungen bei der Raffination beziehen sich, neben dem Abtrennen freier Fettsäuren, meist auf Strukturänderungen bei Bestandteilen des Unverseifbaren oder der DG. Da jedoch im „geschlossenen System“ Olivenöl keine nennenswerten Substanzmengen bei der Raffination verlorengehen oder neu hinzutreten, lässt sich offensichtlich auch keine gravierende Änderung der Isotopenverhältnisse nachweisen. Allenfalls ein Desodorieren mittels Wasserdampf könnte zu Veränderungen der Wasserstoff- und Sauerstoff-Isotopenverhältnisse führen. Um hierbei Klarheit zu erlangen, erfolgte noch die Untersuchung der Isotopenverhältnisse bei den Billigölen.

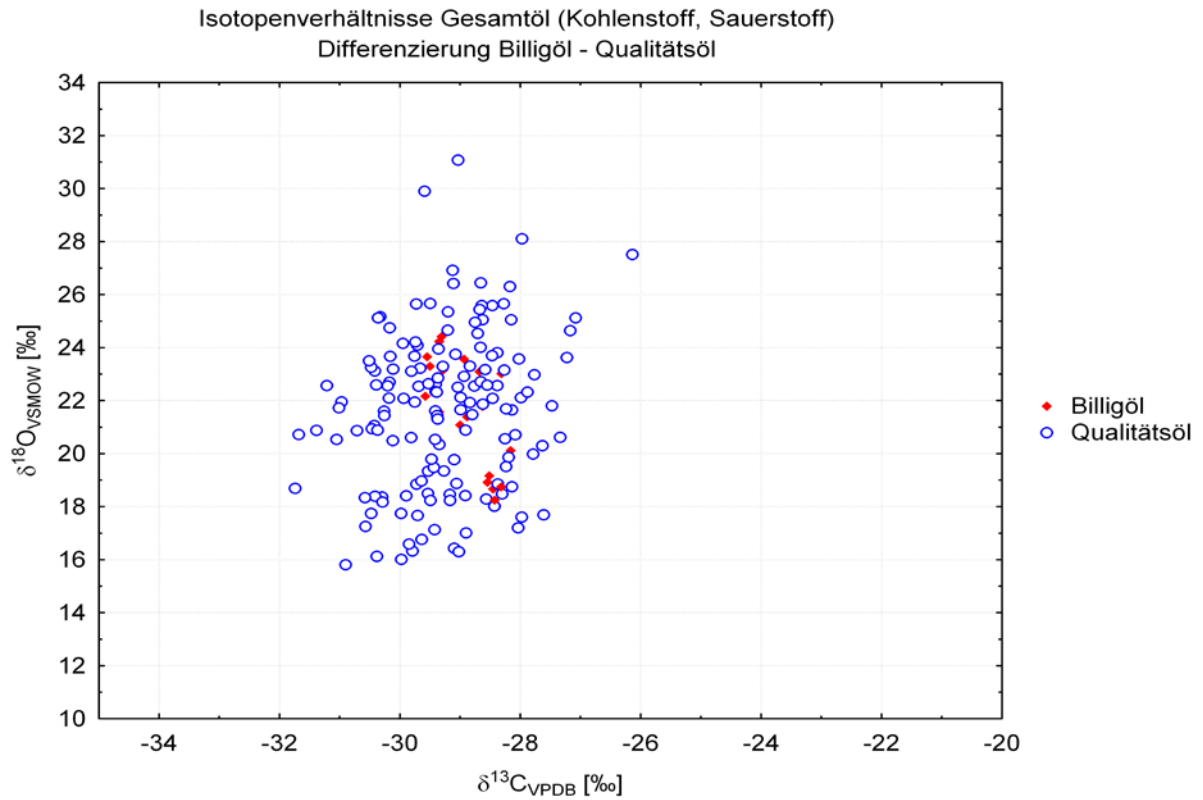


Abb. 3.1: Mittels EA-C/P-IRMS ermittelte Isotopenverhältnisse der Elemente Sauerstoff und Kohlenstoff im Gesamtöl, geordnet nach Ölqualität.

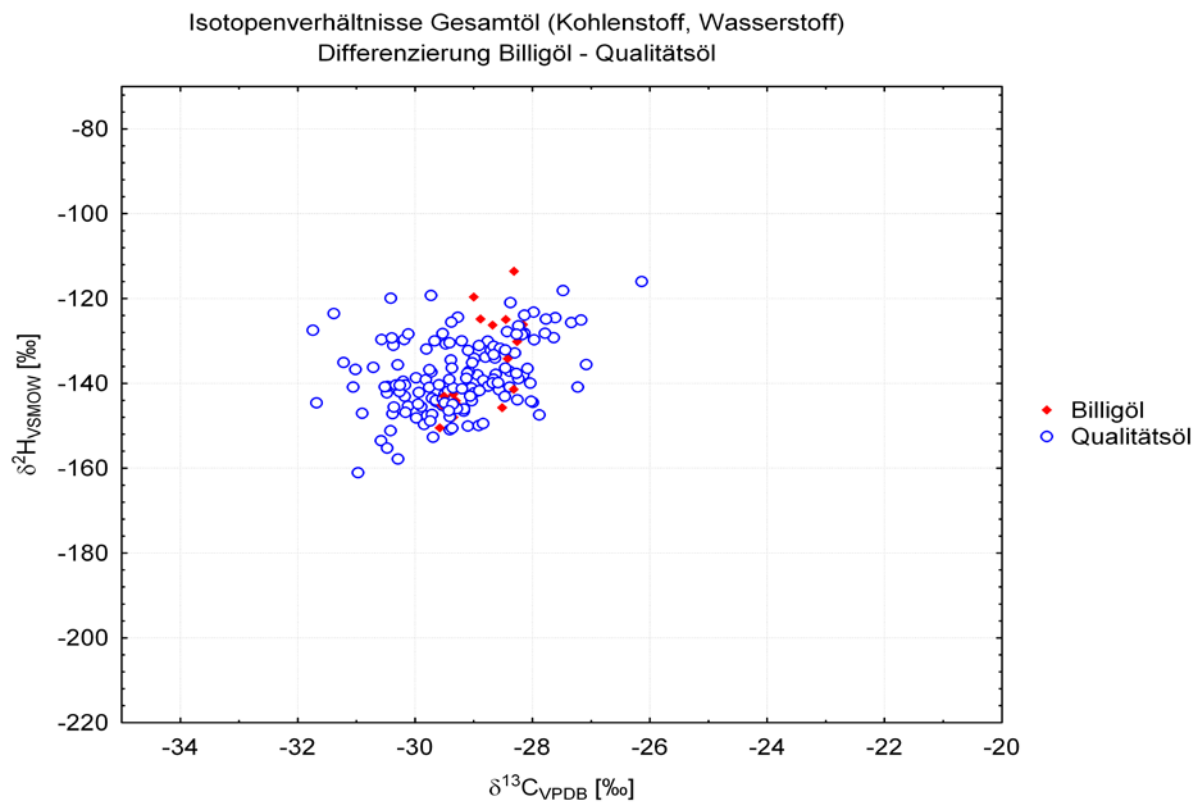


Abb. 3.2: Mittels EA-C/P-IRMS ermittelte Isotopenverhältnisse der Elemente Wasserstoff und Kohlenstoff im Gesamtöl, geordnet nach Ölqualität.

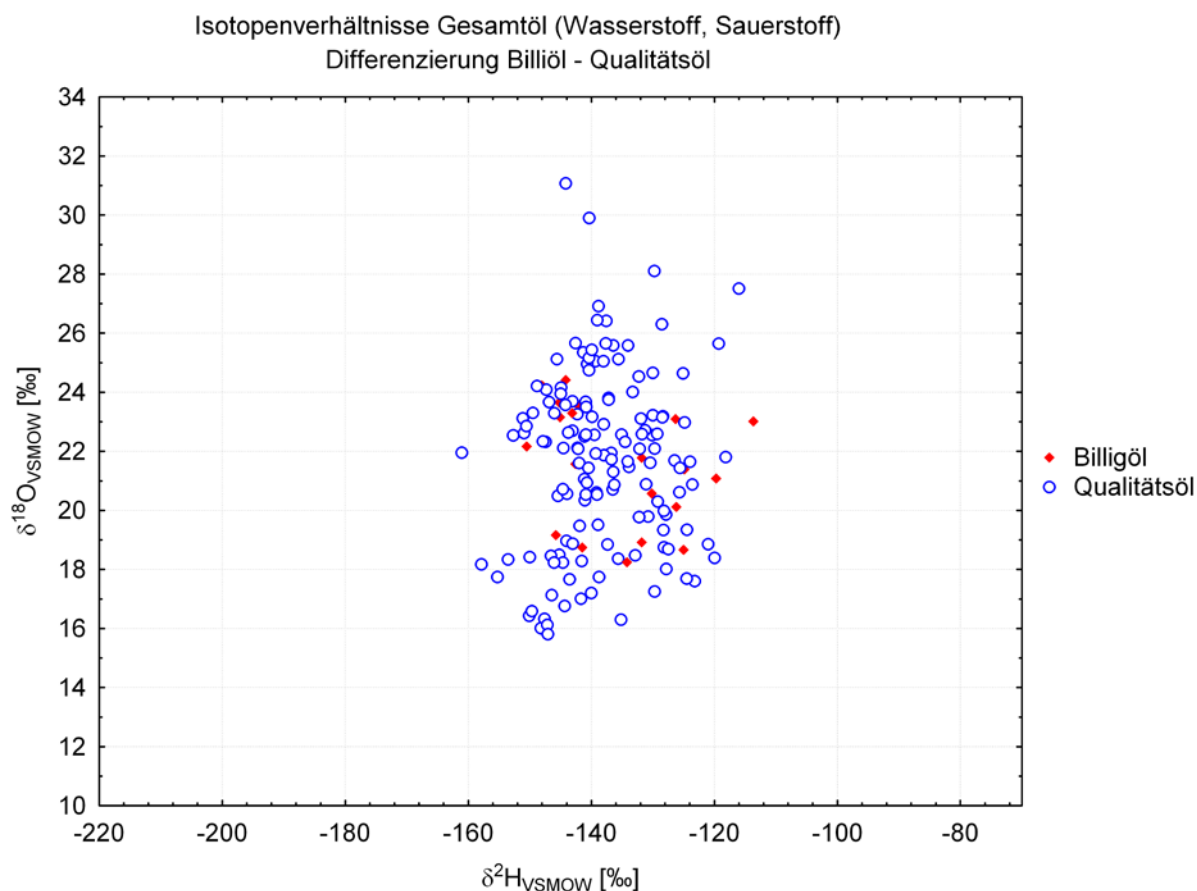


Abb. 3.3: Mittels EA-C/P-IRMS ermittelte Isotopenverhältnisse der Elemente Wasserstoff und Sauerstoff im Gesamtöl, geordnet nach Ölqualität.

Da Leitungswasser verglichen mit den Lipiden stark angereichert an Deuterium ist, müsste man also nach einer Wasserdampfdestillation eine gewisse Anreicherung an Deuterium beobachten können. Daß dies nicht der Fall ist, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen ist nicht sicher, dass auch jedes Billigöl mit Wasserdampf desodoriert wird und dass der zugeführte Wasserdampf eine signifikante Änderung der Wasserstoff-Isotopenverhältnisse verursacht, und zum anderen kommen anstatt der klassischen Wasserdampf-Desodorierung heute vorwiegend Soft-Column-Verfahren zum Einsatz, die unter schonenden Bedingungen betrieben werden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass im Rahmen des untersuchten Probenvolumens auf der Grundlage der Ermittlung von $\delta^{13}\text{C}$ -, $\delta^2\text{H}$ - und $\delta^{18}\text{O}$ -Werten des jeweiligen Gesamtöls keine Auffälligkeiten bei den Billigölen auftraten, die auf eine Wasserdampf-Desodorierung oder sonstige unerlaubte Behandlung hindeuten.

Die Abbildungen 3.4, 3.5 und 3.6 zeigen dieselben Ölproben wie die in den Abb. 3.1, 3.2 und 3.3 aufgeführten, jedoch wurde nunmehr die bei den Ölen deklarierte Herkunft gekennzeichnet. Da insbesondere die Öle der Hauptanbauländer Italien, Spanien und Griechenland in

allen Fällen über beinahe den ganzen Plot verteilt sind, erkennt man schnell, dass anhand dieser Daten keine Aussage über die Herkunft der Öle möglich ist. Die Gründe hierfür mögen vielfältig sein; möglicherweise kommt es auf den genauen Anbauort (Lage, Höhe, Wetter) im Erzeugerland an. Berücksichtigt man dazu die variable Isotopenzusammensetzung der sich jährlich ändernden Niederschläge und die Tatsache, dass das deklarierte Herkunftsland möglicherweise nicht korrekt ist, so muss man eine gewisse Unabwägbarkeit der multiplen, einzeln einfließenden Faktoren auf die Isotopenzusammensetzung berücksichtigen. Besonders das Wetter hat einen erheblichen Einfluss auf Wasserstoff- und Sauerstoff-Isotopenverhältnisse.

Hier sei auf die Problematik der bei unterschiedlichen Jahrgängen erheblich voneinander abweichenden Isotopenverhältnisse verwiesen (vgl. Kap. 2.10). Zwar ist es richtig, dass der Niederschlag im Landesinneren tendenziell am schweren Isotop angereicherter ist, aber dieses Modell berücksichtigt u.a. nicht die Wolkenbildung im Landesinneren, die besonders über Gewässern erheblich zum Niederschlag beitragen kann. Dazu werden die unterschiedlichen Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse möglicherweise von der jeweiligen Olivensorte determiniert.

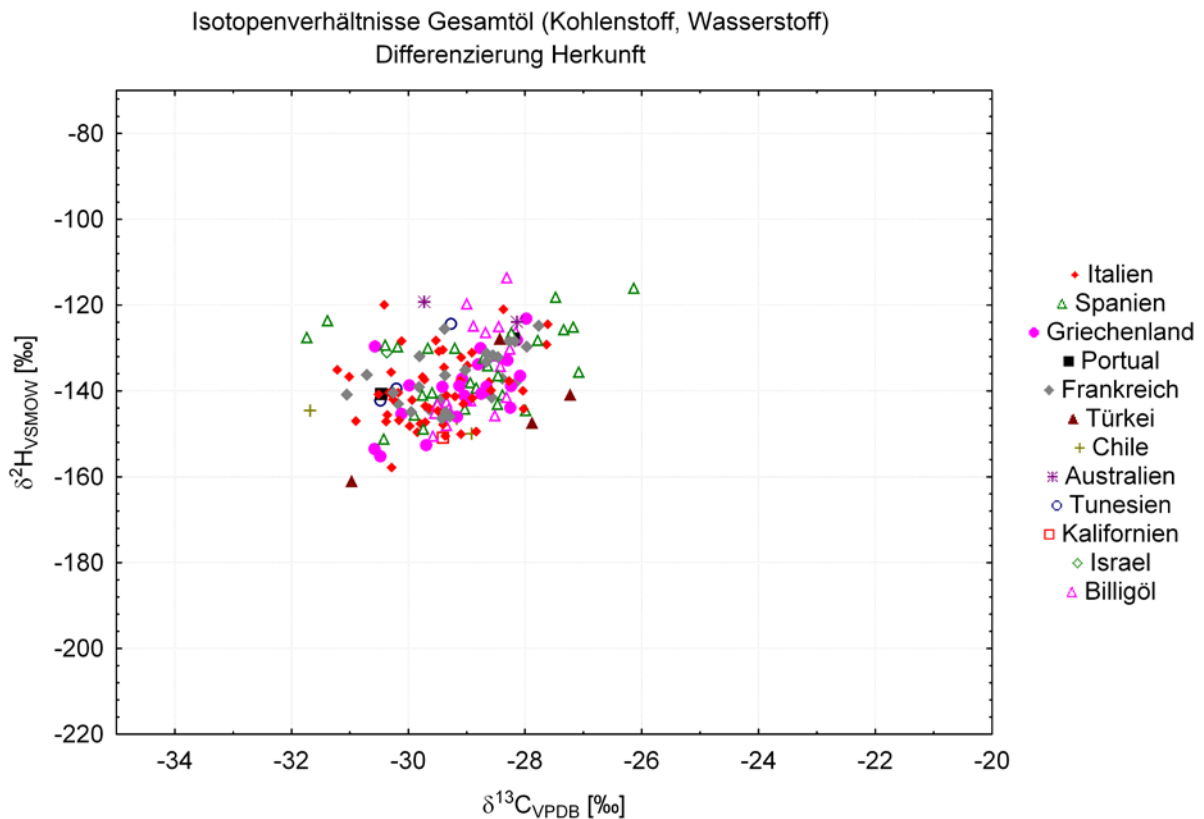


Abb. 3.4: Mittels EA-C/P-IRMS ermittelte Isotopenverhältnisse der Elemente Wasserstoff und Kohlenstoff im Gesamtöl, geordnet nach deklarierter Herkunft.

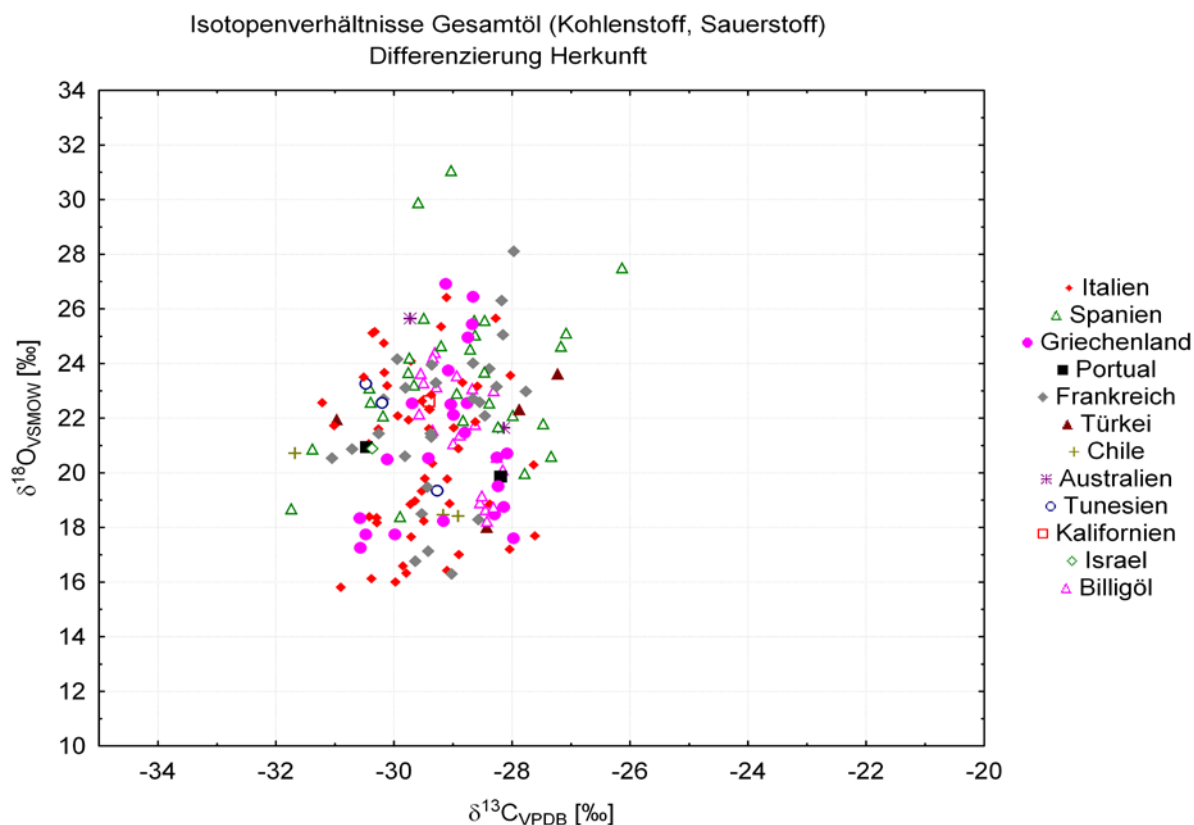


Abb. 3.5: Mittels EA-C/P-IRMS ermittelte Isotopenverhältnisse der Elemente Sauerstoff und Kohlenstoff im Gesamtl, geordnet nach deklarierter Herkunft.

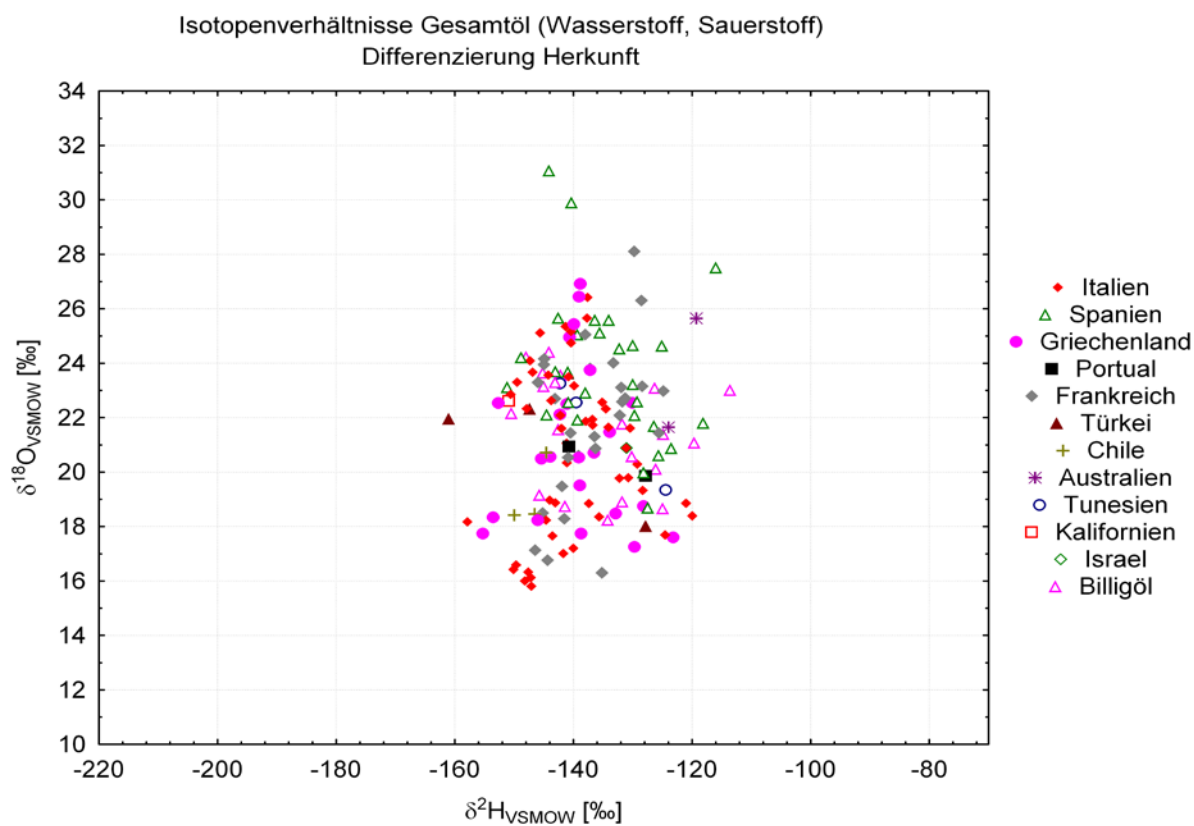


Abb. 3.6: Mittels EA-C/P-IRMS ermittelte Isotopenverhältnisse der Elemente Wasserstoff und Sauerstoff im Gesamtl, geordnet nach deklarierter Herkunft.

Die vielfältigen unterschiedlichen Einflussmöglichkeiten auf die Isotopenzusammensetzung gestatten vielleicht im lokalen Maßstab –wie in der Literatur vereinzelt beschrieben- noch eine Diskussion, globaler (europaweit) betrachtet sind die Einflüsse zu vielfältig, um sie anhand der vorgestellten Datenlage zu verstehen und in einem einfachen Modell zu erfassen. Geht man hilfsweise empirisch vor, so kommt man ebenso zu dem Schluss, dass die isolierte Betrachtung der Isotopenverhältnisse des Gesamtöls der drei Bioelemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff zu keinem brauchbaren Ergebnis führt, um die Authentizität oder Herkunft von Olivenölen zu verifizieren. Auch eine Darstellung, bei der alle drei Elemente zusammen graphisch erfasst werden (Abb. 3.7 und 3.8) trägt nicht zur Klärung bei.

Isotopenverhältnisse Gesamtöl (Kohlenstoff ,Wasserstoff, Sauerstoff)
Differenzierung Billigöl - Qualitätsöl

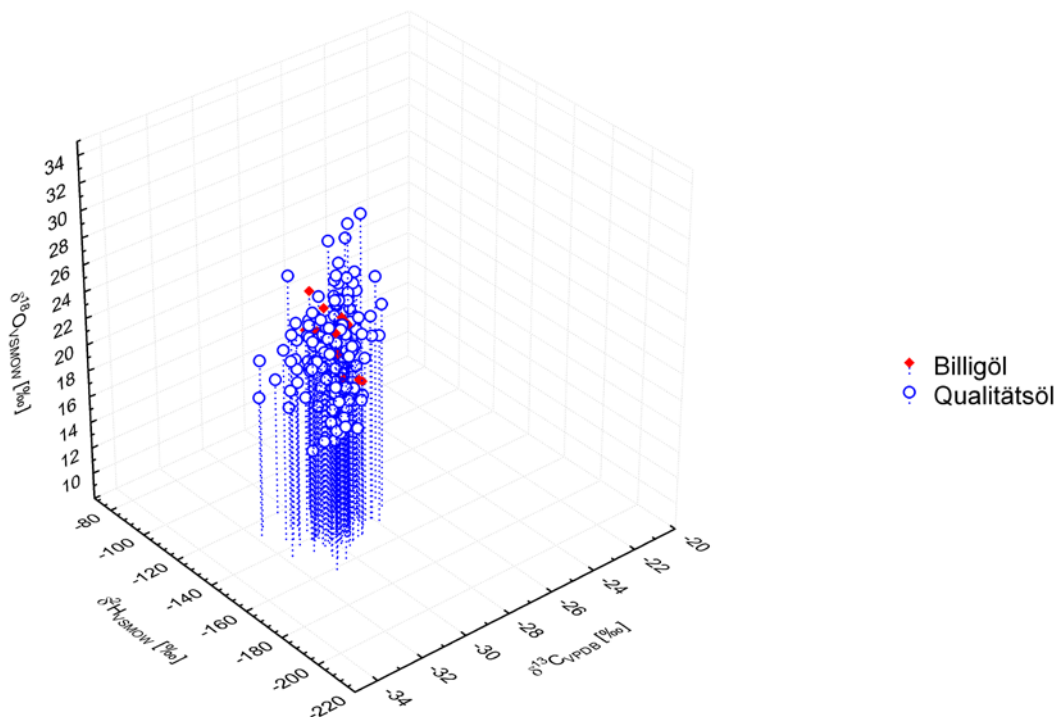


Abb. 3.7: Mittels EA-C/P-IRMS ermittelte Isotopenverhältnisse der Elemente Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlenstoff im Gesamtöl, geordnet nach Ölqualität.

Isotopenverhältnisse Gesamtöl (Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff)
Herkunft

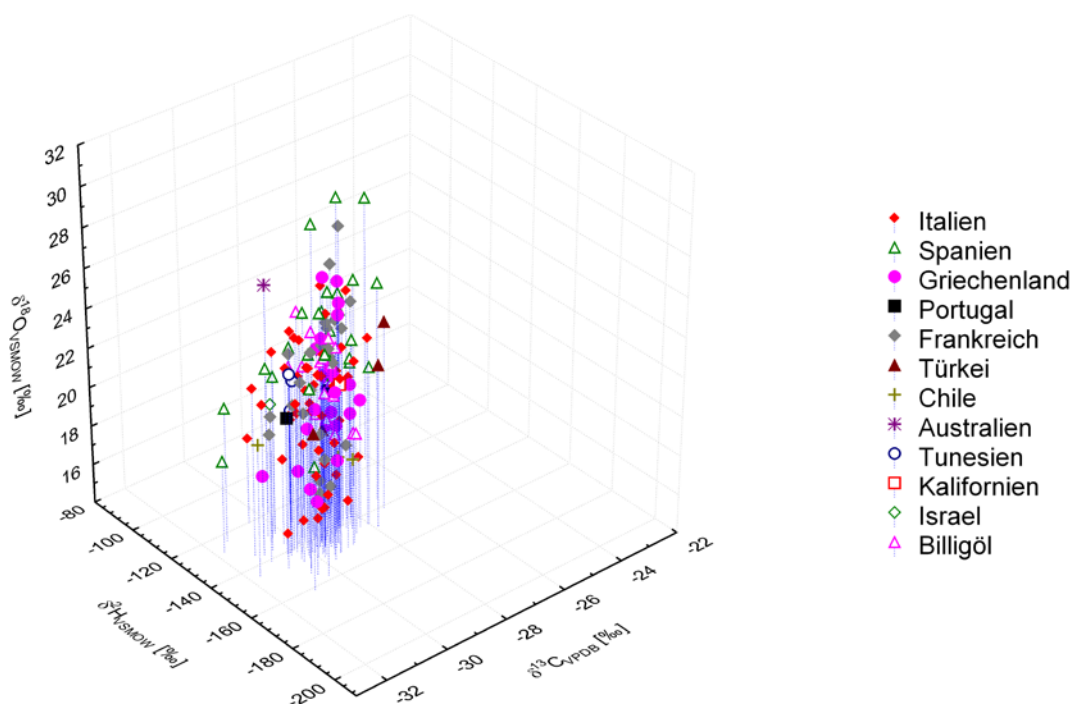


Abb. 3.8: Mittels EA-C/P-IRMS ermittelte Isotopenverhältnisse der Elemente Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlenstoff im Gesamtöl, geordnet nach deklariert Herkunft.

Die Ergebnisse sind zwar -rein numerisch betrachtet- im Einklang mit Resultaten älterer Veröffentlichungen, das Fazit widerspricht den bisherigen Bewertungen aber deutlich. Es konnte nunmehr erstmals gezeigt werden, dass außerhalb durchgeführter Modellversuche, bei denen ideale Bedingungen herrschen (gleiche Sorte, Jahrgang, Anbauort), mittels IRMS keinerlei Aussagen über Herkunft und Qualität machbar sind, auch wenn man -wie bisher noch nicht geschehen- alle drei Elemente im Gesamtöl einbezieht. Es demzufolge also fraglich, dass -wie Aramendia et al. (2007) behaupten- eine Zuordnung andalusischer Öle zur Olivensorte und zum Anbauort in Andalusien -global betrachtet- möglich ist; von den Autoren nicht gewürdigt wurden die teils starken Schwankungen der Sauerstoff-Isotopenzusammensetzung derselben Olivensorte bei den untersuchten unterschiedlichen Jahrgängen. Die Wasserstoff-Isotopenzusammensetzung wurde gar nicht bestimmt. Da nur sortenreine Öle untersucht wurden und diese im Handel eine nur untergeordnete Rolle spielen, sind Zweifel an der Praxisrelevanz der von Aramendia et al. durchgeführten Studie angebracht.

Die Bestimmung der Isotopenverhältnisse des Gesamtöles war aber durchaus ein sachgerechter Ansatz. Da ca. 98 % des Öles aus Triglyceriden bestehen, hat man quasi einen glo-

balen Wert für die TG bestimmt, ohne diese vorher isolieren zu müssen; der Einfluss der Nebenbestandteile auf diesen TG-Wert ist zu vernachlässigen. Insbesondere auch im Hinblick auf die praktische Durchführbarkeit von Seiten der Lebensmittelüberwachung bietet das Verfahren aufgrund der einfachen Handhabbarkeit grundsätzliche Vorteile.

In den Abbildungen 3.9 und 3.10 sind die Daten der dreidimensionalen Darstellungen der Abb. 3.7 und 3.8 nach einer multidimensionalen Skalierung (MDS) aufgeführt. Da auf den ersten Blick keine Differenzierungen möglich waren, wurde dieses statistische Verfahren hier angewandt, mit dem Ziel, dennoch eine Korrelation von Herkunft oder Qualität mit den Isotopenverhältnissen der drei untersuchten Bioelemente herzustellen.

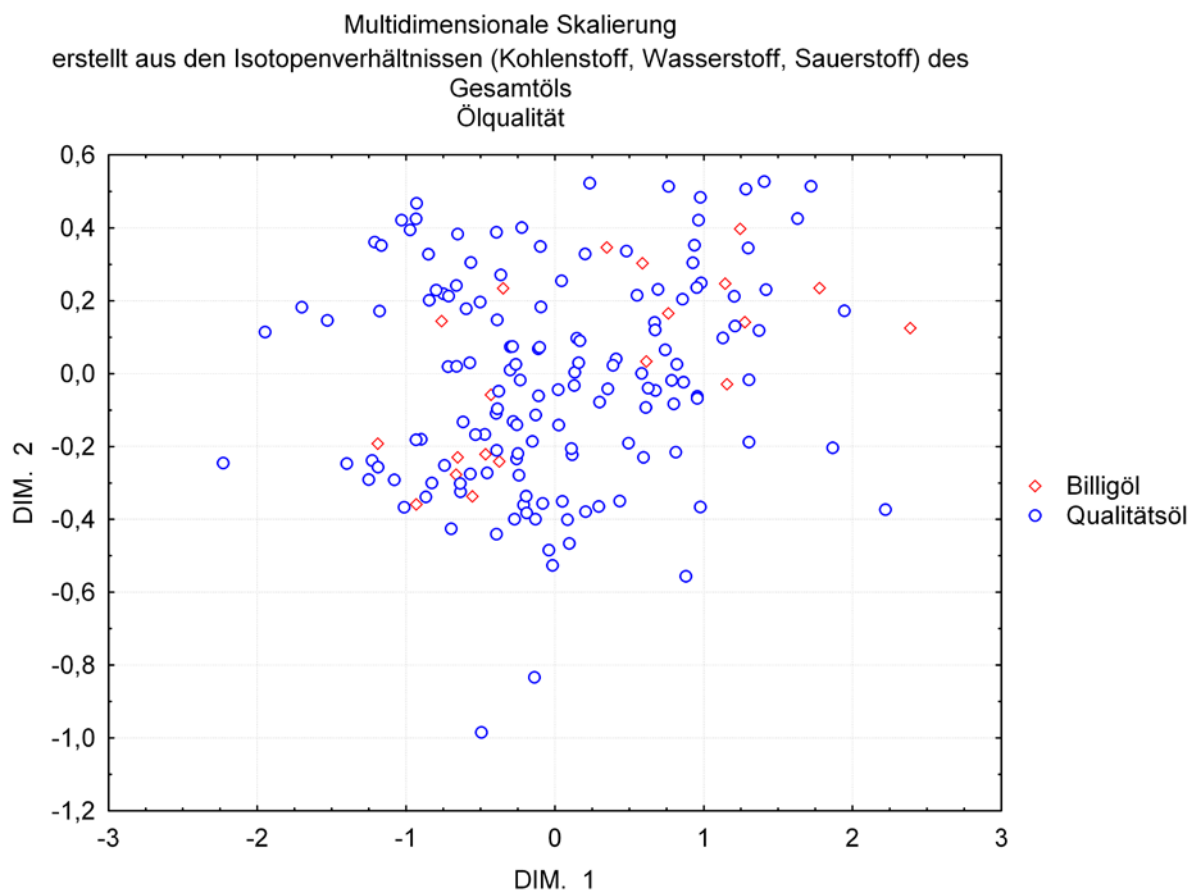


Abb. 3.9: Multidimensionale Skalierung der mittels EA-C/P-IRMS ermittelten Isotopenverhältnisse der Elemente Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlenstoff im Gesamtöl, geordnet nach Ölqualität.

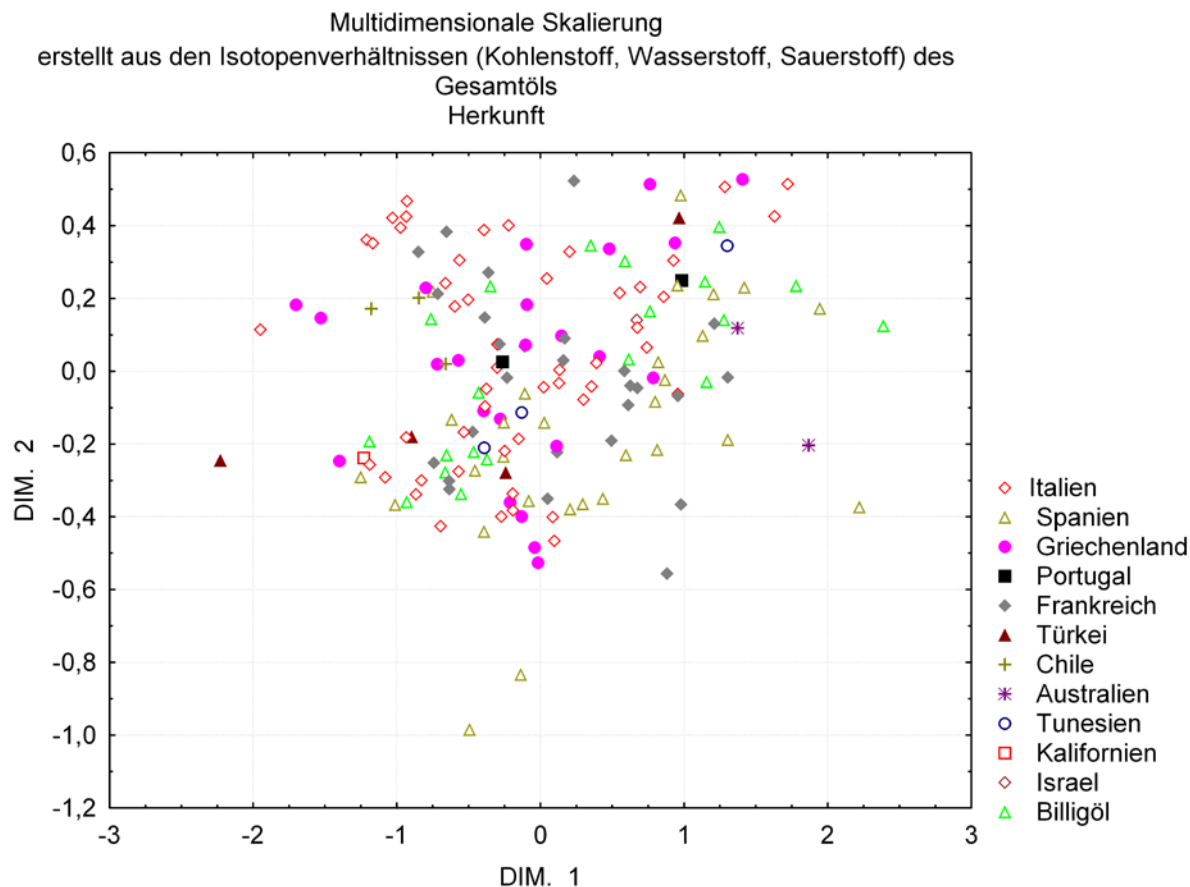


Abb. 3.10: Multidimensionale Skalierung der mittels EA-C/P-IRMS ermittelten Isotopenverhältnisse der Elemente Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlenstoff im Gesamtöl, geordnet nach deklariertem Herkunft.

Theoretisch könnte man sogar weitergehen und eine komplexe Faktor- oder Diskriminanzanalyse durchführen. Die MDS ist dabei aber das einfachste Verfahren und stellt an die Datensätze keine besonderen Anforderungen, wie es andere statistische Analyseverfahren tun. Sie eignet sich insbesondere –aber nicht nur- dazu, einen ersten Überblick über mögliche Korrelationen zu erhalten; sie ist hier das Mittel der Wahl. Dabei werden verschiedene Variablen (hier die drei Isotopenwerte, später 7 Variablen) jeder Probe verarbeitet und gewissermaßen „nur“ der räumliche Abstand dieser n-Variablen untereinander in einem zwei- oder dreidimensionalen Plot wiedergegeben. Es handelt sich um ein iteratives Verfahren, und die Qualität/Konsistenz (sozusagen die Stimmigkeit) der Daten spiegelt sich im sog. Stress-Wert wieder, der hier im brauchbaren Rahmen liegt. Ohne Rücksicht auf die Chemie wird also nur der Abstand der n Variablen in einem n-dimensionalen Diagramm in einen zweidimensionalen Plot projiziert. Für eine echte Beweisführung mag dies möglicherweise ungenügend erscheinen, aber in vorliegendem Fall liefert die MDS eine ganz klare Aussage, nämlich dass die breite Streuung der Proben –ob nach Qualität oder Land gegliedert- eine konkrete Zuordnung unmöglich macht.

Da hier nicht, wie bei vergangenen Untersuchungen des Schrifttums, Idealbedingungen in Bezug auf Sorte, Anbauort und Jahrgang realisiert wurden, sondern ein repräsentativer

Marktquerschnitt an Proben untersucht wurde, kann man nun mit letzter Sicherheit alle vergangenen und zukünftigen Versuche der Authentizitätsbewertung anhand der massenspektrometrisch ermittelten Isotopenverhältnisse des Gesamtöls als gescheitert betrachten.

3.2 Wachse

Versucht wurde eine Isolierung der Wachse mittels SPE und Messung deren Stabilisotopenverhältnisse via EA-IRMS. Dahinter stand die Überlegung, dass insbesondere bei lösemittel-extrahierten Ölen üblicherweise erhöhte Gehalte an Wachsen zu finden sind und so möglicherweise veränderte Isotopenverhältnisse auftreten. Die Anteile an Wachsen im Öl sind allerdings relativ gering und müssen laut VO (EWG) Nr. 2568/91 in den Kategorien „nativ“ oder „extra nativ“ unter 250 ppm liegen. Geht man davon aus, dass für eine EA-Messung mindestens etwa 100 mg Reinsubstanz vorliegen sollten, so müsste also jeweils fast ein halber Liter Öl mittels SPE aufgearbeitet werden. Hierfür findet sich in der Literatur eine Isolierungsmethode, die eine schnelle und ökonomische Isolierung ermöglichen soll (Nota et al., 1999); damit gelang zumindest die Isolierung kleinster Mengen für die HRGC-FID-Analyse. Leider hat sich in den weiteren durchgeführten praktischen Versuchen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass schon bei Mengen von deutlich weniger als einem halben Liter Öl die Silicagel-SPE-Kartuschen überfordert waren und die Wachse sich nicht mehr vom Öl trennen ließen. Für den präparativen Maßstab sind die in der Literatur aufgezeigten SPE-Methoden nicht geeignet. Alternativ böte sich eine Isolierung mittels Säulenchromatographie (SC) an Kieselgel an. Dies wurde von uns bei der Isolierung von Squalen erfolgreich angewandt. Dabei wurden jedoch lediglich 25 Gramm Olivenöl eingesetzt, bei verhältnismäßig großen Säulen und hohem Arbeitsaufwand. Man kann sich leicht vorstellen, dass die Trennung von dem jeweils geforderten halben Liter Öl den Rahmen des im Labor Möglichen sprengt. Aus diesen Gründen musste die Idee leider verworfen werden.

Man kann deswegen generell den Versuch, eine beliebige Minorkomponente aus dem Öl zu isolieren in Frage stellen. Aufgrund der geringen Konzentrationen ergeben sich pro Probe große Mengen an Öl, die aufgearbeitet werden müssen. Die Bearbeitung ist mit gängigen Methoden nur äußerst schwierig zu bewerkstelligen und auch später im Hinblick auf die praktische Durchführbarkeit (personeller Aufwand, Kosten, Probendurchsatz) wenig realistisch. Als Alternative im Hinblick auf das geforderte hohe Probenvolumen bietet sich das in der frühen Serienreife befindliche HPLC-Interface zur online-Kopplung an die IRMS an (eine Übersichtsarbeit liefern beispielsweise Godin et al. 2007). Mit letzterem könnten sich in Zukunft neue Perspektiven für die Vermessung der Minorkomponenten im Olivenöl auf tun.

Wir führten unsere Untersuchungen, wie nachfolgend detailliert beschrieben, mit der Isolierung von Squalen (Hauptkomponente des Unverseifbaren) fort, welches mittels EA-IRMS vermessen wurde. Zudem wurde ein Versuch gestartet, die „Grünnoten“ des Olivenölaromas mittels HRGC-IRMS zu analysieren. Hierüber wird im folgenden Kapitel 3.3 berichtet.

3.3 „Grünnoten“

Mittels des vorhandenen HRGC-IRMS Interfaces bot sich der Versuch an, flüchtige Komponenten des Olivenöls zu vermessen. Als Zielverbindung kommen somit die Aromastoffe in Frage, die eine Messung aufgrund ihres relativ hohen Dampfdrucks mittels HRGC gestatten. Wie bereits vorgängig dargelegt, sind die „Grünnoten“ mengenmäßig am bedeutsamsten, darunter üblicherweise E-2-Hexenal. Daher wurde von 12 Ölen probeweise mittels simultaner Destillations-Extraktion (SDE) jeweils die flüchtige Fraktion isoliert. Hierzu wurden 300g Olivenöl eingesetzt. Nach einer Identifizierung der Hauptkomponenten mittels HRGC-MS stand eine Untersuchung der Isotopenverhältnisse mittels HRGC-IRMS an. Zudem erfolgte eine halbquantitative Auswertung einiger „Grünnoten“ mittels eines internen Standards. Leider zeigte sich, dass der Gehalt an Aromastoffen in den jeweiligen Proben nicht für die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisuntersuchungen ausreichen würde. Da man zur Messung von Wasserstoff-Isotopenverhältnissen ein Mehrfaches der bei Kohlenstoff-Analysen erforderlichen Menge benötigt, musste dieser Ansatz leider aufgegeben werden. Es hätten schätzungsweise von jedem Olivenöl mehr als 1 kg mittels SDE aufgearbeitet werden müssen. Angesichts der hohen Probenanzahl von 165 Ölen war allein der Zeitaufwand nicht realisierbar.

Dennoch wäre eine derartige Untersuchung dem Grunde nach sinnvoll, da bereits umfangreichere Daten über Isotopenverhältnisse von „Grünnoten“ aus Untersuchungen anderer Pflanzen vorliegen. Falls die Oliven der Billigöle, wie vermutet, längere Zeit nach der Ernte unter nachteiligen Bedingungen gelagert werden, könnte es möglicherweise bereits auf dieser Stufe zu Veränderungen der Aromastoffe kommen, wie sie bei Qualitätsölen nicht zu erwarten sind.

Auffällig beim mittels HRGC-MS ermittelten Aromaprofil der 12 exemplarisch ausgewählten Proben (darunter 6 Qualitätsöle und 6 Billigöle) war eine Probe, die praktisch frei von Aromastoffen war, aber einen sehr hohen Gehalt an Fettalkoholen aufwies. Dies ist ein starker Indikator für die Vermischung (oder in diesem Fall eventuell sogar für die alleinige Verwendung) mit Tresterölen. Der gegenteilige Fall trat auch auf: ein Billigöl wies extrem hohe Gehalte an beinahe sämtlichen „Grünnoten“ auf. Dies geht möglicherweise auf die unkontrollierte Bildung von Aromastoffen bei einer unsachgemäßen Lagerung der beschädigten Oliven zurück. Außer den erwähnten Proben unterschieden sich die anderen Billigöle im Hinblick auf die Gehalte der wichtigsten „Grünnoten“ nicht von den Qualitätsölen; dennoch waren sensorisch durchaus Unterschiede wahrnehmbar. Die nachstehenden Abbildungen zeigen das Aromaprofil des genannten Billigöls (Abb. 3.12) (mit hohem Fettalkoholanteil) verglichen mit dem eines typischen Qualitätsöls (Abb. 3.11).

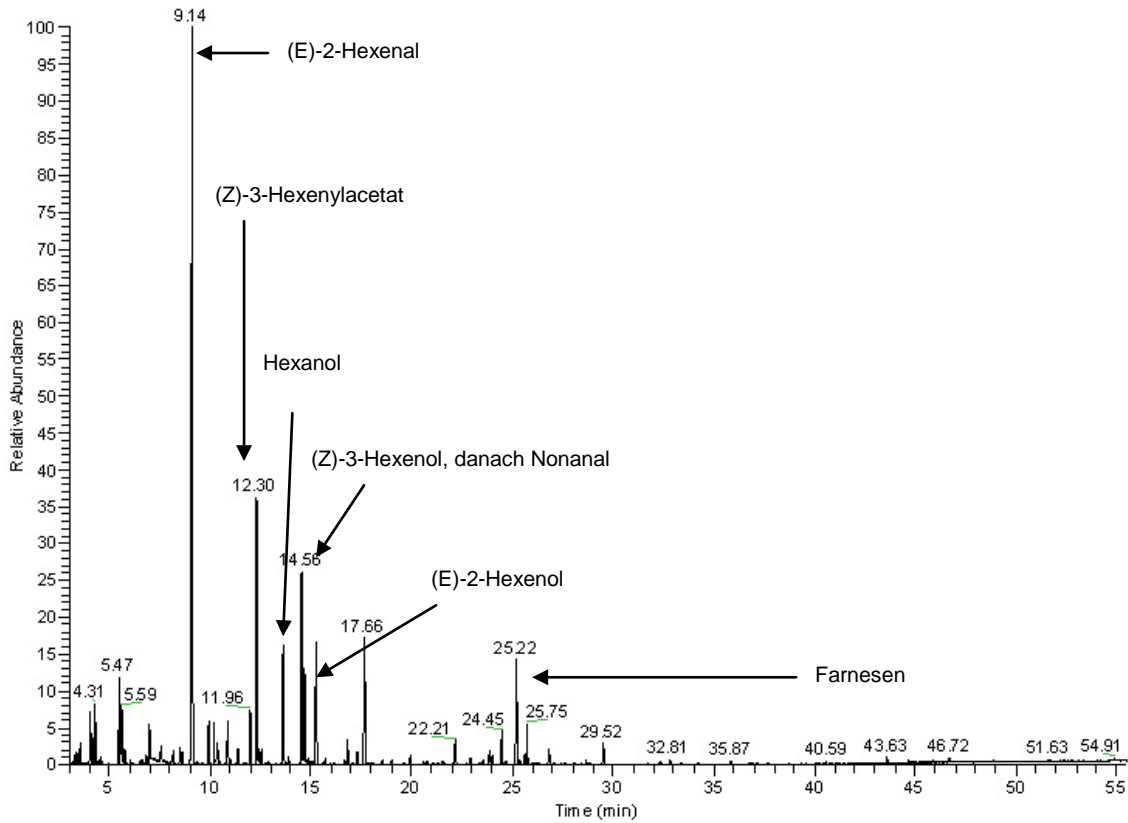


Abb. 3.11: HRGC-MS-Trennung (TIC) der Aromastoffe eines Qualitätsöls.

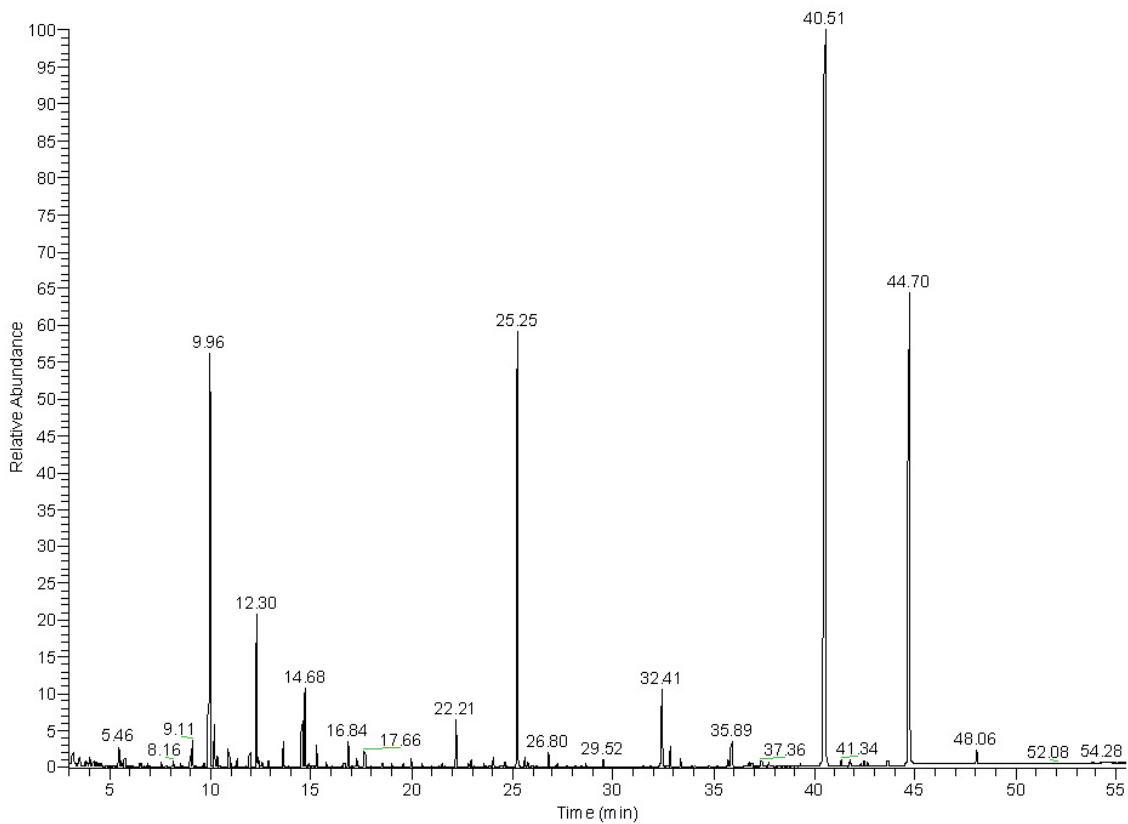


Abb. 3.12: HRGC-MS-Trennung (TIC) der Aromastoffe eines Billigöls mit auffallend wenig „Grünnoten“ und einem hohen Gehalt an Fettsäurealkoholen.

3.4 Squalen

Da nichtflüchtige Verbindungen nicht ohne Derivatisierung mittels HRGC-IRMS vermessen werden können und ein HPLC-Interface nicht zur Verfügung stand, müssen derartige Verbindungen durch eine manuelle Probenvorbereitung in reiner Form aus dem Öl abgetrennt werden, um sie nachfolgend mittels EA-IRMS vermessen zu können. Da dies jedoch oft an der Konzentration scheitert (vgl. Wachse), wurde im Folgenden der Hauptbestandteil des Unverseifbaren, das Squalen, ins Auge gefasst. Dessen Konzentration im Olivenöl schwankt stark, d.h. von etwa 0,8 bis 12 g pro kg Olivenöl (de Leonardis et al., 1998; Cert et al., 2000; Nenadis und Tsimidou, 2002; Murkovic et al., 2004). Owen et al., (2000c) geben einen mittleren Squalengehalt von 2,9 g pro kg Olivenöl an. Dabei macht Squalen bis zu 90 % der Masse des Unverseifbaren aus.

Da Squalen als Hauptkomponente des Unverseifbaren auch in umfangreicheren Studien (die man ja zwangsläufig zum Aufbau einer Datenbank als erste Arbeitsgrundlage benötigt) mit vertretbarem Arbeitsaufwand zu isolieren ist, wurde der Fokus auf diese Verbindung gelegt. Sicherlich wäre eine Isotopen-Untersuchung bei den Pigmenten oder Sterolen auch interessant, nur ist diese in dem hier erforderlichem Probenumfang nicht zu realisieren, da die geringen Konzentrationen dieser Verbindungen die Aufarbeitung beträchtlicher Probenmengen bedürfen (vgl. Wachse). Geht man von einem Bedarf von etwa 100 mg für EA-IRMS-Messungen der Kohlenstoff- und Wasserstoff-Isotopenverhältnisse aus, so war von einer Aufarbeitung von je etwa 35 g Olivenöl auszugehen. Dies lag auch bei hoher Probenzahl im Rahmen des Machbaren, weswegen probenhalber aus Olivenölen mittels Säulenchromatographie an Kieselgel unter Elution mit Hexan Squalen rein isoliert wurde. Reinheits- und Identitätsbestimmungen erfolgten mittels HRGC-MS-, RI- und NMR-Untersuchungen. Um die Bildung von Squalen-Oxidationsprodukten zu verhindern, wurde Squalen unter Argon tiefgekühlt gelagert; dies ist jedoch nicht unbedingt notwendig, da der Zutritt von Sauerstoff die Wasserstoff- und Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse nicht stört.

Über die Isotopenverhältnisse des im Olivenöl enthaltenen Squalens ist in der Literatur wenig veröffentlicht; eine Studie von Camin et al. (2010) beschäftigt sich nur mit der Frage, ob Squalen aus Olivenöl und aus Haifisch-Leber unterschieden werden können. Über den Einfluss von Herkunft und Qualität der Öle auf die Isotopenverhältnisse des enthaltenen Squalens existieren in der Literatur bisher keine Untersuchungen.

Aus 49 der untersuchten 165 Olivenöle (Auswahl aus allen Proben repräsentativ nach Herkunft und Qualität; Ergebnisse im Anhang) wurde Squalen isoliert und hinsichtlich seiner Wasserstoff- und Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse vermessen. Erstaunlicherweise zeigte

sich bei den Wasserstoff-Werten eine starke Äquivalenz bei allen Proben; die Werte variierten lediglich zwischen $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -174$ und -144 ‰, mit Schwerpunkt bei etwa -160 ‰.

In Anbetracht der üblichen Messunsicherheit bei Wasserstoff in Höhe von 10 ‰ muss man konstatieren, dass demzufolge Aussagen über Herkunft und Qualität anhand der $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ -Werte des Squalens nicht zu treffen sind. Beinahe zwangsläufig gelangt man nun zu der Frage, wie diese bemerkenswerte Äquivalenz fast aller $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ -Werte zu erklären ist. Geht man zuallererst von einem Fehler bei der Isolierung aus, wie z.B. eine Änderung (und dadurch bewirkte Vereinheitlichung) der originären Wasserstoff-Isotopenverhältnisse durch das Kieselgel, die mangels funktioneller Gruppen im Squalen nicht so einfach auftreten sollte, so müsste diese auch bei einer Kontrolle des Isolierungsverfahrens mit kommerziell erhältlichem, reinen Squalen auftreten. Daher wurde reines Squalen in Erdnussöl, das von Natur aus squalenfrei ist, gelöst, wieder isoliert und untersucht. Eine signifikante Änderung der Isotopenverhältnisse trat hierbei nicht auf. Daher kann man die Säulenchromatographie an Kieselgel als Fehlerquelle ausschließen und muss die starke Ähnlichkeit der Wasserstoff-Isotopenverhältnisse im Squalen natürlichen Prozessen zuschreiben. Eine mögliche Hypothese wäre, dass aufgrund der starken Diskriminierung im Verlauf der Squalenbiosynthese der Einfluss der verschiedenen Isotopenverhältnisse des Wassers am jeweiligen Standort relativiert wird und so annähernd konstante, stark abgereicherte Werte auftreten.

Im gravierenden Gegensatz hierzu stellten wir eine bemerkenswerte Schwankung der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse fest. Die Werte lagen zwischen $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -32,3$ und $-26,6$ ‰.

In Anbetracht der üblichen Messunsicherheit bei Kohlenstoff in Höhe von $0,2$ ‰ sind dies gewaltige Differenzen, die auf den ersten Blick ähnlich merkwürdig wie bei den Deuterium-Werten erscheinen. Eine mögliche Erklärung liefern neuere Untersuchungen von Affek und Yakir (2003) zur Biosynthese von Isopren (IPD/IPP). Die Autoren zeigten, dass die Isopren-Biosynthese nicht direkt an die Photosyntheserate gebunden ist; Isopren konnte noch stundenlang in CO_2 -freier Atmosphäre (Photosynthesehemmung!) nachgewiesen werden. Bei Gabe von unterschiedlich stark abgereichertem $^{13}\text{CO}_2$ fiel eine variable Diskriminierung auf, die stark auf das Vorhandensein einer alternativen Kohlenstoff-liefernden Quelle neben der Photosynthese hindeutet. Als Quelle konnte cytosolisches IPP sicher ausgeschlossen werden; diskutiert wurde die Rolle von Glucose als Kohlenstoffquelle. Da diese Quelle bis zu ca. 30 % des Kohlenstoffs beitragen kann und der daraus stammende Kohlenstoff relativ stark abgereichert (ca. -42 ‰ gegen VPDB, aber stets konstant) ist, könnten so die im Squalen nachgewiesenen, erheblichen Schwankungen der Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff gedeutet werden.

Gemäß dieser Hypothese läge der Grund für die schwankenden Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse in unterschiedlichen Photosyntheseraten begründet, die ihrerseits u.a. auch auf das Wetter zurückgehen. Es böte sich an, in weiteren Untersuchungen diesen postulierten

Zusammenhang konkret zu überprüfen, dennoch muss unabhängig davon leider festgestellt werden, dass eine Relevanz der Squalen-Isotopenverhältnisse im Hinblick auf die Beurteilung von Ölqualität oder Herkunft nicht gegeben ist.

3.5 Fettsäuremethylester (FSME)

Auf den ersten Blick mag es vielleicht unnütz erscheinen, die Stabilisotopenverhältnisse der Fettsäuremethylester von Palmitin- und Ölsäure zu bestimmen, da diese als Hauptkomponenten ja prinzipiell schon in die Messung des Gesamtöls einfließen und dort mengenmäßig dominieren. Der tiefere Sinn hinter dieser Idee war es jedoch, detailliertere Kenntnisse über die Isotopenverhältnisse der zwei wichtigsten Fettsäuren im Olivenöl zu erhalten. Da bei der Fettsäure-Biosynthese an die „virtuelle“, noch an den FAS-Komplex gebundene Palmitinsäure ein C_2 -Baustein hinzugefügt und nachfolgend desaturiert wird, müsste also eine Differenz in den Isotopenverhältnissen von Palmitin- und Ölsäure hierin begründet liegen. Es ist bekannt, dass die Desaturasen das leichtere Wasserstoffisotop bevorzugen; somit sind die ungesättigten Fettsäuren verglichen mit ihren Precursoren um einen gewissen Betrag abgereichert, und zwar an den Stellen, wo nun die Olefin-Funktion sitzt. Dies sollte sich auch auf die hier bestimmten globalen Isotopenverhältnisse auswirken. Problematisch ist die generell relativ hohe Messunsicherheit bei der Bestimmung der Wasserstoff-Isotopenverhältnisse (10 ‰). Liegt die durch Desaturasen bewirkte Abreicherung in diesem Bereich, so ist sie analytisch nicht sicher zu erfassen.

Eine weitere Problematik ist die Notwendigkeit, die Fettsäuren als Methylester zu vermessen (via HRGC-IRMS). Zwar erscheint dies trivial, aber bei Isotopenuntersuchungen sind an den Methylierungsschritt besondere Anforderungen zu stellen. Allenvoran muss die chemische Reaktion vollständig ablaufen, da es ansonsten zu Isotopendiskriminierungen bei der Methylierung kommen kann. Als Standard-Methoden böten sich die Methylierung mittels Diazomethan oder eine Veresterung mit kochendem Methanol an. Besonders letztere Methode hat einen gravierenden Nachteil: da man ja prinzipiell beweisen möchte, dass die nativen Öle kaltextrahiert sind (also nie über 27°C erhitzt wurden) und die Billigöle möglicherweise durch eine Desodorierung hingegen erhitzt wurden, ist es aus diesen prinzipiellen Erwägungen nicht angebracht, die Ölproben zu erhitzen. Möglicherweise gehen die Isotopen-Informationen dadurch verloren. Bei der hier durchgeführten heißen Veresterung zeigte sich zudem, dass aus der Ölsäure ihr trans-Isomer, die Elaidinsäure, zu einem beachtenswerten Prozentsatz entsteht. Da derartige Veränderungen (weil keine zu Ende geführte Umsetzung) wiederum Isotopendiskriminierungen bewirken könnten, wurde entschieden, die schonende Methylierung durch Trimethylsulfonium-Hydroxid-Lösung in Methanol zu versuchen. Es konnte bei allen Chargen gezeigt werden, dass die durch die Einführung der Methyl-Gruppe verursachte Änderung der Isotopenverhältnisse sich im Rahmen der Bestimmungsgenauigkeit von 10 ‰ bewegt und somit zu vernachlässigen ist. Der besondere Vorteil ist, dass die Proben nicht erhitzt werden müssen. Zusätzlich ist bekannt, dass die Reaktion unter den hier vorliegenden Bedingungen vollständig abläuft (Dron et al., 2004).

In Abb. 3.13 und 3.14 sind die mittels HRGC-P-IRMS ermittelten Wasserstoff-Isotopenverhältnisse für Ölsäuremethylester mit denen von Palmitinsäuremethylester korreliert. Die Wasserstoff-Isotopenwerte schwankten bei Palmitinsäuremethylester zwischen $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -95 \text{ ‰}$ und -156 ‰ , bei Ölsäuremethylester zwischen $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -107 \text{ ‰}$ und -157 ‰ . Es ist keine Clusterbildung in Abhängigkeit der Ölqualität erkennbar. Da meteorologische Faktoren ebenfalls einen Einfluss haben können, wurden die Öle auch nach Herkunft getrennt aufgetragen. Auf den ersten Blick ist eine Zuordnung nach Ländern nicht möglich; auffallend ist als Ausreißer ein australisches Öl, dessen Isotopenverhältnisse aus nicht bekannten Gründen deutlich abweichen. Die andere Probe aus Australien hatte jedoch unauffällige Werte. Auch wenn man die Isotopen-Niederschlagskarten der IAEA zu Hilfe nimmt (IAEA GNIP maps online), kann diese Abweichung nicht erklärt werden.

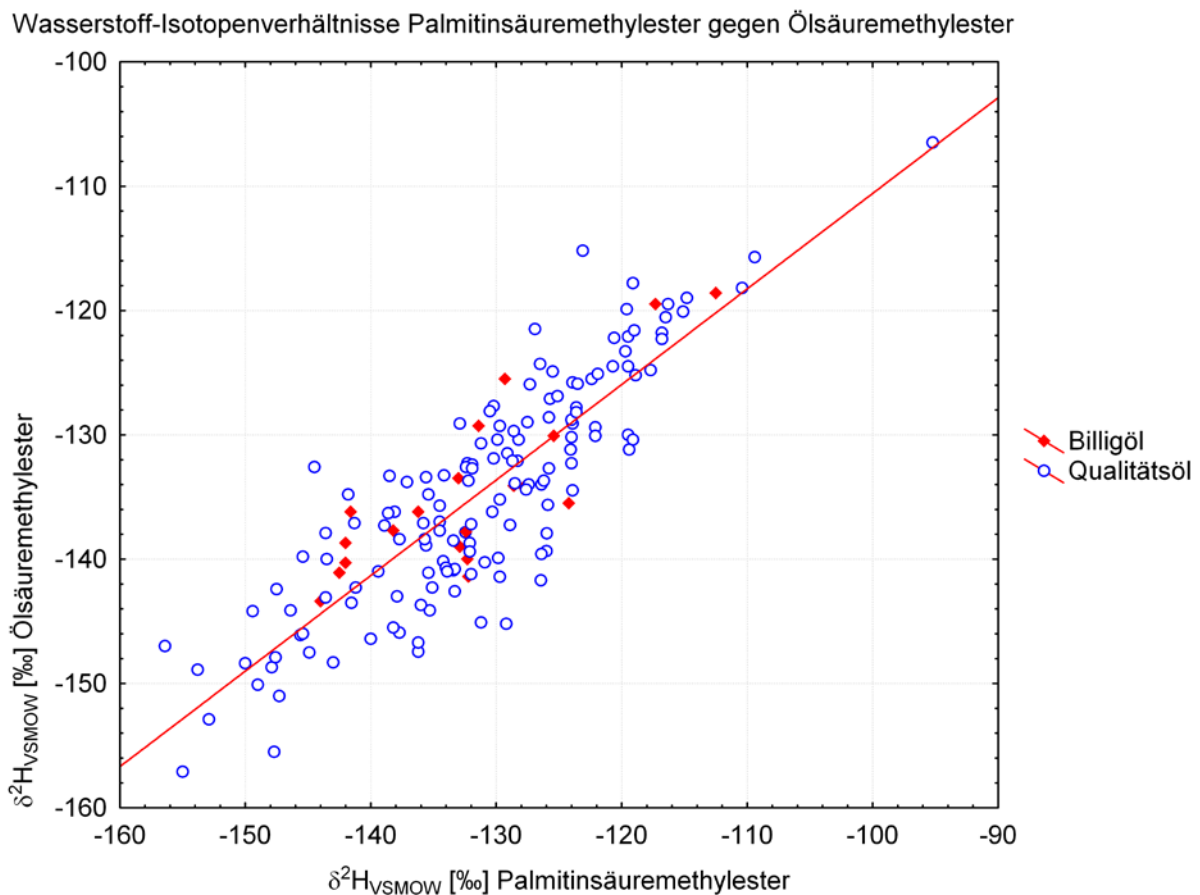


Abb. 3.13: Mittels HRGC-C/P-IRMS ermittelte Wasserstoff-Isotopenverhältnisse der Fettsäuremethylester von Palmitinsäure und Ölsäure, gekennzeichnet nach Ölqualität.

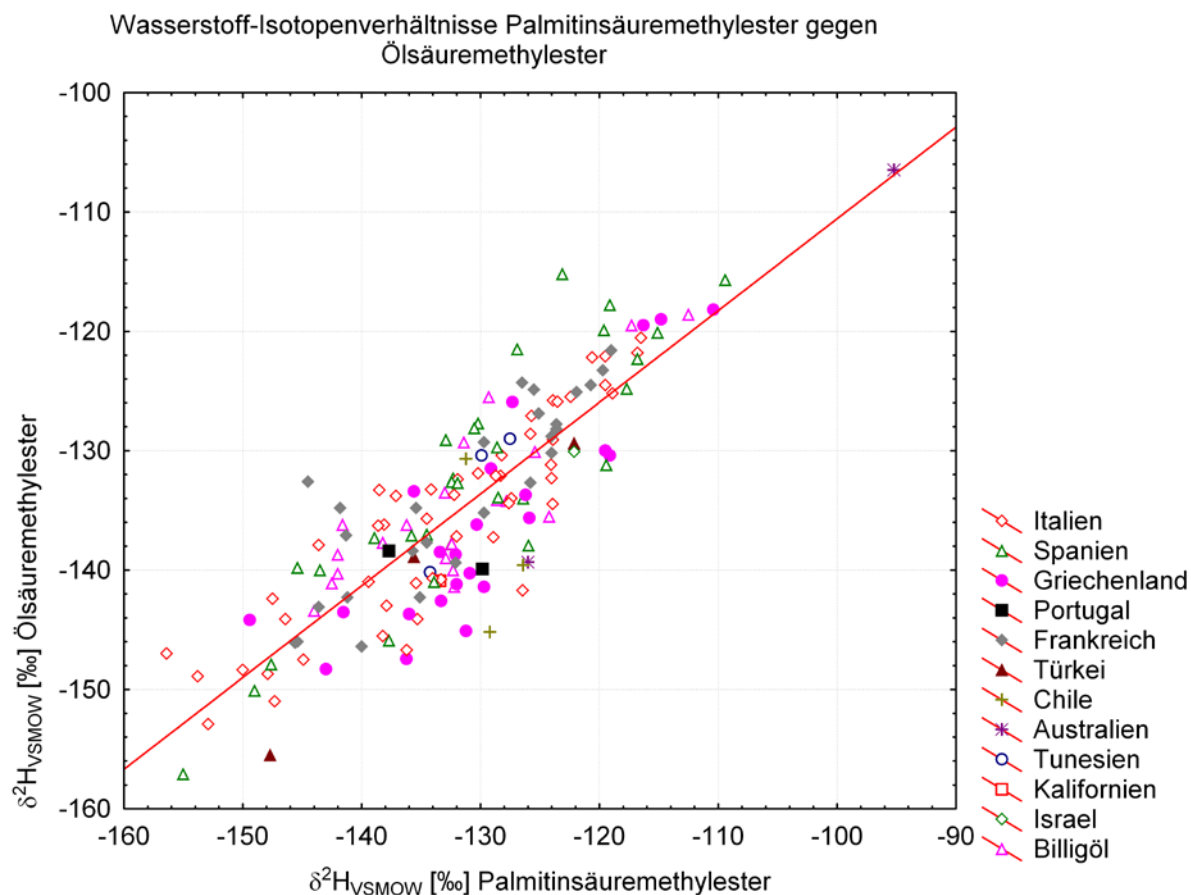


Abb. 3.14: Mittels HRGC-C/P-IRMS ermittelte Wasserstoff-Isotopenverhältnisse der Fettsäuremethylester von Palmitinsäure und Ölsäure, gekennzeichnet nach deklarierter Herkunft.

In die Abb. 3.13 und 3.14 wurde zudem noch eine rot gekennzeichnete Regressionsgerade eingezeichnet; dies soll keine direkte Wertung oder Soll-Linie darstellen, sondern Bezug nehmen auf die postulierte, leichte Abreicherung der Ölsäure verglichen mit der Palmitinsäure, die bei der Desaturierung auftritt. Daneben kann es noch zu einer Verschiebung der Isotopenverhältnisse durch die neu eingeführte C_2 -Gruppe bei der Verlängerung der Palmitinsäure kommen. Insofern sind hier beide Effekte überlagert. Eine Bestimmung der Isotopenverhältnisse der Stearinsäure in Olivenöl wäre interessant, scheitert aber an deren geringer Konzentration. Zwar könnte man theoretisch bei der Methylierung mit TMS-OH eine größere Menge Öl verwenden, jedoch würde dann die relativ hohe Konzentration der Palmitinsäure ein starkes Tailing verursachen, welches zwangsläufig die Stearinsäure überdecken würde. Hauptaugenmerk wurde deswegen auf die Methylester der Öl- und Palmitinsäure gelegt. Dazu wurde erstmals das schonende Verfahren der Methylierung mit TMS-OH angewandt. Aus den vorgenannten Gründen und aufgrund des bei Wasserstoff relativ hohen analytischen Fehlers (ca. 10 ‰) lässt sich die Abreicherung der Ölsäure verglichen mit der Palmitinsäure nicht immer nachweisen.

Für die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse existieren in der Literatur bereits ausreichend Daten; daher wurde entschieden, hier auf die Kohlenstoff-Untersuchung zu verzichten, nicht zuletzt auch wegen der nicht eindeutigen Ergebnisse für die Kohlenstoffwerte in Bezug auf die Erkennung von Verfälschungen. Spangenberg et al. (1998) postulierten, dass das Kohlenstoff-Isotopenverhältnis für Öl- und Palmitinsäure annähernd gleich sein muss, da sich die beiden Fettsäuren lediglich um eine Methylen-Gruppe unterscheiden. Dennoch fanden sich hiervon deutliche Abweichungen. Bereits seit 1982 ist aber bekannt, dass eine Abreicherung von ^{13}C an den olefinischen Positionen zumindest bei Hefe auftritt (Monson und Hayes, 1982a). Dies konnte auch bei einigen –wenn auch nicht allen- Olivenölen in der Untersuchung von Spangenberg et al. (1998) beobachtet werden; deutlicher fällt das Ergebnis bei Royer et al. (1999) aus. Interessant ist aber, dass hiervon nur Olivenöle betroffen zu sein scheinen. Demnach scheint das von Spangenberg und Mitarbeitern postulierte 1:1 Verhältnis der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse von Öl- und Palmitinsäure nicht haltbar. Für Wasserstoff wurde auch eine Variation der Isotopenverhältnisse der einzelnen C_2 -Gruppen in Abhängigkeit von der Kettenlänge nachgewiesen (Duan et al., 2002); es ist auch eine analoge Variabilität bei den Kohlenstoffwerten nicht völlig auszuschließen.

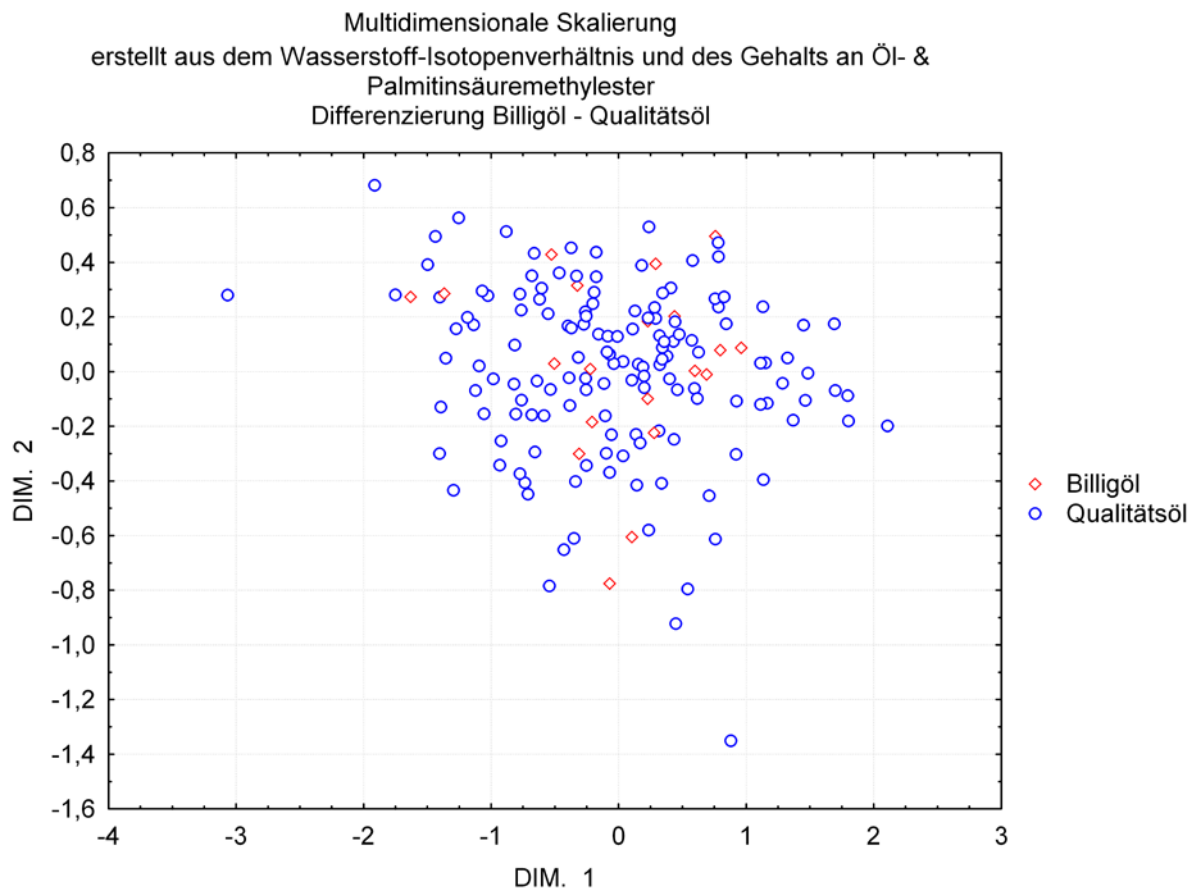


Abb. 3.15: Multidimensionale Skalierung der Wasserstoff-Isotopenverhältnisse der Fettsäuremethylester von Palmitinsäure und Ölsäure in Verbindung mit ihrem jeweiligen relativen Gehalt in der Probe, geordnet nach Ölqualität.

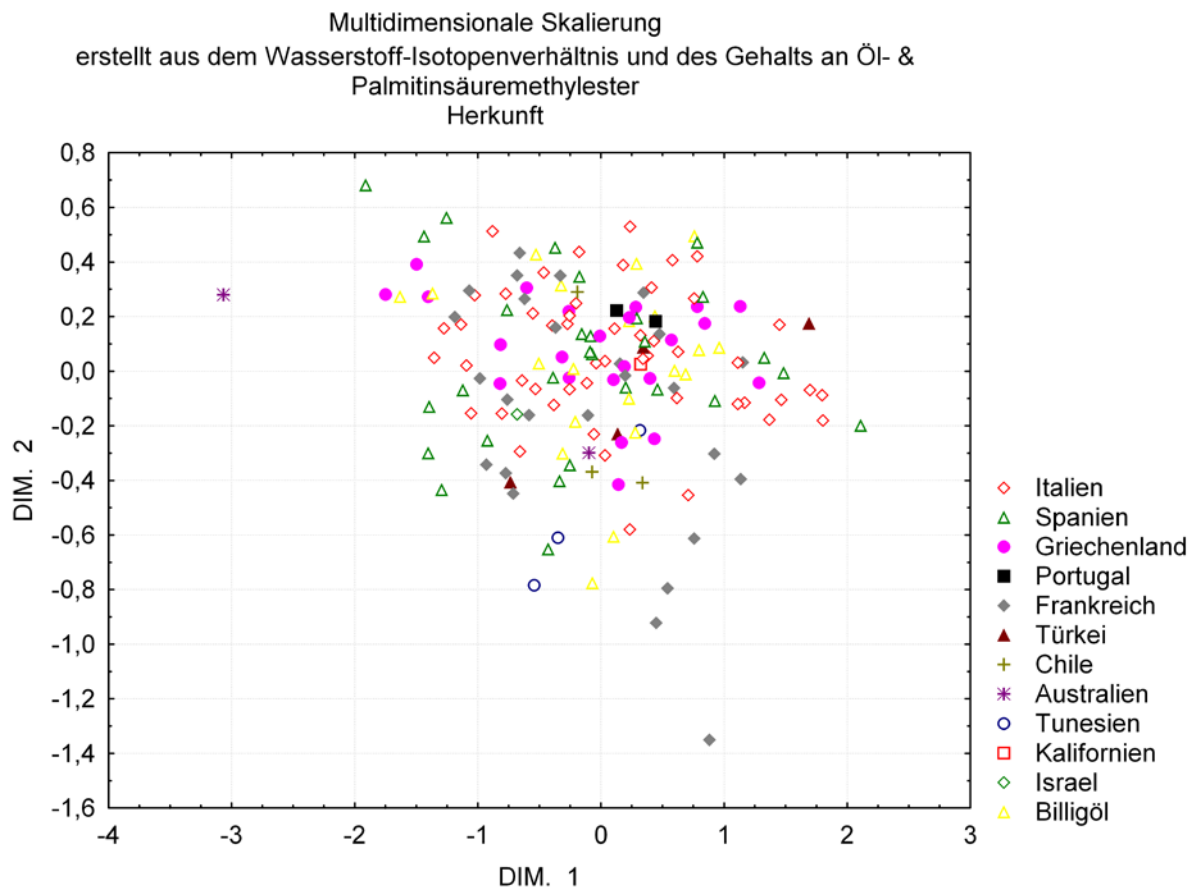


Abb. 3.16: Multidimensionale Skalierung der Wasserstoff-Isotopenverhältnisse der Fettsäuremethylester von Palmitinsäure und Ölsäure in Verbindung mit ihrem jeweiligen relativen Gehalt in der Probe, geordnet nach deklarierter Herkunft.

Abschließend wurde noch eine multidimensionale Skalierung aus den gemessenen Wasserstoff-Isotopenverhältnissen von Öl- und Palmitinsäuremethylester und ihren jeweiligen Konzentrationen im Öl erstellt (Abb. 3.15 und 3.16); damit sollte der Versuch unternommen werden, die Einflüsse der stets stärker schwankenden Konzentrationen der beiden Fettsäuren zu kompensieren. Die relativen Gehalte an Palmitinsäure lagen zwischen 15 % und 35 %, die der Ölsäure zwischen 39 % und 78 %. In den Abbildungen 3.15 und 3.16 sind somit vier Dimensionen auf zwei reduziert. Wiederum lässt sich erkennen, dass die Billigöle von den Qualitätsölen nicht zu unterscheiden sind, da die Werte breit gestreut liegen. Außerdem lassen sich die drei Hauptanbauländer Spanien, Italien und Griechenland ebenfalls nicht differenzieren. Die unterschiedlich hohe Konzentration der Ölsäure (und natürlich der anderen ungesättigten Fettsäuren) reflektiert in einem gewissen Maß die Temperatur des Anbauortes; ist diese hoch, so werden tendenziell weniger ungesättigte Fettsäuren gebildet (Aparicio und Luna, 2002).

3.6 Weitere statistische Betrachtung

Da die bisher ausgewerteten Einzelinformationen nicht ausreichten, um die geplante Differenzierung der Herkunft oder Ölqualität zu erreichen, wurden alle bisherigen Daten mittels multidimensionaler Skalierung gemeinsam verarbeitet und aus den erzeugten Daten ein zweidimensionales Diagramm erzeugt. Namentlich flossen in diese Auswertungen die Wasserstoff-, Kohlenstoff- und Sauerstoff-Isotopenverhältnisse des Gesamtöls sowie die Wasserstoff-Isotopenverhältnisse und relativen Konzentrationen von Palmitinsäure- und Ölsäuremethylester ein. Eine Untersuchung aller drei Elemente des Gesamtöls und die Bestimmung der Wasserstoff-Isotopenverhältnisse ausgewählter Fettsäuren ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden; auch die Anwendung der multidimensionalen Skalierung zur Auswertung dieser Daten ist neu. Der besondere Vorteil dabei ist, dass im Gegensatz zu anderen statistischen Verfahren keine besonderen Anforderungen an die Daten gestellt werden (wie zum Beispiel Normalverteilung). Insgesamt ist das angewandte Verfahren weniger komplex als beispielsweise eine Diskriminanzanalyse, aber hier genauso aussagekräftig und insgesamt betrachtet weniger fehleranfällig.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung zeigen die Abbildungen 3.17 und 3.18.

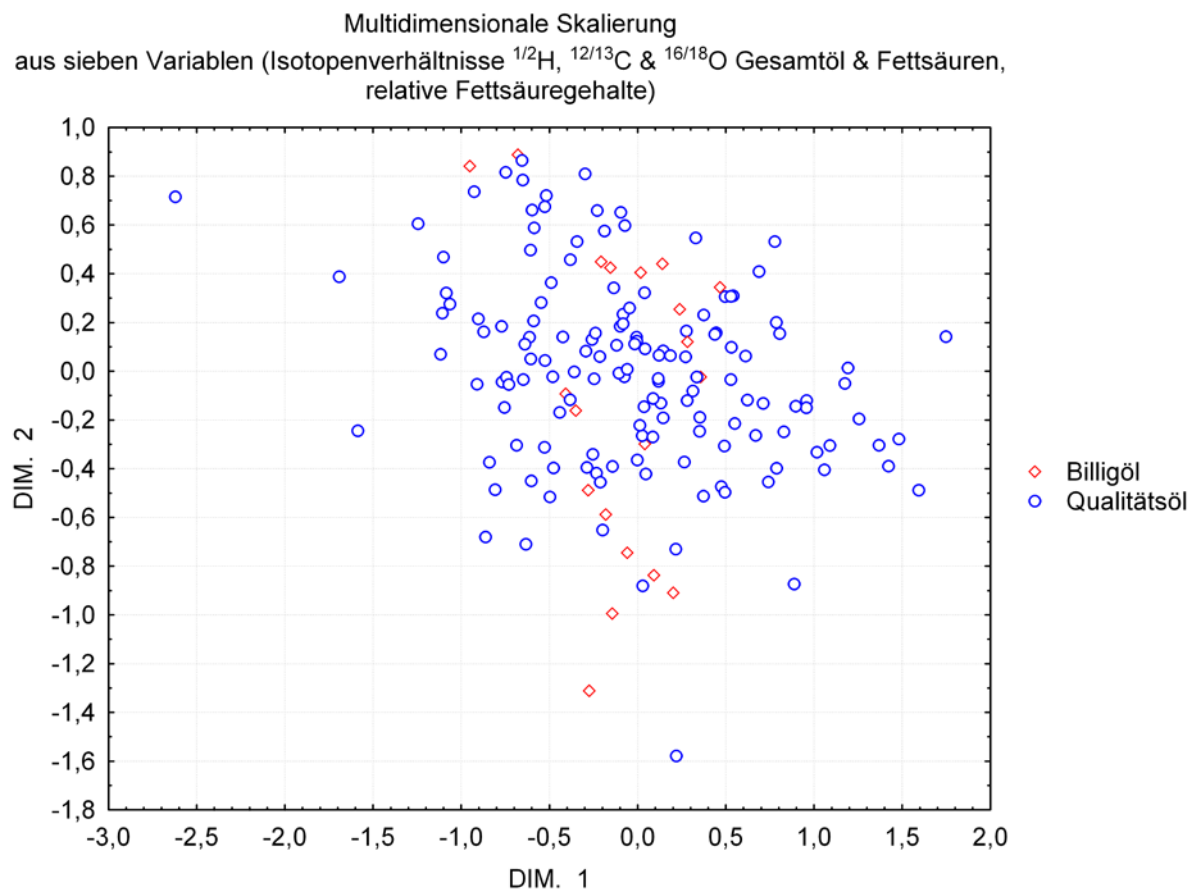


Abb. 3.17: Multidimensionale Skalierung aus den Wasserstoff-, Kohlenstoff- & Sauerstoff-isotopenverhältnissen des Gesamtöls, den Wasserstoff-Isotopenverhältnissen der Fettsäuremethylester von Palmitinsäure und Ölsäure und den jeweiligen relativen Gehalten dieser in der Probe geordnet nach Ölqualität.

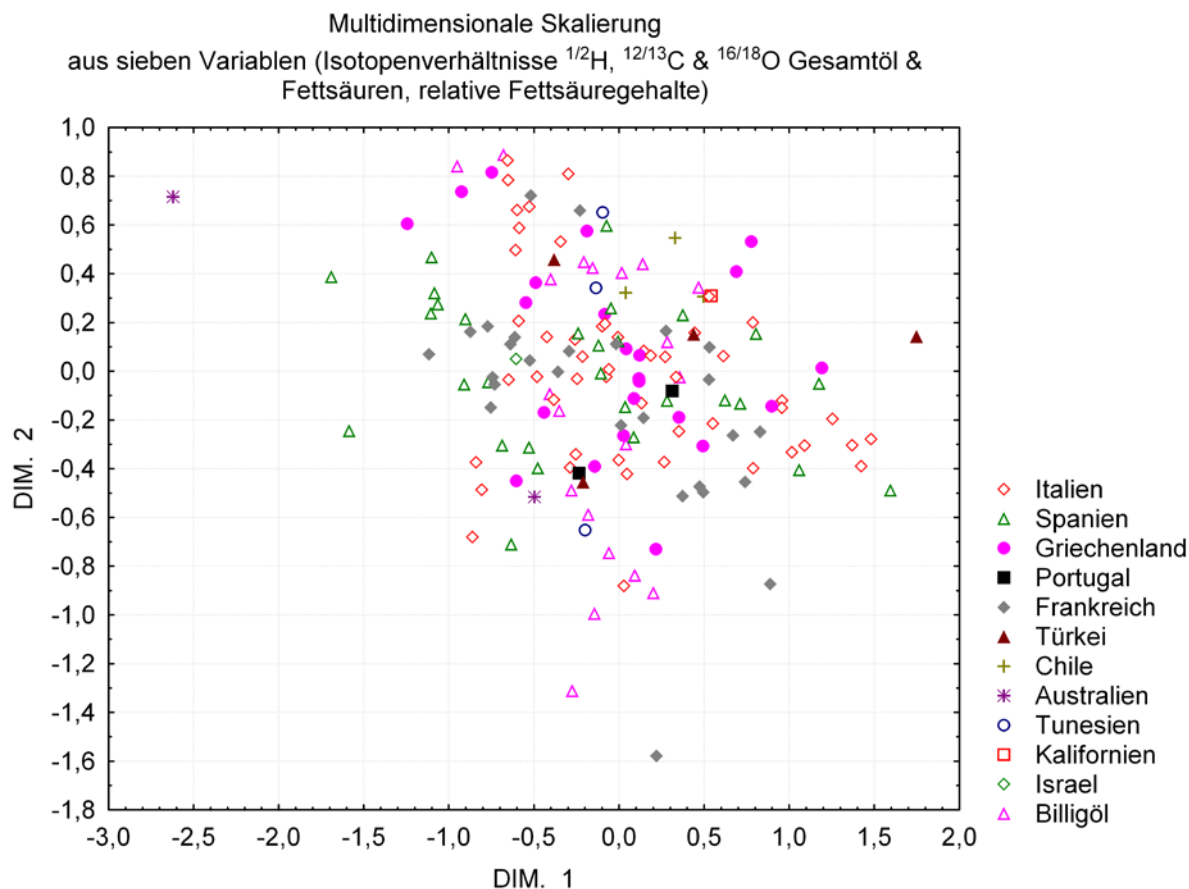


Abb. 3.18: Multidimensionale Skalierung aus den Wasserstoff-, Kohlenstoff- & Sauerstoff-isotopenverhältnissen des Gesamtöls, den Wasserstoff-Isotopenverhältnissen der Fettsäuremethylester von Palmitinsäure und Ölsäure und den jeweiligen relativen Gehalten dieser in der Probe geordnet nach deklarierter Herkunft.

Aus ihnen ergibt sich ein homogenes Bild; besondere Auffälligkeiten bei den Billigölen sind leider nicht zu beobachten; auch die Herkunftsfrage lässt sich nicht eindeutig klären, da alle Hauptanbauländer (Italien, Spanien, Griechenland und Frankreich) sich gleichmäßig über den Plot verteilen. Hier zeigt sich ein Problem, das aufgrund der bewussten Konzentration auf Handelsware auftritt: niemand kann garantieren, dass die auf der Verpackung deklarierte Herkunft wirklich stimmt. Möglicherweise wurden auch Qualitätsöle mit Ölen anderer Herkunft gestreckt. Nun kann man entgegen, dass man also –wie durchaus in einigen anderen Studien üblich (z.B. Aramendia et al., 2007)- die Olivenöle ausgehend vom Ölbaum unter gleichen Bedingungen selbst herstellen muss. Dies ist jedoch aus vielerlei Gründen nicht praktikabel: der Ölbaum trägt z.B. erst nach mehreren Jahren erstmals Oliven. Außerdem simuliert man damit nur einen einzelnen Anbauort für alle Öle und erhält sortenreine Olivenöle; dies entspricht aber nicht der Realität: die allermeisten Olivenöle sind eben nicht sortenrein und unterliegen dem Einfluss verschiedener Anbauorte. Würde man alle diese Faktoren vereinheitlichen, so kämen zwar andere Ergebnisse zustande, bei denen man in Kenntnis

der Anbaubedingungen sicherlich gewisse Aussagen anhand der Isotopenverhältnisse treffen kann, aber diese gehen leider an der Realität vorbei. Insofern war die Verwendung von Handelsware und der Versuch, Aussagen ohne Kenntnis der genauen Anbaubedingungen zu tätigen, im Kern der Problematik der Lebensmittelüberwachung orientiert.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien & Gase

Sofern nicht explizit erwähnt, stammten alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma, Acros, Merck, Roth, Aldrich und Fluka; es wurde, sofern verfügbar, Analysequalität bezogen. Die verwendeten Lösemittel (Methyl-tert. Butyl-Ether, Diethylether und Hexan) wurden zudem über lange Füllkörperkolonnen vor der Verwendung gereinigt. Identifikation der detektierten Verbindungen erfolgte anhand von Referenzverbindungen, die sich teilweise bereits in der Referenzensammlung des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie befanden.

Die verwendete Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung (TMS-OH) wurde von Fluka bezogen und enthielt ~0.25 M in Methanol.

Die Reinstgase wurden von der Firma Linde (München) und Air Liquid (Düsseldorf) bezogen. Dabei wurde als Trägergas für die IRMS-Analysen Helium 5.3 verwendet, zur Oxidation des Combustion-Reaktors diente Sauerstoff 5.0.

Die benötigten Isotopenstandards stammen von der Internationalen Atomenergiebehörde aus Wien (IAEA) und vom früheren National Bureau of Standards (NBS, Gaithersburg, Maryland, USA), das jetzt die Bezeichnung NIST trägt (National Institute of Standards and Technology).

Air Liquid lieferte die zertifizierten Referenzgase CO₂ und H₂ mit den definierten –aber Chargenvariablen- Isotopenverhältnissen $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -26,8 \text{ ‰}$ respektive $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -251 \text{ ‰}$. Zur Sauerstoffmessung diente CO der Firma Linde als Messgas (keine Zertifizierung möglich, Boudouard-Gleichgewicht!).

4.1.2 Verbrauchsmaterial Elementaranalysator

Die Firma HEKATech aus Wegberg lieferte sämtliches Zubehör für den Elementaranalysator. Darunter befanden sich Nickelwolle, Kohle, nickelbelegte Kohle, Glaskohlenstoffsplitter, Glaskohlenstoffrohre, Silberkapseln, Silberkartuschen, Zinnkartuschen, Zinnkapseln, gepackte Verbrennungsreaktoren und die mit Magnesiumperchlorat und ggf. Carbosorb gefüllten Wasserfallen.

4.1.3 Ölproben

Die 165 Olivenöle wurden im Lebensmitteleinzelhandel, Großhandel und auf Messen erworben. Drei dieser Öle wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Valotis direkt aus seiner griechischen Heimat zur Verfügung gestellt.

4.2 Geräte

4.2.1 Kapillargaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS)

HRGC/Interface:	Hewlett Packard 6890 Series
Injektor:	Split/splittless Injektor im Splitless Modus @ 250 °C
Injektionsvolumen:	1 µl via Autosampler
Autosampler:	CTC A 200 S (Zwingen, Schweiz)
Trennsäule:	J&W DB-WAX 60 Meter, 0,32 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke
Trärgas:	Helium 5.3 @ 2 ml/min
Temperaturprogramm:	50 °C//10 °C/min//180 °C//3 °C/min//220 °C/15 min
Kopplung:	offene Kopplung über Open-Split-Ventil
Interface:	Pyrolyse und Combustion Reaktoren
Pyrolysereaktor:	Al ₂ O ₃ 320 mm 1,5 mm, 0,5 mm i.D. @ 1440 °C
Combustionreaktor:	Al ₂ O ₃ 320 mm 1,5 mm, 0,5 mm i.D. mit Cu, Ni & Pt-Drähten @ 940°C und Reduktionsreaktor Al ₂ O ₃ 320 mm 1,5 mm, 0,5 mm i.D. mit Cu-Drähten @ 620°C
Wassereparator:	Nafion® Membran Permapure 200 mm 0,8 mm, 0,6 mm i.D. (Permapure, TomsRiver, NJ, USA)
IRMS:	Finnigan MAT Delta plus XL (Thermo Fischer, Dreieich)
Ionenquelle:	beheizt, Beschleunigungsspannung 3kV
Transferkapillaren:	unbeheizt, 1,5 m · 0,1 mm für Analyt, 1,5 m · 0,05 mm für Referenzgas
Ionisationsmethode:	Elektronenstoßionisation mit 70 eV bei 70 °C
Detektoren:	mehrere Faraday-Cups, bei HD: m/z= 2 und 3 für CO ₂ 44,45,46 und bei CO 28.29.30
Messbereich:	2-70 m/z

Datenauswertung und –erfassung erfolgten mit der Software Isodat NT Version 1.6.

4.2.2 Elementaranalysator

Gerätebezeichnung:	EuroEA 3000 Serie (EuroVector, Mailand, Italien) mit HT Sauerstoff-Analysator als 2-Ofen-System
Reaktor (Combustion):	Quarzrohr gefüllt mit Wolframoxid, Quarzwolle, Kupfer bei 1000 °C, Oxigenierung: Sauerstoff 5,5 Ventil für 8 s offen, Druck 15 kPa
Reaktor (Pyrolyse):	Keramikrohr mit innerem Glaskohlenstoffrohr gefüllt mit Kohlenstoffglassplittern, nickelbelegter Kohle und Nickelwolle bei 1440 °C
Detektor:	WLD/TCD
Trennsäule (Pyrolyse):	Molekularsieb 5 Å (1 m, 5 mm i.D.) 90 °C
Trennsäule (Combustion):	Poropak QS (2 m, 5 mm i.D.) 60 °C
Trärgas:	Helium 5,3 Drücke: 75 kPa (Combustion) und 70 kPa (Pyrolyse)
Kopplung:	offene Kopplung über Nadelventil
Autosampler:	Eurocap

4.2.3 Kapillargaschromatographie (HRGC-FID)

Gerätebezeichnung:	Hewlett-Packard HP 5890 series
Injektor:	Split/Splitless (1:20) Injektor bei 220 °C
Detektor:	FID
Trennsäule:	J&W DB-5 10 m, 0,25 mm i.D., 0,25 µm Filmdicke
Trärgas:	Helium 5,0 Fluss: 1 mL/min
Temperaturprogramm:	80°C/1min//30°C/min//120°C/1min//5°C/min// 320°C/10 min

4.2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Gerätebezeichnung:	Bruker WM 400 (400 MHz)
Lösemittel:	CDCl ₃

Die chemischen Verschiebungen relativ zum Standard werden in ppm angegeben

4.2.5 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometer I (HRGC-MS)

Gerätebezeichnung:	Agilent 6890
Autosampler:	Agilent 7683 Series Injector
Injektor:	Splitinjektion 1:20 Temp. 220 °C
Trennsäule:	J&W DB-Wax 30 M; 0,25 mm i.D., 0,25 µm Filmdicke
Trärgas:	Helium 5,0 Fluss: 2 mL/min
Temperaturprogramm:	50 °C//4 °C/Min//250°C, 15 min
Temperaturen:	Ionenquelle 150 °C, Transferline 250 °C
Ionisationsmethode:	Elektronenstoßionisation mit 70 eV
Kathodenstrom:	1,5 mA
Photomultiplier:	1300 V
Quellendruck:	$1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Massenbereich:	m/z 38-450

4.3 Methoden

4.3.1 Fraktionierung des unbehandelten Öls zur Isolierung von Squalen

In eine Chromatographiesäule mit 3,5 cm Innendurchmesser wird mit Hexan angeschlämmtes Kieselgel (Kieselgel 60, Marchery-Nagel, Korngröße 0,2-0,5 mm) bis zu einer Höhe von ca. 65 cm gefüllt. Die Säule wird mit Hexan konditioniert; sodann gibt man etwa 25 g Öl auf die Säule. Als Fraktionsgröße wurden 550 ml gewählt.

Es wird mit 100% rektifiziertem Hexan eluiert. Squalen findet sich –probenabhängig– in den Fraktionen Nr. 2-9. Die squalenhaltigen Fraktionen (GC-FID Kontrolle!) wurden vereinigt, und das Lösemittel wurde im Vakuum abgezogen; anschließend wurde unter Stickstoff abgeblasen. Die Reinheit des Squalens wurde jeweils durch HRGC-FID-Analysen und NMR-Analyse bestätigt.

Für die Prüfung der Reproduzierbarkeit wurde in o.g. Säule statt Olivenöl ein raffiniertes, squalenfreies Erdnussöl (13 g) gegeben, welches mit 50 µl Squalen Referenz von Aldrich mit bekanntem Isotopenverhältnissen versetzt war. Das gesamte Squalen wurde aus diesem Öl isoliert und konnte nun wieder mittels EA-IRMS vermessen werden (Reinheit ebenfalls durch HRGC-MS und NMR bestätigt).

In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass die Verwendung einer kleiner dimensionierten Säule nicht zu dem gewünschten Trennergebnis führt.

4.3.2 Isolierung der Wachse durch Säulenchromatografie

Im Anhang 1 der VO (EWG) Nr. 2568/91 findet sich eine Vorschrift zur Säulenchromatografie betreffend Quantifizierung des Wachsgehaltes. Es wurde exakt nach dieser Vorgabe verfahren:

15 Gramm Kieselgel werden in Hexan suspendiert und auf eine Säule gegeben, deren Innendurchmesser 15 mm und Höhe ca. 35 cm beträgt.

500 mg Olivenöl werden nun auf die Säule gegeben und mit 140 ml Lösemittelgemisch aus Hexan und Diethylether (Volumenverhältnis 99/1) eluiert. Tropfgeschwindigkeit 1,5 Tropfen pro Sekunde.

Das Eluat wird vom Lösemittel befreit und sollte neben den Wachsen auch Sterole enthalten, die anschließend gaschromatographisch bestimmt werden können.

4.3.3 Isolierung der Wachse durch Festphasenextraktion (SPE)

In Anlehnung an die von Reiter et al. (1999) beschriebene Methode wurde versucht, die Wachse zu isolieren. Dazu verfährt man folgendermaßen:

Eine Isolute® SPE Kartusche mit 1 g Silicagel und einem Fassungsvermögen von 6 ml wird mit ca. 20 ml Hexan in einer Vakuumapparatur konditioniert. Dann gibt man 30 µl Olivenöl gelöst in 500 µl Hexan auf die Kartusche und zieht die Probe mit einem Fluss von 2,5 ml/min durch die Extraktionskartusche. Trockenlaufen ist zu vermeiden.

Anschließend eluiert man die Wachse mit 10 ml Lösemittelgemisch aus Hexan und Diethylether (Volumenverhältnis 99/1). Das Lösemittel wird im Stickstoffstrom abgeblasen, und nach Lösen der Probe in 1 ml Hexan kann gaschromatographisch analysiert werden.

4.3.4 Herstellung der Fettsäuremethylester und Isotopenverhältnismessung über HRGC-P-IRMS

„Schnellmethylierung“ nach Arens et al. (1994)

Ölsäure:

Ca. 2 µl Probe werden im GC-Gläschen mit 875 µl tert. Butyl – Methyl – Ether (MTBE) versetzt. Dann werden 125 µl Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung zugegeben und 30 Sek. geschüttelt. Die so zubereitete Lösung wird direkt zur HRGC-IRMS-Messung verwendet.

Palmitinsäure:

Ca. 10 µl Probe werden mit 750 µl MTBE und 250 µl Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung versetzt, 30 Sek. geschüttelt und direkt in das HRGC-IRMS-System injiziert.

Prüfung auf Linearität der FSME:

Von den gekauften Referenzen Ölsäuremethylester und Palmitinsäuremethylester wurden jeweils 0,25 µl, 0,5 µl, 0,75 µl, 1,0 µl, 1,5 µl, 2 µl, 2,5 µl, 3,0 µl, 4,0 µl und 6 µl in ein GC Gläschen pipettiert. Dazu gibt man 250 µl Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung und 750 µl MTBE, schüttelt 30 Sek. und injiziert in das HRGC-IRMS-System.

4.3.5 Herstellung der Fettsäuremethylester und Isotopenverhältnismessung über HRGC-C-IRMS

„Schnellmethylierung“ nach Arens et al. (1994)

Ölsäure:

Ca. 0,5 µl Probe werden im GC-Gläschen mit 450 µl tert. Butyl – Methyl – Ether (MTBE) versetzt. Dann werden 100 µl Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung zugegeben und 30 Sek. geschüttelt. Die so zubereitete Lösung wird direkt zur HRGC-IRMS-Messung verwendet.

Palmitinsäure:

Ca. 1,5 µl Probe werden mit 450 µl MTBE und 200 µl Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung versetzt, 30 Sek. geschüttelt und direkt in das HRGC-IRMS-System injiziert.

4.3.6 Isolierung des Unverseifbaren mittels kalter Verseifung

10 g Öl wurden mit 40 ml 4 N ethanolischer KOH und unter kräftigem Schütteln ca. 24 Stunden lang verseift. Anschließend wurden 20 ml Ethanol hinzu gegeben und in einen Scheidetrichter überführt. Es wird dreimal mit je 100 ml *n*-Hexan ausgeschüttelt, wobei Emulsionen mit wenig Ethanol zerstört werden. Die vereinigten Hexanauszüge werden dreimal mit je 100 ml Wasser gewaschen und die Lösung anschließend über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Zur Überprüfung auf vollständige Verseifung wurde das isolierte Unverseifbare in MTBE gelöst, nach der Methode der Schnellmethylierung (siehe oben) methyliert und anschließend per HRGC-MS auf die Abwesenheit von FSME geprüft.

4.3.7 Isolierung des Unverseifbaren nach enzymatischer Hydrolyse

1 g Olivenöl wird in 0,5 mL *n*-Hexan gelöst und mit einer Lösung aus 0,5 g Lipase aus *Candida rugosa* in 50 mL Phosphatpuffer versetzt. Es wurde 10 Stunden in der Schüttelmaschine bei 27°C inkubiert. Am Ende wird die Reaktion mit 5 mL Aceton-Ethanol (1+1) gestoppt. Nachdem die Emulsion mit KOH alkalisch eingestellt ist, folgt die Aufarbeitung wie bei der kalten Verseifung nach Homberg 1993: Es werden 20 mL Ethanol hinzu gegeben, die

Lösung in einen Scheidetrichter überführt und der Kolben mit 70 mL Wasser nachgespült. Es wird dreimal mit je 100 mL *n*-Hexan ausgeschüttelt, wobei Emulsionen mit wenig Ethanol zerstört werden. Die vereinigten Hexanauszüge werden dreimal mit je 100 mL Wasser gewaschen und die Lösung anschließend über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

5. Literaturverzeichnis

- Abad, J. L., Camps, F., Fabrias, G.: Is hydrogen tunneling involved in acyl-CoA desaturase reactions? The case of a Δ^9 desaturase that transforms (E)-11-tetradecenoic acid into (Z,E)-9,11-tetradecadienoic acid, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3279-3281, 2000
- Abidi, S. L.: Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils, *J. Chromatogr. A*, **935**, 173-201, 2001
- Affek, H., Yakir, D.: Natural abundance carbon isotope composition of isoprene reflects incomplete coupling between isoprene synthesis and photosynthetic carbon flow, *Plant Physiol.*, **131**, 1727-1736, 2003
- Agnew, W., Popjak, G.: Squalene synthetase. Stoichiometry and kinetics of presqualene pyrophosphate and squalene synthesis by yeast microsomes, *J. Biol. Chem.*, **253**, 4566-4573, 1978
- Aitzetmüller, K.: Chlorophyll-Abbauprodukte in pflanzlichen Ölen, *Fat Sci. Technol.*, **91**, 99-105, 1989
- Alonso-Salces, R., Moreno-Rojas, J., Holland, M., Reniero, F., Guillou, C., Heberger, K.: Virgin olive oil authentication by multivariate analyses of ^1H NMR fingerprints and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ data, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 5586-5596, 2010
- Allouche, Y., Jimenez, A., Uceda, M., Aguilera, M., Gaforio, J., Beltran, G.: Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils from forty olive cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 3604-3610, 2009
- Alvarez, F.J., Ermer, J., Hübner, G., Schellenberger, A., Schowen, R.L.: Catalytic power of pyruvate decarboxylase. Rate-limiting events and microscopic rate constants from primary carbon and second hydrogen isotope effects, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8402-8409, 1991
- Amelio, M., Amelotti, G., Cozzoli, O., Faraone, A., Mariani, C., Mattei, A., Marzo, S., Morchio, G., Serani, A., Spinetti, M.: , *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **70**, 561-, 1993
- Amelio, M., Rizzo, R., Varazini, F.: Separation of stigmasta-3,5-diene squalene isomers, and wax esters from olive oils by single high-performance liquid chromatography run, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 527-530, 1998
- Amelotti, G., Daghetta, A., Ferrario, A.: Content and structure of partial glycerides in virgin olive oils: their evolution by different working process and preservation form, *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **66**, 681-692, 1989

-
- Andrikopoulos, N. K., Brueschweiler, H., Felber, H., Taeschler, C.: HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 359-364, 1991
 - Angerosa, F., Basti, C., Vito, R.: Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some italian cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 836-839, 1999b
 - Angerosa, F., Basti, C.: The volatile composition of samples from the blend of monovarietal olive oils and from the processing of mixtures of olive fruits, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **105**, 327-332, 2003
 - Angerosa, F., Breas, O., Contento, S., Guillou, C., Reniero, F., Sada, E.: application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1013-1017, 1999
 - Angerosa, F., Camera, L., Cumitini, S., Gleixner, G., Reniero, F.: Carbon stable isotopes and olive oil adulteration with pomace oil, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3044-3048, 1997b
 - Angerosa, F., Di Giacinto, L., d'Alessandro, N.: Quantitation of some flavor components responsible for the green attributes in virgin olive oil, *J. High. Resol. Chromatogr.*, **20**, 507-510, 1997b
 - Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R., Serraiocco, A.: Virgin olive oil differentiation in relation to extraction methodologies, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 2190-2195, 2000
 - Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G. F.: Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality, *J. Chromatogr. A*, **1054**, 17-31, 2004
 - Angerosa, F.: Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **104**, 639-660, 2002
 - AOCS: Official and tentative methods of the american oil chemists' society, American oil chemists' society, Champaign, IL, 4th edition, 1990, official method Ce 8
 - Aparicio, R., Aparicio-Ruiz, R.: Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques, *J. Chromatogr. A*, **881**, 93-104, 2000
 - Aparicio, R., Ferreiro, L., Leardi, R., Forina, M.: An approach for building decision rules by chemometric analysis. An application on olive oil, *Chemo. Intell. Lab. Syst.*, **10**, 149-358, 1991
 - Aparicio, R., Luna, G.: Characterisation of monovarietal virgin olive oils, *Eur. J. Sci. Technol.*, **104**, 614-627, 2002

-
- Aramendia, M., Marinas, A., Marinas, J., Moreno, J., Moalem, M., Rallo, L., Urbano, F.: Oxygen-18 measurement of andalusian olive oils by continuous flow pyrolysis/isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 487-496, 2007
 - Aramendia, M., Marinas, A., Marinas, J., Sanchez, J., Urbano, F., Guillou, C., Moreno Rojas, J., Moalem, M., Rallo, L.: A nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry study of andalusian olive oils, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 1457-1466, 2010
 - Arens, M., Schulte, E., Weber, K.: Fettsäuremethylester, Umesterung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (Schnellverfahren) - Gemeinschaftsarbeiten der DGF, 138. Mitteilung: Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, 105. Mitt.: Analyse von Fetten XXXI, *Fat Sci. Technol.*, **2**, 67-68, 1994
 - Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M.: Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10600-10605, 1997
 - Artajo, L., Romero, M., Morello, J., Motilva, M.: Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: Evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 6079-6088, 2006b
 - Artajo, L., Romero, M., Motilva, M.: Transfer of phenolic compounds during olive oil extraction in relation to ripening stage of the fruit, *J. Sci. Food Agric.*, **86**, 518-527, 2006a
 - Artho, A., Grob, K., Mariani, C.: On-line LC-GC for the analysis of the minor components in edible oils and fats – the direct method involving silylation, *Fat Sci. Technol.*, **95**, 176-180, 1993
 - Awad, A. B., Downie, A., Fink, C. S., Kim, U.: Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice, *Anticancer Res.*, **20**, 821-824, 2000
 - Balz, M., Schulte, E., Thier, H. P.: HPLC Separation of tocopherols and tocotrienols, *Fat Sci. Technol.*, **94**, 209-213, 1992
 - Barrie, A., Bricout, J., Koziat, J.: Gas chromatography – stable isotope ratio analysis at natural abundance level, *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 583-588, 1984
 - Bastic, M., Bastic, L., Jovanovic, J. A., Spiteller, G.: Hydrocarbons and other weakly polar unsaponifiables in some vegetable oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 886-891, 1978
 - Bauer-Christoph, C., Wachter, H., Christoph, N., Roßmann, A., Adam, L.: Assignment of raw material and authentication of spirits by gas chromatography, hy-

drogen- and carbon-isotope ratio measurements. Analytical methods and results of a study of commercial products, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, **204**, 445-452, 1997

- Behrouzian, B., Buist, P. H.: Mechanism of fatty acid desaturation: a bioorganic perspective, *Prostag. Leukotr. Ess.*, **68**, 107-112, 2003
- Bertolini, G., Prevost, G., Messeri, C., Carignani, G., Menini, V. G.: Olive germplasm: cultivars and world-wide collections, FAO, Rome, 1998
- Bianchi, G., Angerosa, F., Camera, L., Reniero, F., Anglani, C.: Stable carbon isotope ratios of olive oil components, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1936-1940, 1993
- Bilke, S., Mosandl, A.: Authenticity assessment of lavender oils using GC-P-IRMS: $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope ratios of linalool and linalyl acetate, *Eur. Food Res. Technol.*, **214**, 532-535, 2002
- Billault, I., Guiet, S., Mabon, F., Robins, R.: Natural deuterium distribution in long-chain fatty acids is nonstatistical: a site-specific study by quantitative ^2H NMR spectroscopy, *Chembiochem*, **2**, 425-431, 2001
- Blanch, G., Caja, M., Leon, M., Herraiz, M.: Determination of (E)-5-methylhept-2-en-4-one in deodorised hazelnut oil. Application to the detection of adulterated olive oils, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 140-144, 2000
- Boner, M., Förstel, H.: Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 301-310, 2004
- Bontempo, L., Camin, F., Larcher, R., Nicolini, G., Perini, M., Rossmann, A.: Coast and year effect on H, O and C stable isotope ratios of Tyrrhenian and Adriatic Italian olive oils, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 1043-1048, 2009
- Bortolomeazzi, R., Berno, P., Pizzale, L., Conte, L.: Sesquiterpene, alkene and alkane hydrocarbons in virgin olive oils of different varieties and geographical origins, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3278-3283, 2001
- Bréas, O., Fourel, F., Martin, G. J.: ^{13}C analysis of aromas and perfumes by a coupled GC-IRMS technique. The case of vanillin and leaf alcohol extracts, *Analysis*, **22**, 268-272, 1994
- Bricout, J.: Recherches sur le fractionnement des isotopes stables de l'hydrogène et de l'oxygène dans quelques végétaux, *Rev. Cytol. Biol. Végét.-Bot.*, **1**, 133-209, 1978
- Brown, G. D.: The biosynthesis of steroids and triterpenoids, *Nat. Prod. Rep.*, **15**, 653 – 696, 1998
- Bruni, U., Fiorino, P., Cortesi, N.: Influence of agricultural techniques, cultivar, and area of origin on characteristics of virgin olive oil and in levels of some of its minor components, *Olivae*, **53**, 28-34, 1994

-
- Burgoyne, T. W., Hayes, J. M.: Quantitative production of H₂ by pyrolysis of gas chromatographic effluents, *Anal. Chem.*, **70**, 5136-5141, 1998
 - Butte, W.: Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulphonium hydroxide for transesterification, *J. Chromatogr.*, **261**, 142-145, 1983
 - Caja-Lopez, M., Preston, C., Kempf, M., Schreier, P.: Flavor authentication studies of α -ionone, β -ionone and α -ionol from various sources, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 6700-6704, 2007
 - Camin, F., Larcher, R., Nicolini, G., Bontempo, L., Bertoldi, D., Perini, M., Schlicht, C., Schellenberg, A., Thomas, F., Heinrich, K., Voerkelius, S., Horacek, M., Ueckermann, H., Froeschl, H., Wimmer, B., Heiss, G., Baxter, M., Rossmann, A., Hoogewerff, J.: Isotopic and elemental data for tracing the origin of european olive oils, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 570-577, 2010a
 - Camin, F., Bontempo, L., Ziller, L., Piangiolino, C., Morchio, G.: Stable isotope ratios of carbon and hydrogen to distinguish olive oil from shark squalene-squalane, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 1810-1816, 2010b
 - Camin, F., Wietzerbin, K., Blanch Cortes, A., Haberhauer, G., Lees, M., Versinit, G.: Application of multielement stable isotope ratio analysis to the characterization of french, italian and spanish cheeses, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6592-6601, 2004
 - Camin, F., Bontempo, L., Heinrich, K., Horacek, M., Kelly, S. D., Schlicht, C., Thomas, F., Monahan, F. J., Hoogewerff, J., Roßmann, A.: Multi-element (H,C,N,S) stable isotope characteristics of lamb meat from different european regions, *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 309-320, 2007
 - Capella, P., Fedeli, E., Cirimele, H., Jacini, G.: Gli idrocarburi contenuti nella frazione insaponificabile di alcuni oli vegetali, *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **40**, 603-606, 1963
 - Caponio, F., Allogio, V., Gomes, T.: Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques, *Food Chem.*, **64**, 203-209, 1999
 - Catalano, M., Leonardis De, T., Comes, S.: Diacylglycerols in the evaluation of virgin olive oil quality, *Grasas Aceites*, **45**, 380-384, 1994
 - Cerretani, L., Motliva, M. J., Romero, M. P., Bendini, A., Lercker, G.: Pigment profile and chromatic parameters of monovarietal virgin olive oils from different italian cultivars, *Eur. Food Res. Technol.*, **226**, 1251-1258, 2008
 - Cert, A., Lanzon, A., Carelli, A. A., Albi, T., Amelotti, G.: Formation of stigmasta-3,5-diene in vegetable oils, *Food Chem.*, **49**, 287-293, 1994

-
- Cert., A., Moreda, W., Perez-Camino, M. C.: Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils, *J. Chromatogr. A*, **881**, 131-148, 2000
 - Chase, G. W., Akoh, C. C., Eitenmiller, R. R.: Analysis of tocopherols in vegetable oils by HPLC – comparison of fluorescence and evaporative light-scattering detection, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 877-880, 1994
 - Chikaraishi, Y., Naraoka, H., Poulson, S. R.: Carbon and hydrogen isotopic fractionation during lipid biosynthesis in a higher plant (*Cryptomeria japonica*), *Phytochemistry*, **65**, 323-330, 2004
 - Chikaraishi, Y., Naraoka, H.: $\delta^{13}\text{C}$ and δD relationships among three n-alkyl compound classes (n-alkanoic acid, n-alkane and n-alkanol) of terrestrial higher plants, *Org. Geochem.*, **38**, 198-215, 2007
 - Christeller, J. T., Laing, W. A., Troughton, J. H.: Isotope discrimination by ribulose-1,5-diphosphate carboxylase, *Plant Physiol.*, **57**, 580-582, 1976
 - Christoforidou, S., Dais, P., Tseng, L. H., Sparaul, M.: Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling HPLC with post-column solid phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR), *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4667-4679, 2005
 - Christoforidou, S., Spyros, A., Dais, P.: ^{31}P Nuclear magnetic resonance spectroscopy of polyphenol-containing olive oil model compounds, *Phosphorous, Sulfur, Silicon Relat. Elem.*, **170**, 139-157, 2001
 - Christophoridou, S., Dais, P.: Novel approach to the detection and quantification of phenolic compounds in olive oil based on ^{31}P NMR spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 656-664, 2006
 - Ciquanta, L., Esti, M., La Notte, E.: Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 1259-1264, 1997
 - Collister, J. W., Rieley, G., Stern, B., Elglinton, G., Fry, B.: Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms, *Organic Geochemistry*, **21**, 619-627, 1994
 - Conte, M. H., Weber, J. C., Carlson, P. J., Flanagan, L. B.: Molecular and carbon isotope composition of leaf wax in vegetation and aerosols in a northern prairie ecosystem, *Oecologia*, **135**, 67-77, 2003
 - Coors, U., Montag, A.: Stability of tocopherols in vegetable oils, *Fat Sci. Technol.*, **90**, 129-136, 1988
 - Cortesi, N., Azzolini, M., Rovellini, P.: *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **72**, 333-, 1995
 - Craig, H.: Isotopic variations in meteoric waters, *Science*, **133**, 1702-1703, 1961
 - Culp, R. A., Noakes, J. E.: Identification of isotopically manipulated cinnamic aldehyde and benzaldehyde, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1249-1255, 1990

-
- Cunha, S., Fernandes, J., Beatriz, M., Oliveira, P. P.: Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1146**, 136-138, 2007
 - Cunha, S., Oliveira, M. B. P. P.: Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD, *Food Chem.*, **95**, 518-524, 2006
 - Dansgaard, W.: Stable isotopes in precipitation, *Tellus*, **16**, 436-468, 1964
 - De Blas, O. J., Gonzalez, A. V.: Determination of sterols by capillary column gas chromatography. Differentiation among different types of olive oil: virgin, refined, and solvent-extracted, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 1685-1689, 1996
 - De Greyt, W. F., Petrauskaite, V., Kellens, M. J., Huyghebaert, A. D.: Analysis of tocopherols by gas-liquid and high-performance liquid chromatography: a comparative study, *Fett/Lipid*, **100**, 503-507, 1998
 - De Leonardis, A., Macciola, V., De Felica, M.: Rapid determination of squalene in virgin olive oils using gas-liquid chromatography, *Ital. J. Food Sci.*, **10**, 75-80, 1998
 - DeNiro, M. J., Epstein, S.: Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis, *Science*, **197**, 261-263, 1977
 - Deuser, W. G., Degens, E. T.: Carbon isotope fractionation in the system CO₂ (gas) – CO₂ (aqueous) – HCO₃⁻ (aqueous), *Nature*, **215**, 1033-1035, 1967
 - Dionisi, F., Prodoliet, J., Tagliaferri: Assessment of olive oil adulteration by RP-HPLC amperometric detection of tocopherols and tocotrienols, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 1505-1511, 1995
 - Downton, W. J. S., Grant, W. J. R., Robinson, S. P.: Photosynthetic and stomatal response of spinach leaves to salt stress, *Plant Physiol.*, **77**, 85-88, 1985
 - Dron, J., Linke, R., Rosenberg, E., Schreiner, M.: Trimethylsulfonium hydroxide as derivatization reagent für the chemical investigation of drying oils in works of art by gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1047**, 111-116, 2004
 - Duan, J. R., Billault, I., Mabon, F., Robins, R.: Natural deuterium distribution in fatty acids isolated from peanut seed oil: a site-specific study by quantitative ²H NMR spectroscopy, *Chembiochem*, **3**, 752-759, 2002
 - Eglinton, G., Hamilton, R.: Leaf epicuticular waxes, *Science*, **156**, 1322-1335, 1967
 - Ehleringer, J. R., Field, C. B., Lin, Z., Kuo, C.: Leaf carbon isotope and mineral composition in subtropical plants along an irradiance cline, *Oecologia*, **70**, 520-526, 1986

-
- Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M., Bacher, A.: The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms, *Chem. Biol.*, **5**, 221-233, 1998
 - Eisner, J., Iverson, J. L., Mozingo, A. K., Firestone, D.: Gas chromatography of unsaponifiable matter, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **48**, 417-420, 1965
 - Elss, S., Preston, C., Appel, M., Heckel, F., Schreier, P.: Influence of technological processing on apple aroma analysed by high resolution gas chromatography-mass spectrometry and online gas chromatography-combustion/pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry, *Food Chem.*, **98**, 269-276, 2006
 - Epstein, S., Mayeda, T.: variations of ^{18}O content of waters from natural sources, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **4**, 213-224, 1953
 - Estevez, J., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., Leon, P.: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants, *J. Biol. Chem.*, **276**, 2290-22909, 2001
 - Esti, M., Ciquanta, L., La Notte, E.: Phenolic compounds in different oil varieties, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 32-35, 1998
 - Evans, J. R., Sharkey, T. D., Berry, J. A., Farquhar, G. D.: Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO_2 diffusion in leaves of higher plants, *Aust. J. Plant Physiol.*, **13**, 281-292, 1986
 - Farquhar, G. D., O'Leary, M. H., Berry, J. A.: On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves, *Aust. J. Plant Physiol.*, **9**, 121-137, 1982
 - Fedeli, E.: In: Progress in chemistry of fats and other lipids, 15th ed., Pergamon Press, **57**, 1977
 - Ferreiro, L., Aparicio, R.: Influencia de la altitud en la composicion quimica de los aceites de oliva virgenes de Andalucia, *Grasas Aceites*, **43**, 149-155, 1992
 - Fiebig, H. J.: Qualität und Vermarktung von Olivenölen in der Europäischen Union, Max Rubner-Institut, Abteilung für Fettforschung, Münster, Publikation auf Institutswebseite, 2009
 - Fink, K., Richling, E., Heckel, F., Schreier, P.: Determination of $^2\text{H}/^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios of (E)-methyl cinnamate from different sources using isotope ratio mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3065-3068, 2004
 - Flanagan, L. B., Bain, J. F., Ehleringer, J. R.: stable oxygen and hydrogen isotope composition of leaf water in C_3 and C_4 plant species under field conditions, *Oecologia*, **88**, 394-400, 1991

-
- Fogel, M. J., Cifuentes, L. A.: Isotope fractionation during primary production, In: Engel, M. H., Macko, S. (Hrsg.): *Organic Geochemistry, Principles and Application*, Plenum Press, New York, 73-98, 1993
 - Fox, B. G., Shanklin, J., Jingyan, A., Loehr, T. M., Sanders-Loehr, J.: Resonance raman evidence for an Fe-O-Fe center in stearyl-ACP desaturase. Primary sequence identity with other diiron-oxo proteins, *Biochemistry*, **33**, 12776-12786, 1994
 - Franke, W.: *Nutzpflanzenkunde*, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1997
 - Freyer, H. D.: On the ^{13}C record in tree rings II, registration of microenvironmental CO_2 and anomalous pollution effects, *Tellus*, **31**, 308-312, 1979
 - Friedmann, I.: Deuterium content of natural waters and other substances, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **4**, 89-103, 1953
 - Fronimaki, P., Spyros, A., Christophoridou, S., Dais, P.: Determination of the diglycide content in greek virgin olive oils and some commercial olive oils by employing ^{31}P NMR spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2207-2213, 2002
 - Garcia, A., de Lucas, A., Rincon, J., Alvarez, A., Garcia, I., Garcia, M. A.: Super-critical carbon dioxide extraction of fatty and waxy material from rice bran, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 1127-1131, 1996
 - Gat, J. R.: Comments on the stable isotope method in the regional groundwater investigations, *Water Resour. Res.*, **7**, 980-993, 1971
 - Georgi, M., Voerkelius, S., Roßmann, A., Graßmann, J., Schnitzler, W. H.: Multi-element isotope ratios of vegetables from integrated and organic production, *Plant and Soil*, **275**, 93-100, 2005
 - Gertz, C., Herrmann, Z.: Analysis of tocopherols and tocotrienols in foods, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **174**, 390-394, 1982
 - Giovacchino di, L.: Technological aspects, In: Harwood, J., Aparicio, R. (Hrsg.): *Handbook of olive oil*, Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA, 2000, 17ff
 - Gleixner, G., Schmidt, H. L.: Carbon isotope effects on the fructose-1,6-bisphosphatealdolase reaction, Origin for non-statistical ^{13}C -distribution in carbohydrates, *J. Biol. Chem.*, **272**, 5382-5387, 1997
 - Godin, J., Fay, L., Hopfgartner, G.: Liquid chromatography combined with mass spectrometry for ^{13}C isotopic analysis in life science research, *Mass Spectrom Rev.*, **26**, 751-774, 2007
 - Goh, S. H., Gee, P. T.: Noncarotenoid hydrocarbons in palm oil and palm fatty-acid distillate, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63**, 226-230, 1986
 - Gordon, M., Miller, L. A. D.: Development of steryl ester analysis for the detection of admixtures of vegetable oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 505-510, 1997

-
- Grob, K., Lanfranchi, M., Mariani, C.: Determination of free and esterified sterols and of wax esters in oils and fats by coupled liquid chromatography-gas chromatograph, *J. Chromatogr.*, **471**, 397-405, 1989
 - Grob, K., Lanfranchi, M., Mariani, C.: Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 626-634, 1990
 - Guinda, A., Lanzon, A., Albi, T.: Differences in hydrocarbons of virgin olive oils obtained from several olive varieties, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1723-1726, 1996
 - Guitierrez-Rosales, F., Albi, M. A., Palma, R., Rios, J. J., Olias-Jimenez, J. M.: Bitter taste of virgin olive oil: Correlation of sensory evaluation and instrumental HPLC analysis, *J. Food Sci.*, **54**, 68-70, 1992
 - Gutierrez, R., Albi, M. A., Parma, R., Rios, J. J., Olias, J. M.: Bitter taste of virgin olive oil: Correlation of sensory evaluation and instrumental HPLC analysis, *J. Food Sci.*, **54**, 68-70, 1989
 - Habfast, K.: Advanced isotope ratio mass spectrometry I: Magnetic isotope ratio mass spectrometers, In: Platzner, I. T. (Hrsg.): Modern isotope ratio mass spectrometry, Band 145, In: Winefordner, J. D. (Hrsg.): chemical analysis (a series of monographs on analytical chemistry and its application), Wiley, Weinheim, 11-82, 1997
 - Hampel, D., Swatski, A., Mosandl, A., Wüst, M.: Biosynthesis of monoterpenes and norisoprenoids in raspberry fruits (*Rubus idaeus* L.): The role of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathway, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9296-9304, 2007
 - Harwood, J., Sanchez, J.: Lipid biosynthesis in olives, In: Harwood, J., Aparicio, R. (Hrsg.): Handbook of olive oil, Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA, 2000, 61ff
 - Hayes, J. M.: Fractionation of the isotopes of carbon and hydrogen in biosynthetic processes, In: Valley, J. W., Cole, D. R. (Hrsg.): stable isotope geochemistry, Reviews in mineralogy and geochemistry, Mineralogical Society of America, Washington, DC, USA, **43**, 225-277, 2001
 - Hener, U., Brand, W. A., Hilker, A. W., Juchelka, D., Mosandl, A., Podebrad, F.: Simultaneous on-line analysis of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios of organic compounds using GC-pyrolysis-IRMS, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **206**, 230-232, 1998
 - Henon, G.: Analysis of sunflower oil waxes by chromatography, *Rev. Fr. Corps Gras*, **33**, 475-482, 1986

-
- Hilkert, A. W., Douthitt, C. B., Schlüter, H. J., Brandt, W. A.: Isotope ratio monitoring gas chromatography / mass spectrometry of D/H by high temperature conversion isotope mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 1226-1230, 1999
 - Hoeffler, J. F., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M.: Synthesis of tritium labelled 2-C-methyl-D-erythritol, a useful substrate for the elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis, *Tetrahedron Lett.*, **41**, 4885-4889, 2000
 - Hoefs, J.: Stable isotope geochemistry, Springer, Berlin, 1973
 - Hoeven van der, R., Steffens, J.: Biosynthesis and Elongation of short- and medium-chain-length fatty acids, *Plant Physiol*, **122**, 275-282, 2000
 - Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., König, T., Schreier, P.: $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratio analysis of flavor compounds by on-line gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry (HRGC-P-IRMS): Citral, *Flav. Fragr. J.*, **16**, 344-348, 2001b
 - Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., König, T., Schreier, P.: Flavor authenticity studies by $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratio determination using on-line gas chromatography pyrolysis isotope ratio mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 21-25, 2001a
 - Hör, K.: Authentizitätskontrolle von Aromastoffen: $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Analytik mittels on-line Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS) als Baustein einer Multielement-Isotopenverhältnisanalyse, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2001
 - Hunter, W. N.: The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, **282**, 21573-21577, 2007
 - Hümmer, W.: Analyse potentiell chemopräventiv wirksamer Inhaltsstoffe von Apfelsaft, Dissertation Universität Würzburg, 2009
 - IAEA GNIP maps abgerufen unter:
www-naweb.iaea.org/napc/ih/documents/userupdate/Waterloo/index.html
 - IUPAC: Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell, Oxford, 7th edition, 1987, Method 2432
 - Ivlev, A. A.: Carbon isotope effects ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in biological systems, *Sep. Sci. Technol.*, **36**, 1819-1914, 2001
 - Iyer, S., Millar, T., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, M., Taylor, D., Kunst, L. in: Sanchez, J., Cerda-Olmedo, E., Martinez-Force, E. (Hrsg.): Advances in plant lipid research, Universidad de Sevilla, Seville, 87, 1998

-
- Jamin, E., Martin, F., Santamaria-Fernandez, R., Lees, M.: Detection of exogenous citric acid in fruit juices by stable isotope ratio analysis, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5130-5133, 2005
 - Jarstfer, M., Blagg, B., Rogers, D., Poulter, C.: Biosynthesis of squalene. Evidence for a tertiary cyclopropylcarbinyl cationic intermediate in the rearrangement of presqualene diphosphate to squalene, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 13089-13090, 1996
 - Jaspersen, H., Ronnes, H.: Some unsaponifiable constituents of the deodorisation distillates of vegetable oils, *J. Soc. Chem. Ind.*, **66**, 13-17, 1947
 - Jennings, S., Tsay, Y., Fisch, T., Robinson, G.: Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6038-6024, 1991
 - Jong, A., Plat, J., Mensink, P.: Metabolic effects of plant sterols and stanols, *J. Nutr. Biochem.*, **14**, 362-369, 2003
 - Juchelka, D., Mc Cullagh, J. S. O.: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis-analyse von Aminosäuren aus Hydrolysaten des Knochenkollagens durch HPLC-IRMS: Eine neue Methode zur direkten Kopplung von HPLC mit Isotopenverhältnismassenspektroskopie (IRMS), *Lebensmittelchemie*, **61**, 130-131, 2007
 - Jung, J., Puff, B., Eberts, T., Hener, U., Mosandl, A.: Reductive ester cleavage of acyl glycerides – GC-C/P-IRMS measurements of glycerol and fatty alcohols, *Eur. Food Res. Technol.*, **225**, 191-197, 2007
 - Jung, J., Sewenig, S., Hener, U., Mosandl, A.: Comprehensive authenticity assessment of lavender oils using multielement/multicomponent isotope ratio mass spectrometry analysis and enantioselective multidimensional gas chromatography-mass spectrometry, *Eur. Food Res. Technol.*, **220**, 232-237, 2005
 - Kaluna, C., Bedgood, D., Prenzler, P.: Development of a headspace solid phase microextraction – gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extended time-course experiments of olive oil, *Anal. Chim. Acta*, **556**, 407-414, 2006
 - Kamal, A. E., Määttä, K., Toivo, J., Lampi, A. M., Piironen, V.: Acid-catalyzed isomerization of fucosterol and Δ^5 -avenasterol, *Lipids*, **33**, 1073-1077, 1998
 - Kaunzinger, A., Juchelka, D., Mosandl, A.: Progress in the authenticity assessment of vanilla I: Initiation of authenticity profiles, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1752-1757, 1997
 - Keeling, C. D., Mook, W. G., Tans, P. P.: Recent trends in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of the atmospheric carbon dioxide, *Nature*, **277**, 121-123, 1979

-
- Kelly, S., Rhodes, C.: Emerging techniques in vegetable oil analysis using stable isotope ratio mass spectrometry, *Grasas y Aceites*, **53**, 34-44, 2002
 - Kiosseoglou, V., Boskou, D.: separation and fatty-acid composition of stearyl and wax esters in hexane extracts of sunflower seed, soybeans and tomato seeds, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **23**, 340-342, 1990
 - Kiritsakis, A. K.: Flacor components of olive oil – A review, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 673-681, 1998
 - Kitchcock, C., Nichols, B.: *Plant Lipid Biochemistry*, Academic Press, New York, 176, 1971
 - Kluge, M., Brulfert, J., Rauh, W., Ravelomanana, D., Ziegler, H.: Ecophysiological studies on the vegetation of Madagascar: A $\delta^{13}\text{C}$ and δD survey for incidence of crassulacean acid metabolism (CAM) among orchids from montane forests and succulents from the xerophytic thorn-bush, *Isotopes Environ. Health Stud.*, **31**, 191-210, 1995
 - Kolattukudy, P. E.: Biosynthesis of surface lipids, *Science*, **159**, 498-505, 1968
 - Kolattukudy, P.: *Chemistry and biochemistry of natural waxes*, Elsevier, Amsterdam, 1976
 - Kongduang, D., Wungsintaweekul, J., Wachchai, D. E.: Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*, *Tetrahedron Lett.*, **49**, 4067-4072, 2008
 - Kroll, H., Friedrich, J., Menzel, M., Schreier, P.: Carbon and hydrogen stable isotope ratios of carotenoids and beta-carotene-based dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 4198-4204, 2008
 - Lange, B., Croteau, R.: Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint, *Arch. Biochem. Biophys.*, **365**, 170-174, 1999
 - Lanzon, A., Albi, T., Cert, A., Gracian, J.: The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 285-291, 1994
 - Lanzon, A., Cert, A., Albi, T.: Detection of refined olive oil in virgin olive oil, *Grasas Aceites*, **40**, 385-388, 1989
 - Lauw, S., Illarionova, V., Bacher, A., Rohdich, F., Eisenreich, W.: Biosynthesis of isoprenoids – studies on the mechanism of 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate synthase, *FEBS J.*, **275**, 4060-4073, 2008

-
- Lechner, M., Reiter, B., Lorbeer, E.: Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis, *J. Chromatogr. A*, **857**, 231-238, 1999
 - Lercker, G., Rodriguez-Estrada, M. T.: Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing foods, *J. Chromatogr. A*, **881**, 105-129, 2000
 - Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J. C., Loerquin, J., Delattre, M., Simon, J. L., Asther, M., Labat, M.: Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems, *Food Chem.*, **75**, 501-507, 2001
 - Lesaint, C., Merlivat, L., Bricout, J., Fontes, J. C., Gatheret, R.: Sur la composition en isotopes stables de l' eau de la tomate et du maïs, *C. R. Acad. Sci., Paris*, **D278**, 2925-2930, 1974
 - LoGrasso, P., Soltis, D., Boettche, B.: Overexpression, Purification, and Kinetic Characterization of a Carboxyl-Terminal-Truncated Yeast Squalene Synthetase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **307**, 193-199, 1993
 - Lu, A. T., Jiang, Y., chen, F.: Determination of squalene using high-performance liquid chromatography with diode array detection, *Chromatographia*, **59**, 367-374, 2004
 - Luchetti, F.: Introduction, In: Harwood, J., Aparicio, R. (Hrsg.): Handbook of olive oil, Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA, 2000, 1ff
 - Luchetti, F.: Introduction, In: Harwood, J., Aparicio, R. (Hrsg.): Handbook of olive oil, Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA, 2000, 1ff
 - Luna, G., Morales, M. T., Aparicio, R.: Characterisation of 39 varietal olive oils by their volatile compositions, *Food Chem.*, **98**, 243-252, 2006
 - Luo, Y., Sternberg, L., Suda, S., Kumazawa, S., Mitsui, A.: Extremely low D/H ratios of photoproduced hydrogen by cyanobacteria, *Plant Cell Physiol.*, **32**, 897-900, 1991
 - Luo, Y., Sternberg, L.: Deuterium heterogeneity in starch and cellulose nitrate of CAM and C₃ plants, *Phytochem.*, **30**, 1095-1098, 1991
 - Mariani, C., Bellan, G., Morchia, A., Pellegrino, A.: I componenti minori liberi ed esterificati della olio di oliva della olio di nocciola: loro possibile utilizzo nella individuazione di commistioni. Nota 1, *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **76**, 59-62, 1999
 - Mariani, C., Bellan, G.: , *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **73**, 533-, 1996
 - Mariani, C., Fedeli, E., Grob, K.: , *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **68**, 233-, 1991
 - Mariani, C., Fedeli, E.: , *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **63**, 3-, 1986
 - Mariani, C., Fedeli, E.: Minor components of vegetable oils: non-glyceirdic esters, *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **66**, 397-401, 1989

-
- Mariani, C., Lanzani, A., Fedeli, E.: , *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **66**, 13-, 1987
 - Mariani, C., Venturini, S., Grob, K.: , *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **72**, 173-, 1995
 - Mariani, C., Venturini, S.: , *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **73**, 489-, 1996
 - Marlier, J. F., O'Leary, M. H.: Carbon kinetic isotope effects on the hydration of carbon dioxide and the dehydration of bicarbonate ion, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 5054-5057, 1984
 - Martin, B., Sutherland, E. K.: Air pollution in the past recorded in width and stable carbon isotope composition of annual growth rings of Douglas-fir, *Plant Cell Environ.*, **13**, 839-844, 1990
 - Martin, G. J., Martin, M. L.: Climate significance of isotope ratios, *Phytochem. Reviews*, **2**, 179-190, 2003
 - Martin, G. J., Martin, M. L.: Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high field quantitative ^2H NMR, *Tetrahed. Lett.*, **22**, 3525-3528, 1981
 - Matthews, D. E., Hayes, J.M.: Isotope ratio monitoring gas chromatography mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **50**, 1465-1473, 1978
 - Mc Gill, A. S., Moffat, C. F., Mackie, P. R., Cruickshank, P.: The composition and concentration of n-alkanes in retail samples of edible oils, *J., Sci. Food Agric.*, **61**, 357-362, 1993
 - Mc Innes, A. G., Walker, J. A., wright, J. L. C.: Regiochemical distribution of deuterium during fatty acid biosynthesis following incorporation of $[2-^{13}\text{C}, 2-^2\text{H}_3]$ acetate: A ^{13}C NMR study of exchange, desaturase and enoyl reductase stereospecificities in three algae and a yeast, *Tetrahedron*, **39**, 3515-3522, 1983
 - Meier-Augenstein, W.: Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **842**, 351-371, 1999
 - Melzer, E., Schmidt, H. L.: Carbon isotope effects on the pyruvate-dehydrogenase reaction and their importance for relative C-13 depletion in lipids, *J. Biol. Chem.*, **262**, 8159-8164, 1987
 - Minguéz-Mosquera, M. I., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L.: Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 60-63, 1992
 - Monson, K. D., Hayes, J. M.: Biosynthetic control of the natural abundance of carbon 13 at specific positions within fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **282**, 5568-5575, 1982b
 - Monson, K. D., Hayes, J. M.: Carbon isotopic fractionation in the biosynthesis of bacterial fatty acids. Ozonolysis of unsaturated fatty acids as a means of determining the intramolecular distribution of carbon isotopes, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **46**, 139-149, 1982a

-
- Montedoro, G. F., Garofolo, L.: The qualitative characteristics of virgin olive oils. The influence of variables such as variety, environment, preservation, extraction, conditioning of the finished product, *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **61**, 157-168, 1984
 - Montedoro, G. F., Servili, M., Baldioli, M., Seboaggini, E., Miniati, J., Maccioni, A.: Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 2228-2234, 1993
 - Montedoro, G., servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E.: Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction and, separation and semiquantitative evaluation by HPLC, *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1571-1576, 1992
 - Mook, W. G., Bommerson, J. C., Staverman, W. H.: Carbon isotope fraction between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide, *Earth Planet. Sci. Letters*, **22**, 169-176, 1974
 - Mookhtiar, K., Kalinowski, S., Zhang, D., Poulter, D.: Yeast squalene synthase. A mechanism for addition of substrates and activation by NADPH, *J. Biol. Chem.*, **269**, 11201-11207, 1994
 - Morales, M. T., Aparicio, R., Calvente, J. J.: Influence of olive ripeness on the concentration of green aroma compounds in virgin olive oil, *Flavour Fragr. J.*, **11**, 171-178, 1996
 - Morales, M., Przybylski, R.: Olive oil oxidation, In: Harwood, J., Aparicio, R. (Hrsg.): Handbook of olive oil, Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA, 2000, 459ff
 - Morales, M., Rios, J., Aparicio, R.: Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: Flavors and off-flavors, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2666-73, 1997
 - Morales, M., Tsimidou, M.: The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality, In: Harwood, J., Aparicio, R. (Hrsg.): Handbook of olive oil, Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA, 2000, 393ff
 - Moreda, W., Perez-Camino, M. C., Cert, A.: Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils, *J. Chromatogr. A*, **936**, 159-171, 2001
 - Morris, L. J., Harris, R. V., Kelly, W., James, A. T.: The stereochemistry of desaturation of long-chain fatty acids in *Chlorella vulgaris*, *Biochem. J.*, **109**, 673-678, 1968
 - Mosandl, A.: Authenticity assessment: A permanent challenge in food flavor and essential oil analysis, *J. Chromatogr. Sci.*, **42**, 440-449, 2004

-
- Mousa, Y. M., Gerasopoulos, D., Metzidakis, I., Kiritsakis, A.: Effect on altitude on fruit and oil quality characteristics of „Mastoides“ olives, *J. Sci. Food Agric.*, **71**, 345-350, 1996
 - Munos, J., Pu, X., Mansoorabadi, S., Kim, H. J., Liu, H.: A secondary kinetic isotope effect study of the 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase-catalyzed reaction: evidence for a retroaldol-aldol rearrangement, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 2048-2049, 2009
 - Murkovic, M., Lechner, S., Pietzka, A., Bratacos, M., Katzogiannos, E.: Analysis of minor components in olive oil, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **61**, 155-160, 2004
 - Murphy, D. J.: Structure, Function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants, *Prog. Lipid Res.*, **32**, 247-280, 1993
 - Musciaio, F., Carlson, J., Kuehl, L., Rilling, H.: Presqualene Pyrophosphate: a normal intermediate in squalene biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, **249**, 3746-3749, 1974
 - Naraoka, H., Chikaraishi, Y.: Organic hydrogen-carbon isotope signatures of terrestrial higher plants during biosynthesis for distinctive photosynthetic pathways, *Geochem. J.*, **35**, 451-458, 2001
 - Nenadis, N., Tsimidou, M.: Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 257-259, 2002
 - Newmark, H. L.: Squalene, olive oil, and cancer risk: A review and critical hypothesis, *Cancer Epidem. Biom.*, **6**, 1101-1103, 1997
 - Nota, G., Naviglio, D., Romano, R., Sabia, V., Spagna-Musso, S., Improta, C.: Determination of the Wax Ester Content in Olive Oils. Improvement in the Method Proposed by EEC Regulation 183/93, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 202-205, 1999
 - O'Leary, M. H.: Carbon isotope fractionation in plants, *Phytochem.*, **20**, 553-567, 1981
 - Ogrinc, N., Kosir, I., Spangenberg, J., Kidric, J.: the application of NRM and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review, *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**, 424-430, 2002
 - Okogeri, O., Tasioula-Margari, M.: Changes occurring in phenolic compounds and α -tocopherol of virgin olive oil during storage, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1077-1080, 2002
 - Olias, J., Perez, A., Rios, J., sanz, L.: Aroma of virgin olive oil: Biogenesis of the "green" odor notes, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 2368-2373, 1993

-
- Ostlund, R. E. J., Racette, S. B., Okeke, A., Stenson, W. F.: Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, **75**, 1000-1004, 2002
 - Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H.: Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene, *Food Chem. Toxicol.*, **38**, 647-659, 2000c
 - Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B.: Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants, *Lancet Oncol.*, **1**, 107-112, 2000a
 - Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H.: Identification of lignans as major components in phenolic fraction of olive oil, *Clin. Chem.*, **46**, 976-988, 2000b
 - Park, R., Epstein, S.: Carbon isotope fractionation during photosynthesis, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **21**, 110-126, 1960
 - Pennington, F., Strain, H., Svec, W., Katz, J.: Preparation and properties of pyrochlorophyll a, methyl pyrochlorophyllide a, pyropheophytin a, and methyl pyropheophorbide a derived from chlorophyll by decarbomethoxylation, *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 1418-1426, 1964
 - Penuelas, J., Azcón-Bieto, J.: Changes in leaf $\Delta^{13}\text{C}$ of herbarium plant species during the last 3 centuries of CO_2 increase, *Plant Cell Environ.*, **15**, 485-489, 1992
 - Perez-Camino, M. C., Cert, A., Romero-Segura, A., Cert-Trujillo, R., Moreda, W.: Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 6740-6744, 2008
 - Perez-Camino, M., Modera, W., Cert, A.: Effects of olive oil fruit quality and oil storage practices on the diacylglycerols content of virgin olive oils, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 699-704, 2001
 - Pinilla, A., Camps, F., Fabrias, G.: Cryptoregiochemistry of the Δ^{11} -myristoyl-CoA desaturase involved in the biosynthesis of *Spodoptera littoralis* sex pheromone, *Biochemistry*, **39**, 15272-15277, 1999
 - Pirisi, F. M., Angioni, A., Cabras, P., Garau, V. L., Sanjust di Teulada, M. T., Karindos Santos, M., Bandino, G. J.: Phenolic compounds in virgin olive oils I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution, *J. Chromatogr. A*, **768**, 207-213, 1992

-
- Pokorny, J., Kaliniva, L., Dysseler, P.: Determination of chlorophyll pigments in crude vegetable oils: Results of a collaborative study and the standardized method (Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **67**, 1781-1787, 1995
 - Positionspapier der Lebensmittelchemischen Gesellschaft: Aufgaben und Möglichkeiten der Isotopenverhältnisanalytik in der Herkunfts- und Authentizitätsuntersuchung von Fleisch, *Lebensmittelchemie*, **61**, 105-106, 2007
 - Poulter, C., Capson, T., Thompson, M., Bard, R.: Squalene synthetase, inhibition by ammonium analogs of carbocationic intermediates in the conversion of presqualene diphosphate to squalene, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3734-3739, 1989
 - Poulter, C., Rilling, H. In: Porter, J., Spurgeon, S. (Hrsg.): Biosynthesis of isoprenoid compounds, Wiley, New York, Vol. 1, 413-441, 1984
 - Poulter, C.: Biosynthesis of non-head-to-tail terpenes. Formation of 1'-1 and 1'-3 linkages, *Acc. Chem. Res.*, **23**, 70-77, 1991
 - Preston, C., Kahle, K., Appel, M., Heckel, F., Richling, E., Schreier, P.: Ester synthesis: authenticity assessment by stable isotope analysis, In: Hofmann, T., Rothe, M., Schieberle, P. (Hrsg.): State-of-the-art in Flavour Chemistry and biology, Proceedings of the 7th Wartburg symposium on Flavour Chemistry and Biology, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 358-362, 2004
 - Preston, C., Richling, E., Elss, S., Appel, M., Heckel, F., Hartlieb, A., Schreier, P.: On-line gas chromatography combustion-pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of pineapple (*Ananas comosus*) volatiles, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 8027-8031, 2003
 - Psomiadou, E., Tsimidou, M.: Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5132-5138, 1998
 - Quemerais, B., Mabon, F., Naulet, N., Martin, G. J.: Site-specific isotope fractionation of hydrogen in the biosynthesis of plant fatty acids, *Plant Cell Environ.*, **18**, 989-998, 1995
 - Radisky, E., Poulter, C.: Squalene Synthase: steady-state, pre-steady-state, and isotope-trapping-studies, *Biochem.*, **39**, 1748-1760, 2000
 - Rahier, A.: Deuterated Δ^7 -cholesterol analogues as mechanistic probes for wild-type and mutated Δ^7 sterol-C5(6)-desaturase, *Biochemistry*, **40**, 256-267, 2001
 - Rahmani, M., Saad, L.: Photooxidation of olive oils-influence of the chemical composition, *Rev. Fran. Corps Gras*, **36**, 355-360, 1989
 - Rahmani, M., Saari-Csallani, A.: Chlorophyll and beta-carotene pigments in Moroccan virgin olive oils measured by HPLC, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 672-674, 1991

-
- Rahmani, M., Saari-Csallany, A.: chlorophyll and beta-carotene pigments in Moroccan virgin olive oils measured by HPLC, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 672-674, 1991
 - Rahmani, M., Saari-Csallany, A.: Determination of chlorophyll pigments by HPLC in vegetable oils, *Rev. Fran. Corps Gras*, **32**, 257-259, 1985
 - Ranalli, A., Ferrante, M. L., De Mattia, G., Costantini, N.: Analytical evaluation of virgin olive oil of first and second extraction, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 417-424, 1999
 - Rangel, B., Platt, K. A., Thomson, W. W.: Ultrastructural aspects of the cytoplasmic origin and accumulation of oil in olive fruit (*Olea europaea*), *Physiol. Plantarum*, **101**, 109-114, 1997
 - Reed, D. W., Schafer, U. A., Covello, P. S.: characterization of the *Brassica napus* extraplastidial linoleate desaturase by expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Plant Physiol.*, **122**, 715-720, 2000
 - Reibach, P. H., Benedict, C. R.: Fractionation of stable carbon isotopes by phosphoenol-pyruvate carboxylase from C₄ plants, *Plant Physiol.*, **59**, 564-568, 1977
 - Reiter, B., Lechner, M., Lorbeer, E.: Isolation and characterization of wax esters in fennel and caraway seed oils by SPE-GC, *J. High Resol. Chromatogr.*, **22**, 514-520, 1999
 - Rettie, A. E., Boberg, M., Rettenmeier, A. W., Baillie, T. A.: Cytochrome P-450-catalyzed desaturation of valproic acid in vitro: species differences, induction effects, and mechanistic studies, *J. Biol. Chem.*, **263**, 13733-13738, 1988
 - Richelle, M., Enslin, M., Hager, C., Groux, M., Tavazzi, I., Godin, J. P., Berger, A., Metairon, S., Quail, S., Welsch, C. P., Sagalowicz, L., Gren, H., Fay, L. B.: Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of β -carotene and -tocopherol in normocholesterolemic humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, **80**, 171-177, 2004
 - Richling, E., Appel, M., Heckel, F., Kahle, K., Kraus, M., Preston, C., Hümmer, W., Schreier, P.: Flavour authenticity studies by isotope ratio mass spectrometry: perspective and limits, In: Ebeler, S. E., Takeoka, G. R., Winterhalter, P. (Hrsg.): Authentication of food and wine, ACS Symposium Series, **952**, 75-86, 2007
 - Richling, E., Höhn, C., Weckerle, B., Heckel, F., Schreier, P.: Authentication analysis of caffeine-containing foods via elemental analysis combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (EA-C/P-IRMS), *Eur. Food Res. Technol.*, **216**, 544-548, 2003
 - Rilling, H., Bloch, K.: On the mechanism of squalene biogenesis from mevalonic acid, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1424-1432, 1959

-
- Rilling, H., Tchen, T. T., Bloch, K.: On the mechanism of squalene biogenesis, *P. Natl. Acad. Sci.*, **44**, 167-173, 1958
 - Rovellini, P., Azzolini, M., Cortesi, N.: , *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **74**, 1-, 1997
 - Royer, A., Gerard, C., Naulet, N., Lees, M., Martin, G. J.: Stable isotope characterization of olive oils. I – Compositional and carbon-13 profiles of fatty acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 357-363, 1999
 - Royer, A., Naulet, N., Mabon, F., Lees, M., Martin, G. J.: Stable isotope characterization of olive oils: II – Deuterium distribution in fatty acids studied by nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 365-373, 1999
 - Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B., Schreier, P.: $^2\text{H}/^1\text{H}$ Ratio analysis of flavour compounds by on-line gas chromatography pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-P-IRMS): Benzaldehyde, *J. High Resol. Chromatograph.*, **23**, 357-359, 2000
 - Ruff, C.: Authentizitätskontrolle von Aromastoffen: $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Analytik mittels on-line Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS) als Baustein einer Multielement-Isotopenverhältnisanalyse, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2001
 - Ryohei, K., Tomotaro, T.: , *J. Chem. Soc. Japan*, **54**, 737-, 1951
 - Sacchi, R., Addeo, F., Paolillo, L.: ^1H and ^{13}C NMR of virgin olive oil. An Overview, *Magn. Reson. Chem.*, **35**, S133-S145, 1997
 - Sacchi, R., Paolillo, L., Giudicianni, I., Addeo, F.: Rapid ^1H NMR determination of 1,2- and 1,3-diacylglycerides in virgin olive oils, *Ital. J. Food Sci.*, **3**, 253-262, 1991
 - Saleh, M. H., Tan, B.: Separation and identification of cis/trans carotenoid isomers, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1438-1443, 1991
 - Sanchez, J., Harwood, J.: Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **104**, 564-573, 2002
 - Sanchez, J., Solas, J.: Biogenesis of olive oil aroma, In: Harwood, J., Aparicio, R. (Hrsg.): Handbook of olive oil, Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA, 2000, 79ff
 - Sasiak, K., Rilling, H.: Purification to homogeneity and some properties of squalene synthetase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **260**, 622-627, 1988
 - Sayed, O. H.: Crassulacean acid metabolism 1975-2000, a checklist, *Photosynthetica*, **39**, 339-352, 2001
 - Scharrer, A., Mosandl, A.: Progress in the authenticity assessment of vanilla. $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ correlations and methodical optimisations, *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, **98**, 117-121, 2002

-
- Schmidt, H. L., Roßmann, A., Stöckigt, D., Christoph, N.: Herkunft und Authentizität von Lebensmitteln, *Chem. Unserer Zeit*, **39**, 90-99, 2005
 - Schmidt, H. L., Roßmann, A., Stöckigt, D., Christoph, N.: Stabilisotopenanalytik-Herkunft und Authentizität von Lebensmitteln, *Chem. Unserer Zeit*, **39**, 90-99, 2005a
 - Schmidt, H. L., Roßmann, A., Voerkelius, S., Schnitzler, W. H., Georgi, M., Graßmann, J., Zimmermann, G., Winkler, R.: Isotope characteristics of vegetables and wheat from conventional and organic production, *Isot. Environ. Health S.*, **41**, 223-228, 2005b
 - Schmidt, H. L., Werner, R. A., Eisenreich, W.: Systematics of ^2H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways, *Phytochem. Reviews*, **2**, 61-85, 2003a
 - Schmidt, H. L., Werner, R. A., Roßmann, A., Mosandl, A., Schreier, P.: Stable isotope ratio analysis in quality control of flavourings, In: Ziegler, H. (Hrsg.): Flavourings, Wiley-VCH Weinheim, 602-663, 2007
 - Schmidt, H. L., Werner, R., Roßmann, A.: ^{18}O Pattern and biosynthesis of natural plant products, *Phytochem.*, **58**, 9-32, 2001
 - Schmidt, H. L., Winkler, F. J., Latzko, E., Wirth, E.: Photosynthetic carboxylation reactions and delta-C-13-values of plant material, *Isr. J. Chem.*, **17**, 223-224, 1978
 - Schmidt, H. L.: Analyse von stabil-isotop markierten Verbindungen, In: Simon, H. (Hrsg.): Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen, Band 2, Springer, Berlin, 291-400, 1974
 - Schmidt, H. L.: Fundamentals and systematics of the non-statistical distributions of isotopes in natural compounds, *Naturwissenschaften*, **90**, 537-552, 2003b
 - Scholz, B., Ballschmiter, K.: Preparation and reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls, *J. Chromatogr.*, **208**, 148-155, 1981
 - Schroeffer, G. J., Bloch, K.: The stereospecific conversion of stearic acid to oleic acid, *J. Biol. Chem.*, **240**, 54-63, 1965
 - Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H., Rohmer, M.: Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*, *Biochem. J.*, **316**, 73-80, 1996
 - Serani, A., Piacenti, D., Staiano, G.: Sistema analitico per l'identificazione di oli deodorati in oli vergini di oliva. Nota 2-Cinetica di isomerizzazione dei digliceridi in oli vergini di oliva, *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **LXXVIII**, 525-528, 2001

-
- Sessions, A., Burgoyne, T., Schimmelmann, A., Hayes, J.: Fractionation of hydrogen isotopes in lipid biosynthesis, *Org. Geochem.*, **30**, 1193-1200, 1999
 - Sessions, A., Jahnke, L., Schimmelmann, A., Hayes, J.: Hydrogen isotope fractionation in lipids of the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **66**, 3955-3969, 2002
 - Sessions, A.: Seasonal changes in D/H fractionation accompanying lipid biosynthesis in *Spartina alterniflora*, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **70**, 2153-2162, 2006
 - Sewenig, S., Hener, U., Mosandl, A.: Online determination of $^2\text{H}/^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios of cinnamaldehyde from different sources using gas chromatography isotope ratio mass spectrometry, *Eur. Food Res. Technol.*, **218**, 444-448, 2003
 - Shechter, I., Bloch, K.: Solubilization and Purification of trans-Farnesyl Pyrophosphate-Squalene Synthetase, *J. Biol. Chem.*, **246**, 7690-7696, 1971
 - Shechter, I., Klinger, E., Rucker, M., Engstrom, R., Spirito, J., Islam, M., Boettcher, B., Weinstein, D.: Solubilization, purification, and characterization of a truncated form of rat hepatic squalene synthetase, *J. Biol. Chem.*, **267**, 8628-8635, 1992
 - Smith, B. N., Ziegler, H.: Isotope fractionation of hydrogen in plants, *Bot. Acta*, **103**, 335-342, 1990
 - Snyder, J. M., Taylor, S.L., King, J. W.: Analysis of tocopherols by capillary supercritical fluid chromatography and mass-spectrometry, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 349-354, 1993
 - Spangenberg, J. E., Ogrinc, N.: authentication of vegetable oils by bulk and molecular carbon isotope analyses with emphasis on olive oil and pumpkin seed oil, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1534-1540, 2001
 - Spangenberg, J., Macko, S., Hunziker, J.: Characterization of olive oil by carbon isotope analysis of individual fatty acids: Implications for authentication, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4179-4184, 1998
 - Spyros, A., Dais, P.: Application of ^{31}P NMR Spectroscopy in food analysis. I. Quantitative determination of the mono- and diglyceride composition of olive oils, *J. Agric Food Chem.*, **48**, 802-805, 2000
 - Spyros, A., Philippidis, A., Dais, P.: Kinetics of diglyceride formation and isomerization in virgin olive oils by employing ^{31}P NMR spectroscopy. Formulation of a quantitative measure to assess olive oil storage history, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 157-164, 2004
 - Stancher, B., Zonta, F., Bogoni, P.: Determination of olive oil carotenoids by HPLC, *J. Micronutr. Anal.*, **3**, 97-106, 1987

-
- Sternberg, L. O., DeNiro, M. J., Ajie, H.: Stable hydrogen isotope ratios of saponifiable lipids and cellulose nitrate from CAM, C₃ and C₄ plants, *Phytochem.*, **23**, 2475-2477, 1984a
 - Sternberg, L. O., DeNiro, M. J., Johnson, H. B.: Isotope ratios of cellulose from plants having different photosynthetic pathways, *Plant Physiol.*, **74**, 557-561, 1984b
 - Sternberg, L. O., DeNiro, M. J., Johnson, H. B.: Oxygen and hydrogen isotope ratios of water from photosynthetic tissues of CAM and C₃ plants, *Plant Physiol.*, **82**, 428-431, 1986
 - Sternberg, L. O., DeNiro, M. J., Ting, I. P.: Carbon, hydrogen and oxygen isotope ratios of cellulose from plants having intermediary photosynthetic modes, *Plant Physiol.*, **74**, 104-107, 1984c
 - Sternberg, L. O., DeNiro, M. J.: Isotopic composition of cellulose from C₃, C₄ and CAM plants growing near one another, *Science*, **220**, 947-949, 1983
 - Strain, H., Svec, W. In: Vernon, L., Seely, G. (Hrsg.): *The Chlorophylls*, Academic Press, New York, 22-66, 1966
 - Strain, H.: Chloroplast pigments and chromatographic analysis, *Annual Priestley Lectures*, **32**, 51, 1958
 - Stuchlík, M., Zák, S.: Vegetable lipids as components of functional foods, *Biomed. Papers*, **146**, 3-10, 2002
 - Sun, S., Duggleby, R. G., Schowen, R. L.: Linkage of catalysis and regulation in enzyme action. Carbon isotope effects, solvent isotope effects, and proton inventories for the unregulated pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7317-7322, 1995
 - Syväoja, E. L., Piironen, V., Varo, P., Koivistoinen, P., Salminen, K.: Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63**, 328-329, 1986
 - Tamura, H., Appel, M., Richling, E., Schreier, P.: authenticity assessment of γ - and δ -decalactone from Prunus fruits by gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (GC-C/P-IRMS), *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5397-5401, 2005
 - Torres, C., Vazquez, L., Senorans, J., Reglero, G.: Study of the analysis of alkoxglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector, *J. Chromatogr. A*, **1078**, 28-34, 2005
 - Tovar, M. J., Moltiva, M. J., Romero, M. P.: Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees grown under linear irrigation strategies, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5502-5508, 2001

-
- Tremblay, P., Paquin, R.: Improved detection of sugar addition to maple syrup using malic acid as internal standard and in ^{13}C isotope ratio mass spectrometry (IRMS), *J. Agric. Food. Chem.*, **55**, 197-203, 2006
 - Tsimidou, M.: Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect, *Ital. J. Food Sci.*, **10**, 99-116, 1998
 - Tuck, K. L., Hayball, P. J.: Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 636-644, 2002
 - Verleyen, T., Forcades, M., Verhe, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., De Greyt, W.: Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 117-, 2002
 - Vigli, G., Philippidis, A., Spyros, A., Dais, P.: Classification of edible oils by employing ^{31}P and ^1H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for detection of seed oil adulteration in virgin olive oils, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5715-5722, 2003
 - Wanke, M., Skorupinska-Tudek, K., Swiezewska, E.: Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (DOXP/MEP) pathway, *Acta Biochim. Pol.*, **48**, 663-672, 2001
 - Webster, L., Simpson, P., Shanks, A. M., Moffat, C. F.: The authentication of olive oil on the basis of hydrocarbon concentration and composition, *Analyst*, **125**, 97-104, 2000
 - Werner, R. A., Kornexl, B. E., Roßmann, A., Schmidt, H. L.: On-line determination of $\delta^{18}\text{O}$ values of organic substances, *Anal. Chim. Acta*, **319**, 159-164, 1996
 - Whelan, T., Sackett, W. M., Benedict, C. R.: Carbon isotope discrimination in a plant processing the C_4 dicarboxylic acid pathway, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **41**, 1205-1210, 1970
 - Whelan, T., Sackett, W. M., Benedict, C. R.: Enzymatic fractionation of carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C_4 plants, *Plant Physiol.*, **51**, 1051-1054, 1973
 - Winkler, F. J., Kexel, H., Kranz, C., Schmidt, H. L.: Parameters affecting the $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ isotope discrimination of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase reaction, In: Schmidt, H. L., Förstel, H., Heinzinger, K. (Hrsg.): *Stable Isotopes*, Elsevier, Amsterdam, 83-89, 1984
 - Winkler, F. J.: Application of natural abundance stable isotope mass spectrometry in food control, In: Frigerio, A., Milon, H. (Hrsg.): *Chromatography and mass spectrometry in nutrition science and food safety*, Elsevier, Amsterdam, 173-190, 1984

-
- Winter, K., Holtum, A. M.: How closely do the $\delta^{13}\text{C}$ values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO_2 fixed during day and night?, *Plant Physiol.*, **129**, 1843-1851, 2002
 - Woodbury, S. E., Evershed, R. P., Rossell, J. B.: $\delta^{13}\text{C}$ analyses of vegetable oil fatty acid components, determined by gas chromatography--combustion--isotope ratio mass spectrometry, after saponification or regiospecific hydrolysis, *J. Chromatogr. A.*, **805**, 249-257, 1998
 - Woodbury, S. E., Evershed, R. P., Rossell, J. B.: Purity assessments of major vegetable oils based on $\delta^{13}\text{C}$ values of individual fatty acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 371-379, 1998
 - Yakir, D., DeNiro, M. J.: Oxygen and hydrogen isotope fractionation in the characterization of biochemical mechanisms in *Lemna gibba* L., *Plant Physiol.*, **93**, 325-332, 1990
 - Yamauchi, K., Tanabe, T., Kinoshita, M.: Trimethylsulfonium hydroxide: a new methylating agent, *J. Org. Chem.*, **44**, 638-639, 1979
 - Zambonin, C., Calvano, C., D'Accolti, L., Palmisano, F.: Laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry of squalene in oil samples, *Rapid Commun. Mass Sp.*, **20**, 325-327, 2006
 - Zhang, D., Jennings, S., Robinson, G., Poulter, C.: Yeast Squalene Synthase: Expression, Purification, and Characterization of Soluble Recombinant Enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**, 133-143, 1993
 - Zhang, D., Poulter, C.: Biosynthesis of Non-Head-to-Tail Isoprenoids. Synthesis of 1'-1 and 1'-3 Structures by Recombinant Yeast Squalene Synthase, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 1641-1642, 1995
 - Ziegler, H., Osmond C. B., Stichler, W., Trimborn, P.: Hydrogen isotope discrimination in higher plants: Correlations with photosynthetic pathway and environment, *Planta*, **128**, 85-92, 1976
 - Ziegler, H.: Carbon and hydrogen isotope discrimination in Crassulacean acid metabolism, In: Winter K., Smith, J. (Hrsg.): Ecological Studies, Vol. 114: Crassulacean acid metabolism, Springer, Berlin, 336-348, 1996
 - Zonta, F., Stancher, B.: Carotenoids content and quality of olive oils, *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **64**, 53-55, 1987
 - Zonta, F., Stancher, B.: High-performance liquid chromatography of tocopherols in oils and fats, *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **60**, 195-199, 198

6. Anhang

Probennr.	Herkunft	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Squalen [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ Squalen [‰]
2	Italien	-155	-27,8
3	Billigöl	-161	-27,6
4	Billigöl	-159	-27,9
5	Italien	-160	-27,2
6	Italien	-166	-28,6
7	Griechenland	-167	-29,1
8	Italien	-162	-26,7
9	Italien	-158	-29,9
10	Billigöl	-164	-27,1
11	Billigöl	-161	-28,3
12	Billigöl	-155	-27,5
13	Portugal	-163	-28,2
14	Tunesien	-166	-28,0
15	Griechenland	-167	-28,2
16	Türkei	-167	-26,6
17	Australien	-163	-27,8
18	Spanien	-162	-27,6
19	Griechenland	-162	-27,4
20	Spanien	-174	-28,6
21	Spanien	-148	-27,4
22	Spanien	-155	-27,0
23	Spanien	-170	-30,1
24	Spanien	-163	-26,7
25	Spanien	-164	-28,1
26	Spanien	-159	-28,5
27	Frankreich	-161	-31,2
28	Frankreich	-162	-31,0
29	Frankreich	-152	-29,0
30	Frankreich	-151	-29,5
31	Frankreich	-153	-28,1
32	Frankreich	-155	-28,0
33	Frankreich	-159	-29,3

Probennr.	Herkunft	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Squalen [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ Squalen [‰]
34	Frankreich	-160	-29,8
35	Italien	-156	-30,7
36	Italien	-150	-29,5
37	Italien	-153	-29,3
38	Italien	-164	-28,0
39	Italien	-166	-28,8
41	Italien	-162	-30,3
42	Italien	-159	-29,9
43	Italien	-163	-30,4
45	Griechenland	-165	-34,2
46	Griechenland	-158	-27,8
47	Griechenland	-174	-30,0
48	Griechenland	-171	-27,6
49	Griechenland	-158	-30,5
50	Chile	-156	-30,3
51	Chile	-160	-29,9
52	Australien	-169	-28,4

Proben-nr.	Herkunft	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ Gesamtöl [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Gesamtöl [‰]	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ Gesamtöl [‰]	Relativer Gehalt Palmitinsäure [%]	Relativer Gehalt Ölsäure [%]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Palmitinsäuremethylester [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Ölsäuremethylester [‰]
1	Billigöl	-29,0	-120	21,1	20,4	71,2	-142	-139
2	Italien	-27,6	-129	20,3	21,9	69,7	-126	-142
3	Billigöl	-28,2	-126	20,1	17,1	78,3	-142	-140
4	Billigöl	-28,5	-125	18,7	19,7	72,9	-144	-143
5	Italien	-29,5	-128	19,3	21,3	71,3	-134	-133
6	Italien	-30,3	-136	18,4	16,4	75,8	-135	-144
7	Griechenland	-28,1	-128	18,7	18,6	74,2	-142	-144
8	Italien	-30,4	-120	18,4	19,8	72,7	-124	-134
9	Italien	-28,4	-121	18,9	22,6	69,6	-124	-131
10	Billigöl	-28,3	-114	23,0	19,9	72,8	-143	-141
11	Billigöl	-28,9	-125	21,4	17,8	70,4	-142	-136
12	Billigöl	-28,7	-126	23,1	19,3	77,0	-136	-136
13	Portugal	-28,2	-128	19,9	18,0	73,0	-130	-140
14	Tunesien	-29,3	-124	19,3	20,8	66,6	-134	-140
15	Griechenland	-28,0	-123	17,6	21,8	70,8	-126	-136
16	Türkei	-28,4	-128	18,0	19,1	65,5	-132	-138
17	Australien	-28,1	-124	21,6	21,9	67,7	-126	-139
18	Spanien	-27,3	-126	20,6	16,9	70,0	-126	-138
19	Griechenland	-30,0	-139	17,7	16,9	71,8	-136	-147
20	Spanien	-27,2	-125	24,6	17,0	75,5	-130	-128
21	Spanien	-26,1	-116	27,5	22,8	67,9	-123	-115
22	Spanien	-29,9	-146	18,4	22,6	68,7	-155	-157
23	Spanien	-27,1	-136	25,1	20,7	69,4	-135	-137
24	Spanien	-28,0	-145	22,1	17,3	68,6	-145	-140
25	Spanien	-28,6	-139	25,0	21,3	70,2	-139	-137
26	Spanien	-29,5	-143	25,7	19,7	71,1	-149	-150
27	Frankreich	-30,2	-143	22,7	17,3	70,3	-146	-146
28	Frankreich	-29,4	-142	19,5	23,3	66,8	-144	-143
29	Frankreich	-29,8	-139	20,6	20,4	63,9	-145	-146
30	Frankreich	-28,4	-137	23,8	23,0	61,1	-141	-142

Proben- nr.	Herkunft	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ Ge- samtöl [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Ge- samtöl [‰]	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ Gesamtöl [‰]	Relativer Gehalt Palmitinsäure [%]	Relativer Gehalt Ölsäure [%]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Palmitinsäuremethyles- ter [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Ölsäureme- thylester [‰]
31	Frankreich	-28,2	-138	25,0	21,5	62,4	-145	-133
32	Frankreich	-28,6	-142	18,3	26,0	59,3	-142	-135
33	Frankreich	-29,6	-144	16,8	19,5	69,8	-141	-137
34	Frankreich	-29,5	-145	18,5	20,0	70,5	-135	-135
35	Italien	-29,7	-137	18,8	20,9	67,6	-128	-130
36	Italien	-29,7	-144	17,7	21,4	68,4	-148	-149
37	Italien	-29,6	-144	19,0	18,5	73,6	-147	-151
38	Italien	-29,1	-150	16,4	21,0	71,3	-156	-147
39	Italien	-28,0	-140	17,2	21,3	69,5	-145	-148
40	Italien	-29,8	-148	16,3	21,5	69,1	-153	-153
41	Italien	-30,0	-148	16,0	20,2	71,1	-154	-149
42	Italien	-29,8	-150	16,6	20,3	69,6	-150	-148
43	Italien	-30,4	-147	16,1	19,6	71,8	-146	-144
44	Italien	-30,9	-147	15,8	21,4	70,2	-148	-142
45	Griechenland	-28,2	-139	19,5	20,6	68,0	-120	-130
46	Griechenland	-28,3	-133	18,5	18,8	72,1	-110	-118
47	Griechenland	-28,1	-137	20,7	19,7	70,3	-119	-130
48	Griechenland	-30,6	-154	18,3	18,0	69,9	-133	-143
49	Griechenland	-30,5	-155	17,7	17,9	68,9	-131	-145
50	Chile	-29,2	-147	18,5	21,8	68,4	-129	-145
51	Chile	-28,9	-150	18,4	20,8	65,8	-126	-140
52	Australien	-29,7	-119	25,6	20,0	70,6	-95	-107
53	Türkei	-27,2	-141	23,6	24,4	64,0	-122	-129
54	Kalifornien	-29,4	-151	22,6	19,0	70,8	-133	-141
55	Billigöl	-28,9	-142	23,6	25,0	61,8	-132	-138
56	Billigöl	-28,3	-130	20,6	18,6	69,3	-128	-134
57	Billigöl	-28,5	-132	18,9	25,6	59,3	-133	-134
58	Billigöl	-28,6	-132	21,8	18,0	74,0	-124	-136
59	Billigöl	-28,4	-134	18,2	20,8	67,1	-132	-141
60	Spanien	-31,7	-127	18,7	24,1	64,4	-126	-134
61	Griechenland	-30,6	-130	17,2	19,2	70,5	-126	-134
62	Griechenland	-30,1	-145	20,5	15,6	72,6	-143	-148

Proben-nr.	Herkunft	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ Gesamtöl [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Gesamtöl [‰]	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ Gesamtöl [‰]	Relativer Gehalt Palmitinsäure [%]	Relativer Gehalt Ölsäure [%]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Palmitinsäuremethylester [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Ölsäuremethylester [‰]
63	Spanien	-27,8	-128	20,0	19,1	72,5	-119	-131
64	Türkei	-31,0	-161	22,0	18,4	71,8	-148	-156
65	Spanien	-27,5	-118	21,8	18,2	71,4	-132	-132
66	Italien	-27,6	-125	17,7	17,0	73,2	-144	-138
67	Billigöl	-29,3	-143	21,6	18,6	73,4	-138	-138
68	Billigöl	-29,3	-144	24,4	21,2	69,4	-132	-140
69	Billigöl	-29,3	-148	24,2	21,4	66,6	-129	-134
70	Billigöl	-29,5	-145	23,6	21,5	65,7	-131	-129
71	Billigöl	-29,3	-145	23,2	19,8	70,0	-125	-130
72	Billigöl	-29,6	-150	22,2	17,6	73,1	-133	-139
73	Griechenland	-29,0	-141	22,5	18,5	72,0	-130	-136
74	Griechenland	-29,7	-153	22,5	18,9	70,4	-149	-144
75	Griechenland	-29,0	-142	22,1	17,5	73,1	-129	-132
76	Spanien	-30,4	-151	23,1	19,0	71,8	-148	-148
77	Italien	-29,7	-147	24,1	18,6	70,8	-138	-136
78	Türkei	-27,9	-147	22,3	19,1	71,8	-136	-139
79	Italien	-31,2	-135	22,6	21,0	74,3	-126	-129
80	Italien	-30,3	-142	21,6	18,0	74,5	-139	-136
81	Spanien	-28,5	-143	23,7	17,8	74,9	-144	-140
82	Italien	-29,4	-151	22,9	19,1	72,8	-133	-141
83	Italien	-29,9	-142	22,1	18,1	72,6	-132	-137
84	Italien	-29,4	-148	22,3	20,0	68,8	-139	-141
85	Spanien	-29,7	-149	24,2	17,2	77,5	-138	-146
86	Italien	-30,4	-141	21,1	22,3	69,9	-127	-134
87	Italien	-29,3	-141	20,3	20,8	69,4	-132	-132
88	Italien	-29,8	-137	21,9	20,0	70,6	-132	-134
89	Spanien	-28,9	-138	22,9	21,4	70,1	-129	-130
90	Spanien	-28,5	-136	25,6	20,5	71,5	-132	-133
91	Italien	-28,6	-138	21,9	15,9	77,1	-137	-134
92	Spanien	-28,8	-139	21,9	15,8	74,7	-129	-134
93	Tunesien	-30,2	-140	22,6	23,0	60,5	-130	-130
94	Italien	-29,5	-144	22,6	18,5	65,6	-124	-126

Proben- nr.	Herkunft	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ Ge- samtöl [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Ge- samtöl [‰]	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ Gesamtöl [‰]	Relativer Gehalt Palmitinsäure [%]	Relativer Gehalt Ölsäure [%]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Palmitinsäuremethyles- ter [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Ölsäureme- thylester [‰]
95	Tunesien	-30,5	-142	23,3	22,9	57,4	-128	-129
96	Billigöl	-29,5	-143	23,3	16,0	73,4	-129	-126
97	Spanien	-29,8	-141	23,7	21,8	66,0	-133	-129
98	Portugal	-30,5	-141	20,9	16,9	72,4	-138	-138
99	Spanien	-28,2	-126	21,7	17,7	66,2	-127	-122
100	Griechenland	-28,8	-141	25,0	21,3	70,3	-136	-133
101	Griechenland	-29,4	-139	20,5	19,3	72,2	-136	-144
102	Italien	-30,5	-141	23,5	23,0	63,5	-139	-133
103	Israel	-30,4	-131	20,9	22,5	67,4	-122	-130
104	Griechenland	-28,8	-130	22,5	22,5	63,8	-132	-139
105	Griechenland	-28,8	-134	21,5	17,5	73,3	-132	-141
106	Italien	-28,9	-131	20,9	18,9	71,1	-134	-141
107	Italien	-29,5	-131	19,8	18,4	72,1	-135	-141
108	Italien	-28,3	-138	25,7	18,4	71,1	-138	-143
109	Spanien	-28,6	-134	25,6	18,6	72,1	-134	-141
110	Italien	-29,2	-141	25,3	16,1	75,9	-135	-136
111	Spanien	-28,4	-141	22,6	19,4	71,1	-132	-133
112	Spanien	-29,0	-144	31,1	19,9	74,0	-136	-137
113	Italien	-28,8	-149	23,3	23,3	65,3	-136	-147
114	Spanien	-29,6	-140	29,9	24,0	60,8	-131	-128
115	Italien	-29,4	-135	22,3	18,1	74,1	-128	-134
116	Griechenland	-29,1	-137	23,7	18,4	73,8	-133	-139
117	Italien	-29,1	-138	26,4	23,3	67,6	-129	-137
118	Griechenland	-28,7	-139	26,4	20,8	71,8	-130	-141
119	Griechenland	-29,1	-139	26,9	22,6	67,3	-131	-140
120	Italien	-30,3	-140	25,2	15,9	76,2	-138	-146
121	Italien	-30,2	-140	24,7	16,5	76,6	-130	-132
122	Italien	-30,2	-147	23,7	26,2	76,5	-122	-126
123	Griechenland	-28,7	-140	25,4	17,3	74,6	-115	-119
124	Italien	-28,0	-144	23,6	21,0	69,6	-121	-122
125	Italien	-28,6	-140	23,2	22,1	66,5	-120	-125
126	Griechenland	-28,3	-144	20,6	18,4	73,0	-116	-120

Proben-nr.	Herkunft	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ Gesamtöl [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Gesamtöl [‰]	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ Gesamtöl [‰]	Relativer Gehalt Palmitinsäure [%]	Relativer Gehalt Ölsäure [%]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Palmitinsäuremethylester [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Ölsäuremethylester [‰]
127	Italien	-29,5	-145	18,2	19,1	70,9	-117	-122
128	Italien	-29,1	-143	18,9	18,3	71,2	-120	-122
129	Italien	-28,9	-142	17,0	16,7	72,6	-119	-125
130	Billigöl	-28,5	-146	19,2	15,7	71,8	-117	-120
131	Billigöl	-28,3	-141	18,7	16,8	71,4	-113	-119
132	Italien	-30,3	-158	18,2	25,5	66,9	-124	-129
133	Italien	-30,4	-146	25,1	20,2	69,1	-117	-121
134	Griechenland	-29,2	-146	18,2	16,5	72,8	-127	-126
135	Frankreich	-29,9	-145	24,2	18,2	73,9	-120	-123
136	Frankreich	-29,3	-146	23,3	22,4	64,3	-127	-124
137	Italien	-29,4	-130	21,6	18,6	72,9	-128	-132
138	Spanien	-30,4	-129	22,6	15,7	77,3	-117	-122
139	Spanien	-31,4	-124	20,9	14,9	78,3	-109	-116
140	Chile	-31,7	-145	20,7	18,6	74,3	-131	-131
141	Spanien	-28,7	-132	24,5	15,2	75,6	-115	-120
142	Spanien	-29,2	-130	24,7	23,1	62,4	-120	-120
143	Italien	-29,0	-134	21,6	16,7	73,1	-124	-126
144	Italien	-29,1	-132	19,8	16,1	74,5	-124	-132
145	Spanien	-29,7	-130	23,2	20,3	67,1	-118	-125
146	Spanien	-30,2	-130	22,1	21,6	67,3	-119	-118
147	Frankreich	-30,7	-136	20,9	17,6	71,9	-126	-133
148	Italien	-31,0	-137	21,7	17,4	72,8	-129	-132
149	Italien	-30,1	-128	23,2	19,0	68,1	-126	-127
150	Frankreich	-29,4	-126	21,4	16,5	73,1	-124	-129
151	Frankreich	-27,8	-125	23,0	17,5	71,3	-119	-122
152	Frankreich	-29,4	-136	21,3	18,1	75,3	-136	-138
153	Frankreich	-28,7	-131	22,7	23,2	64,1	-122	-125
154	Frankreich	-28,5	-132	22,6	22,6	67,4	-124	-130
155	Frankreich	-28,5	-132	22,1	20,2	67,6	-126	-125
156	Frankreich	-28,7	-133	24,0	15,7	73,4	-130	-129
157	Frankreich	-28,2	-129	26,3	17,5	75,2	-124	-128
158	Frankreich	-29,4	-145	24,0	35,2	56,9	-140	-146

Proben- nr.	Herkunft	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ Ge- samtöl [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Ge- samtöl [‰]	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ Gesamtöl [‰]	Relativer Gehalt Palmitinsäure [%]	Relativer Gehalt Ölsäure [%]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Palmitinsäuremethyles- ter [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ Ölsäureme- thylester [‰]
159	Frankreich	-28,3	-128	23,2	16,0	75,9	-124	-128
160	Frankreich	-29,8	-132	23,1	25,5	64,1	-125	-127
161	Frankreich	-31,1	-141	20,5	20,7	38,8	-135	-138
162	Frankreich	-30,3	-140	21,4	22,4	67,8	-130	-135
163	Frankreich	-29,4	-146	17,1	19,6	73,1	-135	-142
164	Frankreich	-28,0	-130	28,1	20,1	68,1	-121	-125
165	Frankreich	-29,0	-135	16,3	19,9	70,2	-132	-139