



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Phenolische Minorkomponenten in Olivenöl und deren Verhalten bei thermischer Belastung“

verfasst von

Annika Storz

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von:

PD DI Dr. Matthias Schreiner

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und die verwendete Literatur gemäß den wissenschaftlichen Richtlinien zitiert habe und diese durch genaue Quellenangabe kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner Prüfungskommission vorgelegt oder veröffentlicht.

Wien, den 21.09.2015

Unterschrift

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD DI Dr. Matthias Schreiner für die Ermöglichung dieser Arbeit in seinem Arbeitskreis und die großzügige Unterstützung und stets wertvollen Hinweise während der Durchführung.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lebensmittelchemie und -authentizität der BOKU möchte ich danken, die mir bei technischen Fragen zur Seite standen und gerne weitergeholfen haben, sowie für den sehr guten Kaffee.

Des Weiteren gilt mein Dank auch meinen Laborkollegen, die ich während der praktischen Arbeiten im Labor kennenlernte und für den interkulturellen Austausch. Dank allen Freunden und Studienkollegen für die Bibliotheksgänge, gegenseitige Motivation und Ablenkung. Die schöne und vor allem bereichernde Studienzeit in Wien wird mir in guter Erinnerung bleiben.

Ein Dankeschön auch meinem Bruder Christof der sich die Zeit genommen hat für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meiner Familie, meiner Mutter Erika Storz, meinem Vater Dr. Hans Müller-Storz, die mir das Studium ermöglichten. Meinem Freund Mark, meinen beiden Geschwistern Maike und Christof gilt Dank für jegliche Unterstützung, Motivation und den starken Rückhalt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	2
2.1 Chemische Zusammensetzung von Olivenöl.....	4
2.2 Gesundheitliche Aspekte des Olivenöls.....	13
2.3 Lipidoxidation.....	16
3 Material und Methoden.....	22
3.1 Materialverzeichnis.....	22
3.2 Geräteverzeichnis.....	24
3.3 Bestimmung der Peroxidzahl.....	24
3.4 Quantifizierung von Tocopherolen mittels HPLC.....	25
3.5 Gaschromatographie-Massenspektrometrie.....	26
4 Ergebnisse und Diskussion.....	31
4.1 Resultate der Peroxidzahl.....	31
4.2 Tocopherole.....	33
4.3 Phenolische Inhaltsstoffe (Methanol-Wasser Extraktion).....	36
4.4 Lignane (Aceton-Wasser Extraktion).....	46
4.5 Unverseifbare Fettnebenbestandteile.....	53
5 Schlussbetrachtung.....	61
6 Zusammenfassung.....	63
7 Abstract.....	65

Literaturverzeichnis	67
Lebenslauf	75

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Auflistung der in nativem Olivenöl vorkommenden phenolischen Inhaltsstoffe gegliedert in Klassen [Tsimidou, 2013 und Boskou et al., 2006b].....	8
Abb. 2. Chemische Struktur von Squalen.	9
Abb. 3: Strukturformel von α -, β -, γ - und δ -Tocopherol.	12
Abb. 4: Reaktionsmechanismen der Autoxidation [Belitz et al., 2008; Kamal-Eldin, 2006].	17
Abb. 5: Reaktionsmechanismen natürlicher Antioxidantien [Belitz et al., 2008; Kamal-Eldin, 2006].....	19
Abb. 6: Autoxidation von α -Tocopherol in lipophilen Systemen [Belitz et al., 2008]...	20
Abb. 7: Autoxidation von γ -Tocopherol in lipophilen Systemen [Belitz et al., 2008].	21
Abb. 8: Ermittelte Peroxidzahl von Olivenöl nach Inkubation bei 60 °C über 28 Tage. Anzeige der Doppelbestimmung.....	32
Abb. 9: Ermittelte α -Tocopherolgehalte mittels HPLC mit zunehmendem Oxidationsgrad. Mittelwert aus Doppelbestimmung mit Anzeige der Spannweite.....	34
Abb. 10: Chromtogramm der phenolischen Inhaltsstoffe durch Methanol-Wasser Extraktion.....	36
Abb. 11: Massenspektrum von Tyrosol in zweifach TMS-derivatisierter Form mit Rt 33,79 min. und Strukturformel.....	37
Abb. 12: Massenspektrum von Hydroxytyrosol mit Rt 48,76 min. und Strukturformel.	37
Abb. 13: Tyrosol- und Hydroxytyrosolgehalte mit zunehmendem Oxidationsgrad. Anzeige Mittelwert aus Doppelbestimmung.....	41
Abb. 14: Zusammenhang zwischen Hydroxytyrosol und α -Tocopherol mit zunehmendem Oxidationsgrad.....	42
Abb. 15: Chromatogramm der Aceton-Wasser Extraktionsmethode. Untere Abbildung zeigt Chromatogramm vergrößert mit den Retentionszeiten 24 – 43 min.	46
Abb. 16: Massenspektren der identifizierten Lignane mit Strukturformeln.	49

Abb. 17: Konzentrationen von 1-Acetoxypinoresinol, Hydroxypinoresinol, Epi-Pinoresinol und Pinoresinol mit zunehmendem Oxidationsgrad.....	51
Abb. 18: Ausschnitt des GC-MS Chromatogramms der unverseifbaren Fettnebenbestandteile von nativem Olivenöl extra. Untere Abbildung zeigt das Chromatogramm vergrößert mit den Retentionszeiten 11 – 17 min.....	53
Abb. 19: Massenspektren und Strukturformeln von unverseifbaren Fettnebenbestandteilen.....	55
Abb. 20: Konzentrationen der analysierten Phytosterole mit zunehmendem Oxidationsgrad. Mittelwert aus Doppelbestimmung und Dreifachinjektion mit Anzeige der Standardabweichung.....	59

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Fettsäuren-Zusammensetzung von Olivenöl [León-Camacho et al., 2013].	5
Tab. 2: Grenzwerte der Sterolzusammensetzung (% Anteil an Gesamtsterolen) laut IOC Handelsstandard [IOC COI/T.15, 2015].	11
Tab. 3: Auflistung aller verwendeten Chemikalien und Referenzstandards.	22
Tab. 4: Auflistung aller verwendeten Geräte.	24
Tab. 5: Resultate der Peroxidzahlbestimmung.	31
Tab. 6: Resultate der Bestimmung des α -Tocopherols mittels HPLC.	33
Tab. 7: Identifizierte Substanzen durch Methanol-Wasser Extraktion via GC-MS.	38
Tab. 8: Konzentrationen der phenolischen Inhaltsstoffe analysiert via GC-MS mit zunehmendem Oxidationsgrad.	39
Tab. 9: Konzentrationen des Tyrosol und Hydroxytyrosol analysiert via GC-MS mit zunehmendem Oxidationsgrad.	39
Tab. 10: TMS Derivate identifizierter Substanzen mittels GC-MS.	47
Tab. 11: Konzentration der Lignane in nativem Olivenöl extra durch Extraktion von Aceton-Wasser.	50
Tab. 12: TMS-Derivate der unverseifbaren Fettnebenbestandteile.	56
Tab. 13: Konzentrationen der unverseifbaren Fettnebenbestandteile.	57

Abkürzungsverzeichnis

GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I ^T	Linearer Retentionsindex
LDL	Lipoprotein niederer Dichte
mL	Milliliter
ø	Durchmesser
ppm	Teile von einer Million
PV	Peroxidzahl
rpm	Runden pro Minute
TMS	Trimethylsilyl
VLDL	Lipoprotein sehr niederer Dichte

1 Einleitung

Olivenöl hat in der traditionellen mediterranen Ernährung neben Obst, Gemüse, Fisch und einem geringen Anteil an rotem Fleisch einen hohen Stellenwert und ist zugleich einer der primären Fettlieferanten dieser Ernährungsweise. Das Öl wird als bedeutender Faktor zur Bewahrung einer gesunden Bevölkerung angesehen [Owen et al., 2000]. Epidemiologische Studien zeigen protektive Wirkungen der traditionellen mediterranen Ernährung gegenüber Krebs oder koronaren Herzerkrankungen [Keys, 1966; Trichopoulou und Lagiou, 1997]. Diese gesundheitsfördernden Wirkungen sind der einzigartigen Phenolfraktion zuzuweisen, sowie dem hohen Gehalt an Squalen und einfach ungesättigten Fettsäuren, wie z.B. der Ölsäure [Owen et al., 2000].

Darüber hinaus ist natives Olivenöl auch für die hohe Stabilität gegenüber Oxidation bekannt verglichen mit anderen pflanzlichen Ölen. Dies beruht auf den enthaltenen natürlichen Antioxidantien, insbesondere den phenolischen Inhaltsstoffen, die die Fähigkeit besitzen Wasserstoffradikale an Lipidradikale, die während der Propagationsphase der Lipidoxidation entstehen, abzugeben [Cinquanta et al., 2001].

Olivenöl weist eine Vielzahl an phenolischen Inhaltsstoffen auf. Um deren Interaktion mit der Lipidoxidation zu überprüfen wurde das Öl einem Oxidationstest unterzogen, einem sogenannten Schaal-Ofen-Test.

Ziel der Arbeit war es, demnach sowohl lipophile und hydrophile phenolische Inhaltsstoffe, als auch unverseifbare Fettnebenbestandteile mittels Gaschromatographischer-Massenspektroskopie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zu identifizieren, so wie das Ausmaß der Oxidation in Bezug auf deren Quantität zu ermitteln.

2 Literaturübersicht

Botanisch wird der Olivenbaum dem Genus *Olea* und der Familie der Ölbaumgewächse *Oleaceae* zugeordnet. Als *Olea Europaea* wird der Olivenbaum bezeichnet der für seine Früchte angebaut wird. Die Olivenfrüchte des Baumes sind ovale Steinfrüchte, die aus einem Perikarp und Endokarp bestehen, wobei das Epikarp von einer Wachsschicht umgeben ist [Boskou, 2006].

Historisch haben Olivenkultivare ihren Ursprung vor etwa 5000-6000 Jahren in Mesopotamien und wurden von den Phöniziern und Griechen in westliche Regionen verbreitet und dort weiter kultiviert. Zunächst fanden die Früchte des Olivenbaumes für tausende von Jahren Gebrauch für die Verwendung von kostbarem Lampenöl, Anwendung für kosmetische Zwecke sowie religiöse Zeremonien [Vossen, 2007].

Wirtschaftlich gesehen hat die Ertragsleistung von Olivenöl in den letzten 50 Jahren einen Anstieg von 1 Mio. Tonnen in den Jahren 1958/59 bis zu 3 Mio. Tonnen in den Jahren 2009/10 verzeichnet und trägt einen Anteil von 3 % der pflanzlichen Fette und Öle am Weltmarkt. Dabei produziert die Europäische Union, insbesondere Spanien, den größten Anteil mit 76%, gefolgt von den weiteren Mitgliedsländern des International Olive Council (IOC) mit einer Ertragsrate von 22%. Für die Merkmale von Olivenöl und dessen Vermarktungsvorschriften gelten in der Europäischen Union entsprechende Verordnungen [EWG/1991/2568/; EU/2012/29]. Heutzutage zählen die Vereinigten Staaten zum weltweit größten Importeur von Olivenöl, gefolgt von der Europäischen Union. Allerdings spiegelt sich dies nicht im Pro-Kopf-Verbrauch wieder. Vorherrschend sind demnach immer noch die mediterranen Länder wie Griechenland, Spanien und Italien [Barjol 2013].

Für die Gewinnung des öligen Saftes aus den Olivenfrüchten werden zunächst die Oliven gewaschen. Anschließend erfolgt das Mahlen der Früchte damit die Zellwände aufgebrochen werden und das Öl aus der Vakuole treten kann. Durch Malaxation, d.h. Kneten der Ölpaste kann weiterhin der Ölgewinn erhöht werden. Es folgt ein Abtrennen der festen Tresterphase (Pomade) von der Flüssigphase (Ölmost und Abwasser) durch Pressen. Zuletzt wird das Öl von der wässrigen Phase abgetrennt [Petrakis, 2013].

Durch Variation im Prozess der Ölgewinnung leiten sich verschiedene Qualitäten des Olivenöls ab, die entsprechend einer EU-Verordnung [EG/2007/1234] eingeteilt sind:

- **Native Olivenöle**

Native Olivenöle sind Öle deren Gewinnung ausschließlich durch mechanische oder physikalische Verfahren erfolgt und durch deren Bedingungen keine Beeinträchtigung der Qualität resultiert. Darüber hinaus dürfen keine weiteren Prozesse als Waschen, Dekantieren, Zentrifugieren und Filtrieren durchlaufen werden. Für die nachstehenden Unterkategorien gelten folgende Grenzwerte:

- a) *Natives Olivenöl extra*

- $\leq 0,8\text{g}/100\text{g}$ freie Fettsäuren, die als Ölsäure berechnet werden

- b) *Natives Olivenöl*

- $\leq 2\text{g}/100\text{g}$ freie Fettsäuren, die als Ölsäure berechnet werden

- c) *Lampantöl*

- Dieses Öl ist nicht für den menschlichen Verzehr geeignet. Der Höchstgehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure beträgt $> 2\text{g}/100\text{g}$.

- **Raffiniertes Olivenöl**

- $\leq 0,3 \text{ g}/100 \text{ g}$ freie Fettsäuren, die als Ölsäure berechnet werden

- **Olivenöl**

- Verschnitt von raffiniertem Olivenöl mit nativen Olivenölen, außer Lampantöl. Der Höchstgehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure beträgt $> 1\text{g}/100\text{g}$.

- **Rohes Oliventresteröl**

- Erhalt des Öls aus Oliventrester auf physikalische Weise oder durch Behandlung mit Lösungsmitteln. Ausgenommen davon sind Öle deren Gewinnung durch Wiederveresterungsverfahren stattfand oder Mischung mit auf andere Art gewonnenen Ölen.

- **Raffiniertes Oliventresteröl**

- Erhalt durch Raffination von Oliventresteröl. Der Höchstgehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure beträgt $> 0,3\text{g}/100\text{g}$.

- **Oliventresteröl**

Verschnitt von raffiniertem Oliventresteröl mit nativen Olivenölen, ausgenommen Lampantöl. Der Höchstgehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure beträgt > 0,3g/100g.

2.1 Chemische Zusammensetzung von Olivenöl

Olivenöl besteht hauptsächlich aus Triacylglyceriden, freien Fettsäuren, so wie Mono- und Diacylglyceriden. Weitere Komponenten in geringeren Mengen sind unverseifbare Komponenten, wie Hydrocarbone, Sterole, aliphatische Alkohole, Tocopherole und Pigmente. Ebenso sind zahlreiche Phenole und flüchtige Verbindungen enthalten [Boskou et al., 2006a].

2.1.1 Majorkomponenten

Olivenöl besteht zu 98-99% aus Triacylglyceriden. Die Zusammensetzung der Fettsäuren variiert nach Sorte, klimatischen Bedingungen und Anbaugebiet. Demnach sind gesättigte Fettsäuren zu etwa 14 %, einfach ungesättigte Fettsäuren zu etwa 72 % und mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu etwa 14 % darin enthalten. Zudem sind auch freie Fettsäuren im Öl zu finden [Barjol, 2013]. Folgende in Tab. 1 ersichtlichen Fettsäuren sind mit einem Gewichtsanteil von 94-96 % in den Triacylglyceriden enthalten. Die Variation der Fettsäuremengen ist hauptsächlich auf Sorte und geographischen Ursprung zurückzuführen. Nur ein geringer Anteil ist dem Reifezustand und dem Extraktionssystem zuzuschreiben [León-Camacho et al., 2013]

Tab. 1: Fettsäuren-Zusammensetzung von Olivenöl [León-Camacho et al., 2013].

Fettsäure	% Gehalt
Palmitinsäure (C16:0)	6.30–20.93 %
Palmitoleinsäure (C16:1)	0.32–3.52 %
Stearinsäure (C18:0)	0.32–5.33 %
Ölsäure (C18:1)	55.23–86.64 %
Linolsäure (C18:2)	2.7–20.24 %
α -Linolensäure (C18:3)	0.11–1.52 %

2.1.2 Minorkomponenten

Neben den Majorkomponenten enthält Olivenöl auch Minorkomponenten. Diese untergliedern sich in verschiedene Gruppen. Phospholipide und Wachse gehören wie die Triacylglyceride zu den Lipidstrukturen. Nicht Lipidverwandte Strukturen sind unter anderem Pigmente und flüchtige organische Verbindungen. Eine weitere Gruppe stellen die unverseifbaren Verbindungen dar, zu denen das Triterpen Squalen und Sterole gehören [León-Camacho et al., 2013]. Daneben sind auch zahlreiche phenolische Inhaltstoffe enthalten. Ihre Eigenschaften reichen von organoleptischen Funktionen bis hin zum Schutz gegenüber Oxidation. Viele Minorkomponenten tragen zu dem unverwechselbaren Geschmack von Olivenöl bei. Eine Vielzahl dieser Verbindungen hat auch positiven Einfluss auf die menschliche Gesundheit [Vossen, 2013].

2.1.2.1 Aromastoffe und Pigmente

Die gelbe und grüne Farbe des nativen Olivenöls setzt sich aus Chlorophyll und Carotinoiden zusammen. Diese werden unter anderem durch folgende Kriterien beeinflusst: Kultivare, Anbaugebiet, Reifezustand, Extraktionssystem und Lagerungsbedingungen. Primär enthaltene Carotinoide sind Lutein und das Provitamin A, β -Carotin. Weitere Carotinoide sind verschiedene Xantophylle, darunter Violaxanthin, Neoxanthin, Luteoxanthin, Antheraxanthin, Mutatoxanthin und β -Cryptoxanthin [Boskou et al. 2006a].

Aliphatische und aromatische Alkohole kommen in freier als auch in veresterter Form im Olivenöl vor. Davon sind die bedeutendsten die Fettalkohole und Diterpenalkohole. Ebenso kommen in der flüchtigen Fraktion des Öles Alkanole und Alkenole in freier und veresterter Form vor und einige aromatische Alkohole, wie etwa Benzylalkohol und 2-Phenylethanol. Auch Benzylester der Hexacosansäure und Octacosansäure finden sich im Olivenöl [Boskou et al. 2006a].

Eine weitere Gruppe sind die Ester von Fettalkoholen mit Fettsäuren, die als Wachse bezeichnet werden [Boskou et al. 2006a]. Die Gehalte an Wachsestern im Olivenöl dienen der Differenzierung verschiedener Olivenölvarianten [EWG Nr. 2568/91]. Native Olivenöle (50-150 ppm Wachsester) weisen im Vergleich zu raffinierten und lösungsmittel-extrahierten Ölen weitaus geringere Gehalte an Wachsestern auf. Für jede 10 % raffiniertes, lösungsmittel-extrahiertes Öl steigt der Gehalt um etwa 300 ppm [Grob et al., 1990].

2.1.2.2 Phospholipide

Olivenöl enthält 40-135 ppm Phospholipide, unter anderem: Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatitylinositol and Phosphatidylserin. Sie beeinflussen in nicht filtriertem Olivenöl die antioxidative Kapazität indem sie als Synergisten, die Regeneration von antioxidativen Inhaltsstoffen wie α -Tocopherol oder Phenolen begünstigen, oder aber als sekundäre Antioxidantien, wie Metallchelatoren fungieren [Koidis und Boskou, 2006].

2.1.2.3 Phenolische Komponenten

Phenolische Inhaltsstoffe werden von der Pflanze als natürliche Abwehrstoffe produziert und können durch externe Einflüsse variieren. So kann es beispielsweise bei extremer Trockenheit oder anderen Stressfaktoren der Pflanze zu einer höheren Produktion kommen. Demzufolge variiert die Zusammensetzung der Minorkomponenten stark und ist abhängig von Reifezustand, Anbaubedingungen und Verarbeitung [Vossen 2013]. Der mittlere Gehalt an Gesamtphenolen beträgt etwa 500 ppm [Tuck und Hayball] unterliegt aber einer breiten Variation von 62 ppm [Owen et al., 2000a] bis hin zu 1000 ppm [Visioli und Galli, 1998].

Die phenolischen Inhaltsstoffe in nativem Olivenöl treten während der Pressung in das Öl über und gliedern sich in mehrere Klassen (siehe Abb. 1). Dabei dominieren die einfachen Phenole und Secoiridoide. Grundsätzlich kommen in frischem Öl vermehrt Verbindungen der Secoiridoid-Klasse in aglykonischer Form vor, wobei in gealtertem Öl ein höherer Anteil durch hydrolytische Prozesse in freier Form vorliegt.

Die dominierenden Phenole sind Tyrosol und Hydroxytyrosol, sowie deren Derivate. Hydroxytyrosol kommt in der Olivenfrucht in glykosylierter Form vor, hauptsächlich jedoch als Ester der Aglykagruppe des Oleuropein. Während der Malaxation wird das Hydroxytyrosol durch Glucosidasen und Esterasen frei [Boskou et al. 2006b].

Durch gezielte Extraktion lassen sich polare von weniger polaren Phenolen trennen. Die freien Phenole und Phenolsäuren sind im polaren Methanol-Wasserextrakt zu finden, wohingegen sich die anderen Phenolklassen in der weniger polaren Fraktion befinden [Boskou et al., 2006b].

Die Lignane stellen eine Gruppe der pflanzlichen Phenole dar, deren Struktur sich durch stereospezifische Dimere zweier Zimtsäurereste (Monolignole) oder durch biogenetische Äquivalente dieser, ergibt [Ayres und Loike, 1990]. Durch die strukturelle Ähnlichkeit der Lignane zum Hormon 17- β -Östradiol konkurrieren diese um den Östrogenrezeptor und werden auch als Phytoöstrogene bezeichnet [Arts et al., 1997]. Besonders hohe Konzentrationen an Lignanen weisen Samenöle, wie Leinöl und Sesamöl auf [Milder et al., 2005]. Dennoch wurden im Olivenöl auch mehrere Lignane detektiert, unter anderem (+)-1-Acetoxypinoresinol, (+)-Pinoresinol, (+)-1-Hydroxypinoresinol und Syringaresinol [Boskou et al. 2006b] in Konzentrationen von bis zu 100 ppm [Tripoli et al., 2005]. Im Gegensatz zu den anderen in der Olive enthaltenen phenolischen Inhaltsstoffen, sind die Lignane nicht im Perikarp oder den Blättern zu finden. Das Lignan Pinoresinol in glykosidierter Form steht im Zusammenhang mit dem Secoiridoid Oleosid-11-Methylester. Durch Hydrolyse von Secoiridiodglucosiden könnten diese lipidlöslichen Lignane ins Olivenöl gelangen [Tanahashi et al., 1987].

Einfache Phenolsäuren und Derivate

- Syringasäure
- Vanillinsäure
- p-Coumarsäure
- o-Coumarsäure
- Gallussäure
- Kaffeesäure
- Protocatechusäure
- Ferrulasäure
- p-Hydroxybenzoesäure
- Zimtsäure
- Benzoesäure

Einfache Phenole

- Hydroxytyrosol, (3,4-Dihydroxyphenylthanol), (3,4 DHPEA)
- Hydroxytyrosolacetat
- Tyrosol, (p-Hydroxyphenylethanol), (p-HPEA)
- Tyrosolacetat
- (3,4-Dihydroxyphenyl) Ethanolglukosid
- Vanillin

Flavonoide

- Apigenin
- Luteolin

Lignane

- (+)-1-Acetoxypinoresinol
- (+)-Pinoresinol
- (+)-1-Hydroxypinoresinol
- Syringaresinol

Hydroxyisochromane

Secoiridoide (komplexe Oleuropeinderivate)

- Dialdehyd von Decarboxymethyl Elenensäure verknüpft mit 3,4-DHPEA (3,4 DHPEA-EDA)
- Dialdehyd von Decarboxymethyl Elenolsäure verknüpft mit p-HPEA (p-HPEA-EDA)
- Oleuropeinaglykon (3,4 DHPEA-EA)
- Ligstrosidaglykon
- p-HPEA-Derivate
- Dialdehyd von Oleuropeinaglykon
- Dialdehyd von Ligstrosidaglykon
- Elenolsäure (freie und glykosidische Form)

Abb. 1: Auflistung der in nativem Olivenöl vorkommenden phenolischen Inhaltsstoffe gegliedert in Klassen [Tsimidou, 2013 und Boskou et al., 2006b].

Flavonoide werden biosynthetisch vom Phenylalanin ausgehend über den Shikimisäureweg in der Pflanze gebildet und zeichnen sich durch ihre charakteristische Struktur aus: 2 Benzolringe, die einen Sechsring, der ein Sauerstoffatom enthält, umschließen [Harborne et al., 1975].

Verschiedene Hydroxy-Isochromanderivate stellen eine erst vor kurzem entdeckte Gruppe der Phenole im Olivenöl dar [Bianco et al., 2002]. Isochromane werden in geringem Umfang im Olivenöl vom Hydroxytyrosol ausgehend synthetisiert. Dabei geht das Hydroxytyrosol eine sehr langsame Reaktion katalysiert durch Ölsäure bei Raumtemperatur ein [Guiso et al., 2001]. Allerdings kann derzeit nicht ausgeschlossen werden ob bestimmte Isochromane hundertprozentig natürlich vorkommen oder etwa in Isolierungsprozessen entstanden sind. Des Weiteren könnten diese während der Lagerung entstehen und somit Hinweise über den Frischegrad eines Öls geben [Bianco et al., 2002].

Die Secoiridoide liegen natürlicherweise in glykosidisch gebundener Form vor. In *Oleaceae* vorkommende Secoiridoide leiten sich von der oleosidischen Art der Glucoside (Oleoside) ab, die durch Kombination von Elenolsäure und einem glykosidischen Rest gekennzeichnet sind. Das Vorkommen dieser Verbindung ist auf *Oleaceae* beschränkt. Der bekannteste Vertreter der Secoiridoide ist das Oleuropein, welches ein Ester des Hydroxytyrosols (3,4-Dihydroxyphenylethanol) ist. Unter anderem ist das Oleuropein für den bitteren Geschmack von Oliven verantwortlich [Soler-Rivas et al., 2000].

2.1.3 Unverseifbare Fettnebenbestandteile

2.1.3.1 Hydrocarbone

In Olivenöl kommen gesättigte, normale und verzweigte Terpene vor. Auch aromatische Hydrocarbone sind zu finden [León-Camacho et al., 2013].

Zu den im Olivenöl bedeutendsten ungesättigten Hydrocarbonen zählt das Squalen, ein Triterpen mit 30 C Atomen und 6 nicht konjugierten Doppelbindungen [Tsimidou, 2010].

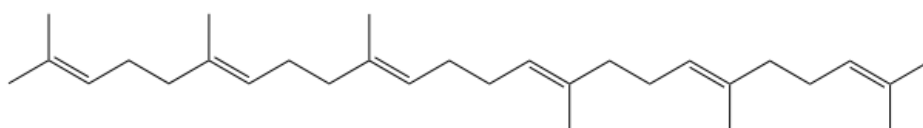


Abb. 2. Chemische Struktur von Squalen.

Squalen synthetisiert unter Bildung von Monomethylsterolen als Zwischenprodukt Desmethylsterole. Demnach sind auch geringe Mengen an Monomethylsterolen im Olivenöl enthalten [León-Camacho et al., 2013].

2.1.3.2 Sterole

Sterole gehören zu den unverseifbaren Fettnebenbestandteilen im Olivenöl. Strukturell sind sie tetrazyklische Cyclopenta[a]phenanthrenringe mit einer längeren Seitenkette und unterschiedlichem Methylierungsgrad [Piironen et al., 2000]. Aufgrund des Methylierungsgrades am C4-Atom in der Seitenkette unterteilen sich die Sterole in 4 Gruppen: 4-Monomethylsterole (Methylsterole), 4,4-Dimethylsterole (Triterpenalkohole) und 4-Desmethylsterole. Desmethylsterole, sogenannte Phytosterole, bilden sich durch Biosynthese aus 4-Monomethylsterolen und 4,4-Dimethylsterolen [León-Camacho et al., 2013].

Aufgrund der charakteristischen Zusammensetzung der Phytosterole eines Öls dienen diese zur Identifizierung von Olivenöl. Laut dem Handelsstandard des *International Olive Oil Council* darf Olivenöl einen Grenzwert von $\leq 93\%$ β -Sitosterol der Gesamtsterole nicht überschreiten [IOC COI/T.15, 2015]. Weitere Limitierungen der Desmethylsterole sind in Tab. 2 gegeben.

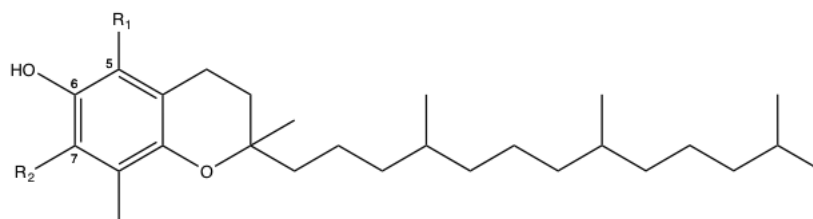
Phytosterole oxidieren aufgrund ihrer ungesättigten Struktur leicht und bilden unter anderem Steroxidationsprodukte. Durch thermische Oxidation von β -Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol können 7-Hydroxy-, 7-Keto- und Epoxyderivate entstehen [León-Camacho et al., 2013].

Tab. 2: Grenzwerte der Sterolzusammensetzung (% Anteil an Gesamtsterolen) laut IOC Handelsstandard [IOC COI/T.15, 2015].

Desmethylsterole	%-Anteil Gesamtsterole
Cholesterol	$\leq 0,5$
Brassicasterol	$\leq 0,1$
Campesterol	$\leq 4,0$
Stigmasterol	in essbaren Ölen = Campesterol
Δ -7-Stigmastenol	$\leq 0,5$
β-Sitosterol:	$\geq 93,0$
- β-Sitosterol	
- Δ -5-Avenasterol	
- Δ -5-23-Stigmastadienol	
- Clerosterol	
- Sitostanol	
- Δ 5-24-Stigmastadienol	

2.1.3.3 Tocopherole

Chemisch gesehen sind Tocopherole Chromanringe, bestehend aus einem Phenol (Hydroxylgruppe in Position 6), einem annelierten heterozyklischen Sechsring (Oxan) und einer gesättigten Seitenkette (siehe Abb. 3). α -, β -, γ - und δ -Tocopherole unterscheiden sich in Anzahl und Position der Methylgruppen am Phenol [Kamal-Eldin und Appelqvist, 1996]. Ihr Vorkommen ist ausschließlich pflanzlichen Nahrungsmitteln zuzuschreiben in denen ihre Synthese stattfindet [Kamal-Eldin und Appelqvist, 1996]. Sie gehören den lipophilen phenolischen Antioxidantien an und tragen zur Stabilität von Lipiden bei. In Fetten und Ölen liegen sie in ihrer freien Form vor [Tsimidou, 2010].



	R ₁	R ₂
α-Tocopherol	CH ₃	CH ₃
β-Tocopherol	CH ₃	H
γ-Tocopherol	H	CH ₃
δ-Tocopherol	H	H

Abb. 3: Strukturformel von α-, β-, γ- und δ-Tocopherol.

In nativem Olivenöl ist das α-Tocopherol dominant, mit einem Anteil von etwa 90-95 % der gesamten Tocopherole. Die Gehalte an α-Tocopherol schwanken aus technologischen Gründen und mit verschiedenen Kultivare zwischen 150 und 300 ppm. Natives Olivenöl hat ein optimales Verhältnis an α-Tocopherol/ungesättigten Fettsäuren. Durch den hohen Gehalt an α-Tocopherol stellt Olivenöl auch eine gute Quelle für die Vitamin-E Aufnahme dar [Tsimidou, 2010].

Andere Tocopherole sind in weitaus geringeren Mengen vorhanden: β-Tocopherol (~ 10 ppm), δ-Tocopherol (~ 10 ppm) und γ-Tocopherol (~ 20 ppm) [Boskou et al. 2006a]. Dennoch können γ- und δ-Tocopherol eine wichtige Rolle in der Haltbarkeit von ungesättigten Pflanzenölen spielen. Denn deren antioxidative Wirkung in vitro ist höher als die des α-Tocopherols [Tsimidou, 2010]. Die Vitamin-E-Aktivität der Tocopherole nimmt in folgender Reihenfolge ab $\alpha > \beta > \gamma > \delta$. Dabei verhält sich die antioxidative Wirkung in gegensätzlicher Richtung. [Belitz et al. 2008]. Hohe Mengen an Tocopherolen können wiederum zu einer pro-oxidativen Wirkung führen indem Hydroperoxide schneller zerfallen und folglich zu einer Beschleunigung der Propagationskinetik beitragen [Kalogeropoulos und Tsimidou, 2014]. Die Interaktion des Tocopherols im Zusammenhang mit der Lipidoxidation wird in Kapitel 2.3 genauer erläutert.

2.2 Gesundheitliche Aspekte des Olivenöls

Olivenöl ist eine Schlüsselkomponente in der traditionellen mediterranen Ernährung. Der tägliche Verzehr wird in Kreta auf etwa 70 g geschätzt, wohingegen in der spanischen und italienischen traditionellen Ernährung weitaus weniger (15-20g) konsumiert wird. Zahlreiche positive Eigenschaften auf die menschliche Gesundheit werden dem Öl zugeschrieben. Unter anderem günstige Eigenschaften gegenüber dem Risiko einer koronaren Herzerkrankung, indem der Plasma-Cholesterolspiegel gesenkt wird. Der HDL-Spiegel steigt und zugleich kommt es zu einer Verminderung des LDL-Cholesterols aufgrund erhöhter Anfälligkeit gegenüber Oxidation und einer Abnahme thrombotischer Faktoren wie dem Faktor VII [Zampelas et al., 2004].

Dennoch sind diese günstigen Eigenschaften nicht alleine dem Verhältnis der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren des Olivenöls zueinander zuzuschreiben, sondern auch den antioxidativen Eigenschaften der phenolischen Komponenten [Tripoli et al., 2005].

Darüber hinaus stehen viele weitere gesundheitliche Vorteile von nativem Olivenöl ausgehend in Diskussion, wie antiinflammatorische Aktivität, antikarzinogenes Potential, Modulation der Genexpression von Proteinen, die in Zusammenhang stehen mit Inflammation, Lipidmetabolismus und Resistenz gegenüber oxidativem Stress [Kalogeropoulos und Tsimidou, 2014].

2.2.1 Metabolisierung und Bioverfügbarkeit phenolischer Inhaltstoffe

Da die phenolischen Komponenten wie mehrfach schon erwähnt vermutlich einen besonderen Stellenwert der gesundheitlichen günstigen Effekte einnehmen, wird zunächst genauer auf deren Bioverfügbarkeit und Metabolisierung eingegangen. Die Aufnahme an Gesamtphenolen wird in Spanien auf 5,5 g, Italien 7,5 g und in Griechenland bis zu 9 g pro Jahr geschätzt [Tuck und Hayball, 2002].

Die gebundene Form des Tyrosol und Hydroxytyrosol, das Oleuropein wird zunächst im Magen hydrolysiert. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der freien Form von Hydroxytyrosol und Tyrosol im Dünndarm. Die Absorption dieser Metaboliten erfolgt auf verschiedene Arten. Manna et al. [2000] zeigte eine passive Diffusion des Hydroxytyrosols im Tierversuch. Oleuropein wird in glykosylierter Form wahrscheinlich an den natrium-abhängigen Glukosetransporter I gebunden und aktiv resorbiert. Eine andere Möglichkeit

stellt die parazelluläre Diffusion durch die Lipiddoppelschicht der epithelialen Zellmembran dar, die jedoch aufgrund einer gewissen Polarität des Oleuropein unwahrscheinlich ist [Tripoli et al., 2005].

Hydroxytyrosol und Tyrosol durchlaufen anschließend die Phase I und II des Fremdstoffmetabolismus. Dies wurde in Jejunum- und Ileum-Segmenten von Ratten anhand von humanen Caco-2-Zellen festgestellt. Identifizierte Metaboliten waren demnach O-methylierte Derivate des Hydroxytyrosol, glucuronidiertes Hydroxytyrosol und Tyrosol sowie glutathionylierte Konjugate des Hydroxytyrosol [Corona et al., 2006]. Nicht absorbierte phenolische Inhaltsstoffe, insbesondere komplexere phenolische Inhaltsstoffe wie etwa das Oleuropein werden im Colon durch Mikroorganismen abgebaut [Scalbert und Williamson, 2000; Corona et al., 2006].

In einer Humanstudie von Visioli et al. [2000] wurden einfache Phenole im Olivenöl, wie Tyrosol und Hydroxytyrosol dosisabhängig und nicht sättigend absorbiert. Die Ausscheidung über den Urin, in glucuronidierter Form, beträgt bei Tyrosol 20-22% und bei Hydroxytyrosol 30-60%. Die verbliebenen Phenole werden entweder über den Fäzes ausgeschieden, wobei eine Zerstörung derer im Darm stattfindet, akkumulieren in Organen oder in zirkulierenden Zellen, wie etwa den Erythrozyten. Allerdings kann dies zu einer Überschätzung der absorbierten Menge an Phenolen durch die Umsetzung dieser in der Mikrobiota des Colons kommen [Scalbert und Williamson, 2000].

Eine weitere Humanstudie zeigt die Anreicherung von Hydroxytyrosol und Tyrosol nach einer Aufnahme von nativem Olivenöl extra in der Lipoproteinfraction. Diese finden sich in allen Lipoproteinen, ausgenommen dem VLDL wieder [Bonanome et al., 2000].

Hydroxytyrosol ist im Organismus auch im Gehirn zu finden, da es mit dem Dopaminmetabolismus in Zusammenhang steht. Dopamin wird katalysiert durch Monoaminoxidase zu 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd abgebaut, welches wiederum in größeren Mengen zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure oxidiert wird und in kleinen Mengen zu Hydroxytyrosol (3,4-Dihydroxyphenylethanol) reduziert wird [Lamensdorf et al., 2000].

Darüberhinaus konnten Homovanillylalkohol und Homovanillinsäure, Metaboliten des Hydroxytyrosol im Urin von Menschen nach Aufnahme von nativem Olivenöl extra nachgewiesen werden. Homovanillylalkohol entsteht durch die Katechol-O-Methyltransferase, welche auch im Katecholaminmetabolismus involviert ist. Der andere Metabolit

die Homovanillinsäure entsteht infolgedessen durch Oxidation des Hydroxytyrosols bzw. des Homovanillylalkohols [Caruso et al., 2001].

2.2.2 Antiinflammatorische Wirkungen von Olivenöl

Bogani et al. [2007] untersuchte in einer Humanstudie an Männern die antithrombotische und antiinflammatorische Wirkung von nativem Olivenöl extra (50 mL). Dabei konnte eine postprandiale signifikante Reduktion von TXB₂ (Thromboxan B₂) und LTB₄ (Leukotrien B₄) festgestellt werden. Diese Wirkung konnte aber nicht nach dem Verzehr von raffiniertem Olivenöl (mit nahezu identischem Fettsäurenmuster, lediglich sehr geringe Gehalte an Phenolen) oder Maisöl bestätigt werden. Demnach kann diese Wirkung den phenolischen Komponenten des nativen Olivenöls extra zugeschrieben werden. Leger et al. [2005] untersuchte die Thromboxanwirkung von Hydroxytyrosol reichem Olivenöl-abwasser in einer Interventionsstudie an Diabetes Typ I erkrankten Männern. Dabei kam es nach 4 Tagen Intervention zu einer signifikanten Abnahme von TXB₂. Das lässt darauf schließen, dass Hydroxytyrosol eine mögliche präventive Wirkung in thrombotischen Prozessen haben könnte.

In einer Kohortenstudie mit 772 Teilnehmern im Alter zwischen 55 und 80 Jahren, die ein erhöhtes Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung hatten, zeigte natives Olivenöl ein signifikant geringeren VCAM-1-Wert (vascular cell adhesion molecule-1) [Salas-Salvado et al., 2007].

Eine humane Interventionstudie (plazebokontrolliert, crossover, doppelblind, randomisiert) mit dem Vergleich von nativem Olivenöl und raffiniertem Olivenöl und vorheriger Washoutphase konnte eine antiinflammatorische Wirkung nicht vollständig bestätigen. Es kam zu einer Abnahme des IL-6 (Interleukin-6) und dem CRP (C-reaktives Protein), allerdings waren diese Ergebnisse nicht signifikant [Fito et al., 2007].

2.2.3 Modulation des Lipidmetabolismus durch Olivenöl

Scaccini et al. [1992] zeigt an Ratten die mit Olivenöl gefüttert wurden *in vivo* eine signifikant geringere Konzentration an Thiobarbitursäure sowohl im Plasma als auch in den Lipoproteinen verglichen mit einer Fütterung an Sojaöl oder Triolein (ölsäurereiche Mischung an Triglyzeriden mit Ölsäuregehalt von 75%) und identischem Vitamin-E-Gehalt der drei Diäten. Die VLDL- und LDL-Partikel von Olivenöl gefütterten Ratten zeigten *in*

vitro eine höhere Resistenz gegenüber Oxidationsanfälligkeit. Auch Wiseman et al. [1996] zeigte anhand von Kaninchen eine höhere Resistenz gegenüber der Oxidation des LDL *in vitro* bei nativem Olivenöl extra verglichen mit Raffiniertem.

2.2.4 Wirkungen im Zusammenhang mit Krebs

Im Tierversuch konnte anhand von Ratten eine präventive Wirkung von ω -9 reichem Olivenöl und ω -3 reichem Fischöl (5% an Gesamtenergieaufnahme) gegenüber der Bildung Foci abberanter Krypten sowie einem Kolonkarzinom nachgewiesen werden. Die Resultate stehen im Zusammenhang mit einer Modulation des Arachidonsäuremetabolismus, wobei eine geringere Synthese des PGE₂ (Prostaglandin E₂) im Colon festgestellt wurde [Bartolí et al., 2000]. PGE₂ stimuliert *in vitro* die Proliferation von Krebszellen [Qiao et al., 1995] und inhibiert die Apoptose [Sheng et al., 1998].

2.3 Lipidoxidation

Primär betroffen von der Oxidation zu Hydroperoxiden sind ungesättigte Fettsäuren, d.h. Fettsäuren in deren chemischer Struktur eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten sind. Im Olivenöl sind davon vorwiegend die Linol- und α -Linolensäure betroffen, aber auch in gewissem Umfang die Ölsäure die quantitativ überwiegend vorliegt. Durch weitere Reaktionen kann eine Vielzahl an Folgeprodukten entstehen. Während der Lagerung von Olivenöl bleiben diese Fettsäuren nicht stabil und unterliegen dem Prozess der Lipidperoxidation. Diese kann sowohl durch Sauerstoff oder enzymatisch ablaufen und wird dementsprechend als Autoxidation oder Lipoxygenase-Katalyse bezeichnet [Belitz et al., 2008]. Ein weiterer Oxidationsprozess stellt die Photooxygenierung dar, die durch UV-Licht, Sauerstoff und Sensibilisatoren hervorgerufen werden kann [Iesce et al., 2005].

2.3.1 Autoxidation

Der Autoxidationsprozess ungesättigter Fettsäuren (siehe Abb. 4) beginnt durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms der Doppelbindung (LH) und einem Initiationsradikal (X[•]), wobei sich ein Alkylradikal (L[•]) bildet. Dieses Alkylradikal reagiert zusammen mit molekularem Sauerstoff zu einem Lipidperoxyradikal (LOO[•]). Das Lipidperoxyradikal reagiert weiter und abstrahiert ein Wasserstoffatom einer weiteren Doppelbindung wodurch

Lipidhydroperoxid (LOOH) und ein weiteres Alkyldradikal entsteht und der Kreislauf geschlossen ist. Die Lipidhydroperoxide können autokatalytisch zerfallen, wobei Schwermetall Ionen noch zusätzlich als Katalysatoren wirken.

Initiation



Propagation - Kettenwachstum



Propagation – Kettenverzweigung



Termination – Kettenabbruch

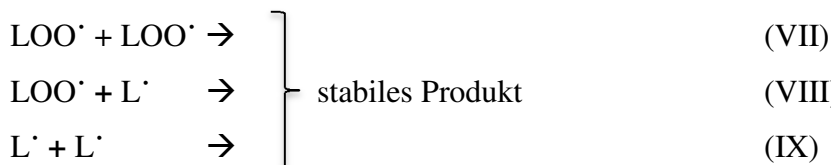


Abb. 4: Reaktionsmechanismen der Autoxidation [Belitz et al., 2008; Kamal-Eldin, 2006].

Ab einem gewissen Konzentrationsanfall an Hydroperoxiden kommt es zu einer weiteren Reaktion wobei Peroxylradikale (LOO[·]) und Alkoxyradikale (LO[·]) gebildet werden. Mit der Zeit treten immer mehr Sekundär- und Tertiärprodukte auf und es kommt zu einer Vielzahl an Autoxidationsprodukten.

Diese führen zu Veränderungen des Ölaromas und infolge dessen zu Ungenießbarkeit. Dabei entstehen bei Autoxidation der ungesättigten Fettsäuren geruchsaktive Carbonylverbindungen, insbesondere Aldehyde und Ketone, die wahrscheinlich durch β-Oxidation der Monohydroperoxide oder einer weiteren Oxidation dieser, gebildet werden. Eine weitere Verbindung stellt das Malondialdehyd dar, welches bevorzugt bei Oxidation von Fettsäuren mit drei oder mehr Doppelbindungen entsteht.

Die Kettenreaktion wird durch Rekombination zweier Hydroperoxide, Alkylradikale oder beider untereinander unterbunden. Andere Mechanismen der Inhibition werden später eingehender erläutert.

Ungesättigte Fettsäuren werden dabei schneller oxidiert als gesättigte Fettsäuren. Dies beruht auf der einfacheren Radikalbildung von Doppelbindungen im Vergleich zu Alkanen. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren oxidieren dabei noch schneller, da eine erhöhte Anzahl an Doppelbindungen zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Radikalbildung führt. Bei der Ölsäure werden die Wasserstoffatome an den Methylgruppen 8 und 11 abstrahiert, dadurch entstehen 4 Hydroperoxide, deren Konfiguration der Doppelbindungen temperaturbedingt in trans- und cis-Konfiguration übergehen. Demzufolge liegen bei Raumtemperatur 67% in trans- und 33% in cis-Form vor [Belitz et al., 2008; Kamal-Eldin, 2006].

2.3.2 Lipoxygenase-Katalase

Die zweite Möglichkeit der Lipidoxidation stellt die Lipoxygenase-Katalase dar, die aufgrund des hohen Gehaltes an Ölsäure im Olivenöl weit weniger Bedeutung hat. Die Lipoxygenase ist substratspezifisch und setzt präferiert Linol- und Linolensäure um und nicht Ölsäure [Belitz et al., 2008].

2.3.3 Photooxygenierung

Bei der Photooxygenierung findet unter Einwirkung von UV-Licht eine Umsetzung von Sauerstoff über Sensibilisatoren statt die in 3-Typen unterteilt wird.

Bei der Typ-1-Reaktion kommt es zu einer Aktivierung des Triplett-Sensibilisators wodurch ein Wasserstoffatom abstrahiert wird und ein Radikal gebildet wird, welches mit dem Sauerstoff reagiert und somit die Autoxidation ausgelöst wird. Dahingegen kommt es bei der Typ-2 Reaktion zu einer Überführung des Triplett-Sensibilisators und Triplett-Sauerstoffs $^3\text{O}_2$ in ein Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$. Der dritte Typ bewirkt einen Elektronentransfer zwischen dem angeregten Sensibilisator und dem Substrat wodurch ein Radikal-Kation entsteht und weiterreagiert [Iesce et al., 2005].

2.3.4 Inhibierung der Lipidoxidation durch natürliche Antioxidantien

Im Olivenöl natürlich vorkommende Antioxidantien sind sowohl Tocopherole als auch andere phenolische Inhaltsstoffe, welche die Lipidoxidation inhibieren können. Durch Anwesenheit von Antioxidantien (AH) und deren Peroxylradikal-Scavenger Eigenschaften wird die Lipidoxidation verhindert indem ein antioxidatives Radikal (A^\cdot) entsteht, welches stabil ist und weitere Oxidation unterbindet [Kamal-Eldin, 2006]. Phenolische Inhaltsstoffe im Olivenöl können einen Kettenabbruch verursachen indem diese als primäre Antioxidantien wirken und Wasserstoffatome an Alkylperoxylradikale abgeben, die während der Lipidoxidation entstanden sind [Velasco und Dobarganes, 2002].

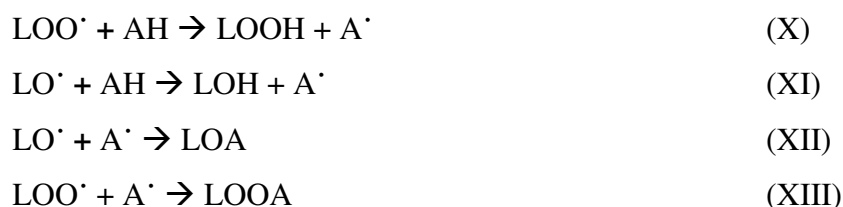


Abb. 5: Reaktionsmechanismen natürlicher Antioxidantien [Belitz et al., 2008; Kamal-Eldin, 2006].

2.3.4.1 Oxidationsmechanismen von Tocopherolen

In lipophilen Systemen interagieren α - und γ -Tocopherole auf unterschiedliche Weise. Da α -Tocopherol am phenolischen Ring vollständig methyliert ist und bei γ -Tocopherol im Gegensatz dazu die ortho-Position frei ist, sind letztere dazu fähig Radikale abzufangen und durch Dimerisierung stabile Verbindungen einzugehen (Abb. 7). α -Tocopherol reagiert aufgrund einer höheren Geschwindigkeitskonstante schneller mit Peroxylradikalen als γ -Tocopherol. Beim α -Tocopherol wird durch das Radikal eine Ringöffnung induziert und das Radikal springt zur Seitenkette (Abb. 6). Das entstandene Alkylradikal ist begünstigt dazu die Autoxidation ungesättigter Fettsäuren zu initiieren und weitere Kettenreaktionen einzugehen [Belitz et al., 2008; Kamal-Eldin und Appelqvist, 1996].

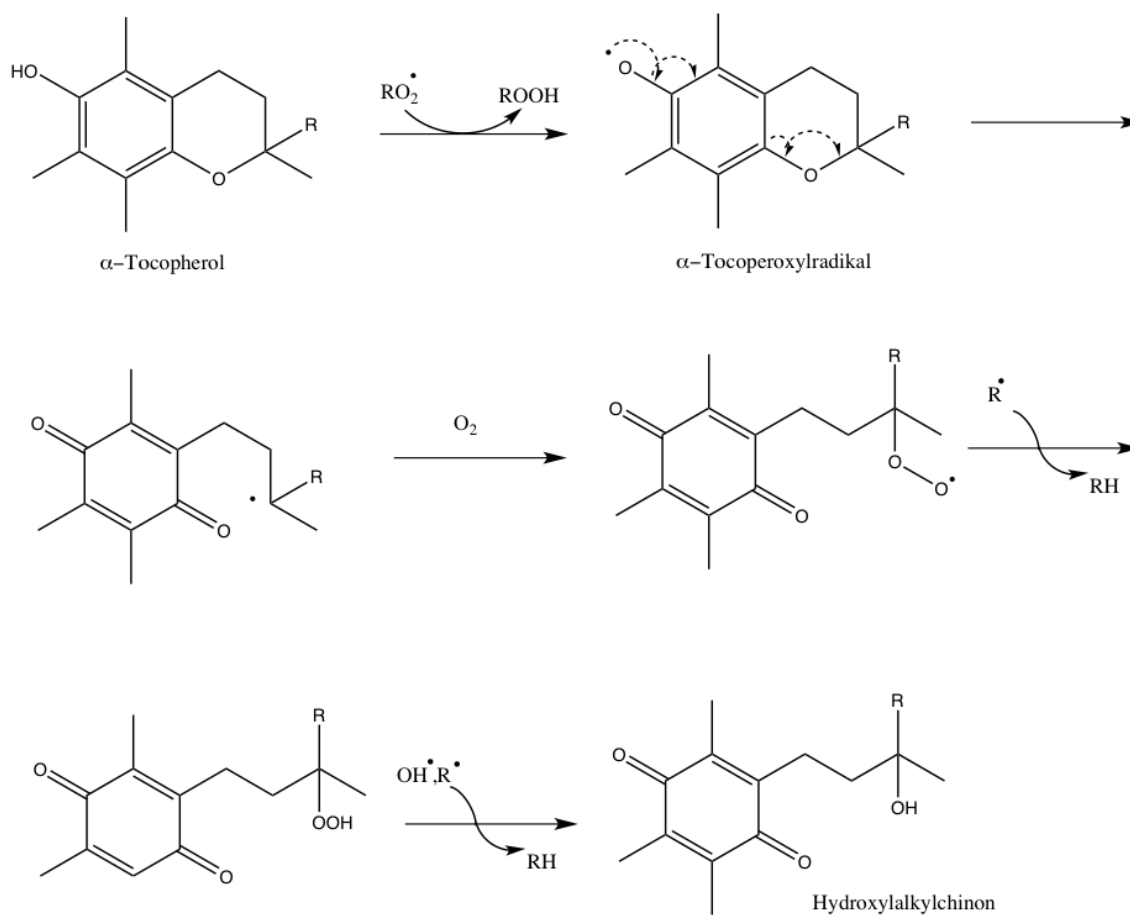


Abb. 6: Autoxidation von α -Tocopherol in lipophilen Systemen [Belitz et al., 2008].

Beim γ -Tocopherol abstrahiert das Peroxylradikal von Fettsäuren ein Wasserstoffatom und das γ -Tocopheroxyradikal (Chromanoxylradikal) entsteht. Dieses kann sowohl in ein Biphenyldimer aus zwei Chromanoxylradikalen übergehen als auch in ein Diphenyletherdimer indem ein Chromanylradikal und ein Chromanoxylradikal dimerisieren [Belitz et al., 2008].

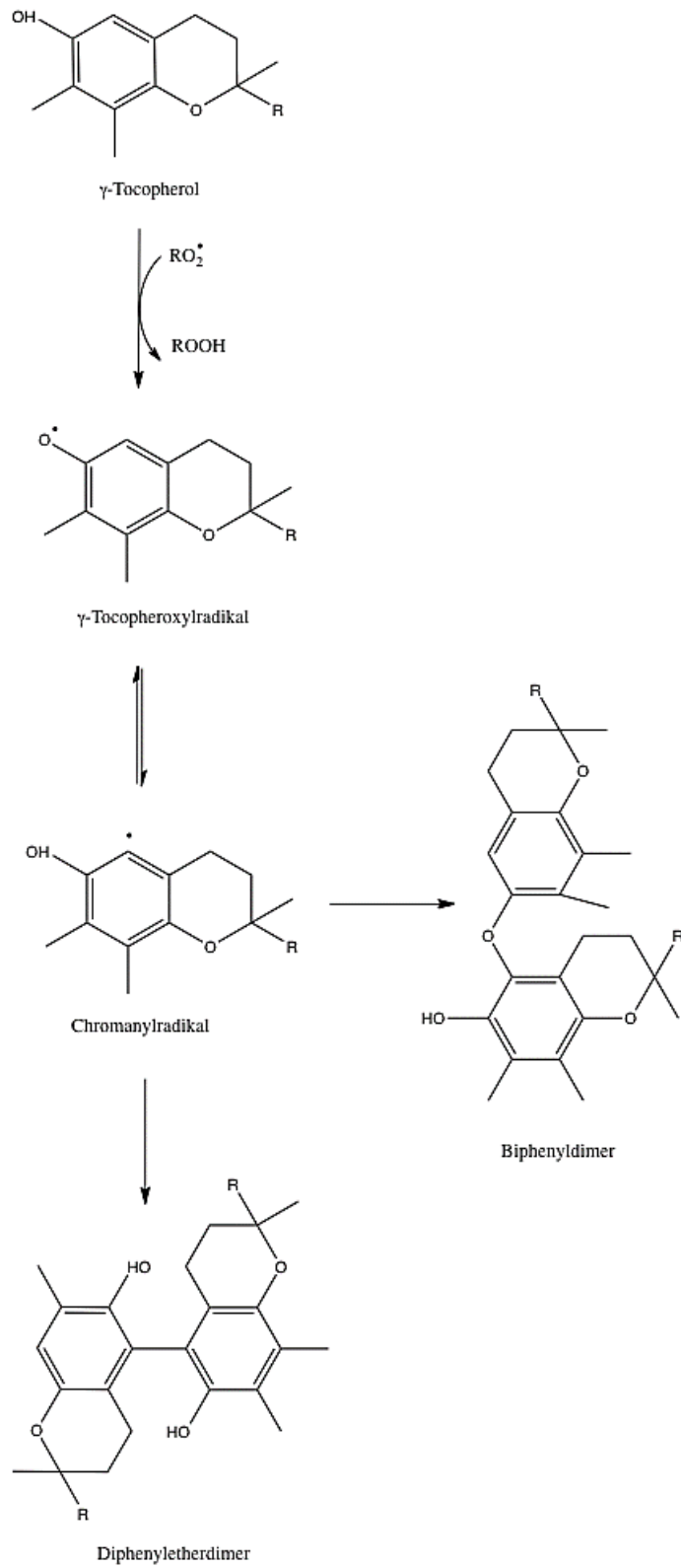


Abb. 7: Autoxidation von γ -Tocopherol in lipohilen Systemen [Belitz et al., 2008].

3 Material und Methoden

Um die Auswirkungen der Lipidoxidation auf gewisse Inhaltsstoffe von griechischem nativem Olivenöl extra zu untersuchen, wurde ein Lagerversuch vorgenommen, ein sogenannter modifizierter Schaal-Ofen-Test nach Joyner und McIntyre [1938]. Dabei wurden 500 g Olivenöl über einen Zeitraum von 28 Tagen bei 60 °C in einem Trockenschrank unter Lichtausschluss, in einem offenen Glasgefäß gelagert. Alle 4 Tage wurden Proben gesammelt und bei -24°C tiefgefroren. Diese tiefgefrorenen Proben dienten weiteren Analysen, wie der Bestimmung der Peroxidzahl, der Tocopherole, der phenolischen Inhaltsstoffe, der Lignane und Phytosterole (siehe 3.3, 3.4, 3.5.2, 3.5.3 und 3.5.4).

3.1 Materialverzeichnis

Natives Olivenöl extra aus Griechenland wurde von einem lokalen Supermarkt erworben. Eine Gesamtliste verwendeter Chemikalien und verwendeter Geräte für den experimentellen Teil ist den nachstehenden Tabellen (Tab. 3 und Tab. 4) zu entnehmen.

Tab. 3: Auflistung aller verwendeten Chemikalien und Referenzstandards.

Chemikalien	Hersteller
Kaliumjodid, $\geq 99,5 \%$	Sigma Aldrich, USA
Stärke, löslich	Carl Roth, Deutschland
1-Propanol, reinst	AppliChem, Deutschland
Aceton, $\geq 99,7 \%$	Carl Roth, Deutschland
BSTFA + TMCS, 99:1	Supelco, USA
Chloroform, $\geq 99,8 \%$	Carl Roth, Deutschland
Diethylether, $\geq 99,8 \%$	Carl Roth, Deutschland
Eisessig, $\geq 99,8 \%$	Sigma Aldrich, USA
Ethanol absolut	VWR International, USA
Ethylacetat, $\geq 99,8 \%$	Carl Roth, Deutschland

Magnesiumsulfat, anhydrous, 97 %	Acros Organics, UK
Methanol, 100 %	VWR International, USA
Natriumchlorid, $\geq 99,8$ %	Carl Roth, Deutschland
Natriumsulfat, $\geq 99,0$ %	Sigma Aldrich, USA
Natriumthiosulfatlösung, 0,01 N	Carl Roth, Deutschland
n-Hexan, ≥ 98 %	Carl Roth, Deutschland
Pyridin, 99+%	Sigma-Aldrich, USA
Pyrogallol, 99,5 %	Merck, Deutschland
HCl, 32 %	VWR International, USA

Referenzstandards

3-Hydroxytyrosol ≥ 98 %	Sigma Aldrich, USA
Benzoessäure, $\geq 99,9$ %	Sigma Aldrich, USA
Betulin	Sigma Aldrich, USA
Cholestane	Sigma Aldrich, USA
gesättigte Alkane C7 - C40	Supelco, USA
p-Hydroxybenzoessäure	Sigma Aldrich, USA
Resorcin, ≥ 99 %	Carl Roth, Deutschland
Stigmasterol, 95 %	Fluka, Schweiz
Tyrosol	Fluka, Schweiz
Vanillinsäure, ≥ 97 %	Sigma Aldrich, USA
α , β , γ , δ -Tocopherol	Supelco, USA
β -Sitosterol, 60 %	Fluka, Schweiz

3.2 Geräteverzeichnis

Tab. 4: Auflistung aller verwendeten Geräte.

Gerät und Modellnummer	Hersteller
Rotavapor, R-134	Büchi, Schweiz
Zentrifuge, Super Vario N	Funke Gerber, Deutschland
<u>HPLC:</u>	
Säule, NH ₂ -NP (5 µm Partikelgröße; 25 cm x 4,6 mm)	Supelco, USA
Fluoreszenzdetektor RF535	Shimadzu, Japan
Pumpe, LC-6A	Shimadzu, Japan
<u>GC-MS:</u>	
Gaschromatograph, Thermo GC	Thermo Electron Corporation, USA
Ultra DSQ II Single Quadrupole GC-MS	Thermo Electron Corporation, USA
Säule, HP-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 mm)	Agilent Technologies, USA

3.3 Bestimmung der Peroxidzahl

Durch die Peroxidzahl (PV) Kann der Oxidationszustand eines Öles bestimmt werden. Sie ist ein Maß für den in einem Öl peroxidisch gebundenen Sauerstoff, insbesondere Hydroperoxiden. Dadurch kann diese zur Beurteilung des Oxidationsgrades eines Fettes bzw. Öles herangezogen werden [Fiebig und Godelmann, 1997].

Die Peroxidzahl gibt die in einem Kilogramm Probe enthaltene Menge an milliäquivalenten Sauerstoff an, durch Titration mit einer Natriumthiosulfatlösung als Reduktionsmittel und einer Kaliumjodid-Stärke-Lösung als Indikator unter den Bedingungen der nachstehenden Methode [IUPAC 2.501].

Methode

Die Einwaage erfolgte nach erwarteter Peroxidzahl. Dabei wurden 2 g Olivenöl mit 10 mL Chloroform versetzt und geschüttelt. Dazu wurden 15 mL Essigsäure und 1 mL gesättigte Kaliumjodidlösung gegeben und 5 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte, nach Zugabe von 75 mL deionisiertem Wasser und 1 mL 1 %ige Stärkelösung, eine Titration gegen Natriumthiosulfatlösung (0,01N). Es erfolgte eine Doppelbestimmung der Proben [IUPAC 2.501].

Die Ermittlung der PV erfolgte mittels folgender Formel:

$$PV = \frac{\text{Verbrauch [mL]} \times 0,01 \text{ N Thiosulfat}}{\text{Einwaage [g]}} \times 1000$$

3.4 Quantifizierung von Tocopherolen mittels HPLC

Aufbereitung der Proben

Zur Ermittlung der Tocopherole wurden 1 g Olivenöl in einem 25 mL Messkolben mit n-Hexan verdünnt. Von jeder Probennahme wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. Aus einer nach der DGF Methode F-II 4a (00) hergestellten Stammlösung, die jeweils 10 ppm α -, β -, γ - und δ -Tocopherol in Hexan gelöst enthielt wurden Kalibrationslösungen mit 4 Verdünnungen hergestellt mit Konzentration im Bereich von 1 ppm bis 10 ppm. Diese Standardreihe wurde vor den Proben injiziert [DGF F-II 4a (00)].

Methode HPLC

Die Analyse der Tocopherole wurde mittels einer HPLC des Herstellers Shimadzu durchgeführt. Die Ausstattung bestand aus einer Normalphasensäule (NH₂-NP, Supelco) und einem Fluoreszenzdetektor, mit einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 330 nm. Als Laufmittel diente Essigsäureethylester/ n-Hexan im Verhältnis 3:7 (v/v).

Die Injektion erfolgte manuell. Das Injektionsvolumen betrug 200 μ L mit einer Laufzeit von 6 Minuten und einer Flussrate von 1 mL/min.

3.5 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Da Olivenöl eine Vielzahl an phenolischen Verbindungen enthält und die Referenzstandards teilweise hohe Kosten aufweisen ist der Einsatz einer gaschromatographischen Methode gekoppelt mit Massenspektrometrie zur Identifizierung sinnvoll. Dadurch kann sowohl eine qualitative als auch semiquantitative Beurteilung mittels internem Standard durchgeführt werden. Darüber hinaus können mit entsprechenden Methoden, siehe 3.5.3 und 3.5.4 auch im Öl enthaltene Lignane und Phytosterole identifiziert werden.

3.5.1 Linearer Retentionsindex

Die Ermittlung des linearen Retentionsindex nach Vandendool und Kratz [1963] dient dem Vergleich zu identifizierender Substanzen mit den Indizes von Datenbanken oder Referenzliteratur. Somit kann dieser, unabhängig von der verwendeten Säule oder dem jeweiligen Temperaturprogramm Aufschluss über die Elution/ Identität einer Substanz geben. Die Verwendung des linearen Retentionsindex findet Anwendung bei temperaturprogrammierten Methoden. Unter isothermen Bedingungen wird eine logarithmierte Formel herangezogen.

Zur Ermittlung werden die zwei der Probe am nächsten stehenden eluierten Alkan-Peaks herangezogen. Dadurch kann eine falsche Identifikation, bei fehlendem Referenzstandard, aufgrund eines alleinigen Vergleichs anhand von Massenspektren minimiert und verhindert werden [Zhang et al., 2011].

Method

Ein Standard gesättigter Alkane von C7 bis C40 (c = 1000 µg/ 1,5 mL jedes Alkans gelöst in n-Hexan) wurde mit der jeweiligen, identischen Temperaturprogrammmethodik der zu untersuchenden Proben in 3.5.2, 3.5.3 und 3.5.4 injiziert. Anschließend erfolgte die Berechnung des linearen Retentionsindex nach folgender Formel:

$$I^T = 100 \left[\frac{t_{Ri}^T - t_{Rz}^T}{t_{R(z+1)}^T - t_{Rz}^T} + z \right]$$

Erläuterungen zur Formel:

I^T	Retentionsindex für temperaturprogrammierte GC-Analyse, konstante Erhitzungsrate
z	Anzahl der Kohlenstoffatome des n-Alkanes, das unmittelbar vor dem Probenpeak eluiert wird
t_{Ri}^T	Retentionszeit nach dem Probenpeak
t_{Rz}^T	Retentionszeit des n-Alkanpeaks, der unmittelbar vor dem Probenpeak eluiert wird
$t_{R(z+1)}^T$	Retentionszeit des n-Alkanpeaks, der unmittelbar nach dem Probenpeak eluiert wird

[Sigma-Aldrich; NIST].

3.5.2 Identifizierung phenolischer Inhaltstoffe via GC-MS

Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die GC-MS Methoden wurden mit einem Thermo Trace GC Ultra gekoppelt mit einem DSQ II Massenspektrometer (Thermo Electron Corporation) durchgeführt. Ausgestattet mit einer HP-5 Säule (Agilent Technologies: 30 m x 0,25 mm, 0,25 mm Filmbreite) und einem split/ splitless-Injektor.

Extraktion phenolischer Inhaltsstoffe

Die Aufbereitung erfolgte in modifizierter Weise dem Protokoll nach Arslan et al. [2013]. Ein dreimaliges Extrahieren von 1,0 g Olivenöl erfolgte nach Zugabe des internen Standards (100 µL; 500 ppm Resorcin in Methanol gelöst) mit 2 mL Methanol: Wasser (60:40, v/v) und 1 mL Hexan. Dabei wurde die Probe 2 Minuten mittels Vortexer gemischt und anschließend 5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Danach folgte eine Entnahme der

Methanol-Wasserphase. Diese wurde noch zweimalig mit Hexan gewaschen um eventuelle Lipidreste zu entfernen und über Nacht bei -24°C tiefgefroren.

Nach Zugabe von 1 mL 1-Propanol zu der Methanol-Wasserphase folgte eine Destillation im Rotavapor zunächst bei 151 mbar und später bei 22 mbar und 40°C.

Zur Silylierung der funktionellen Gruppen erfolgte eine Inkubation mit 100 µL Pyridin und 100 µL BSTFA für 60 Minuten bei 60 °C und anschließendes Lösen in 100 µL Heptan.

Temperaturprogrammmethodik des GC-MS

Anfangs-Ofentemperatur 70°C, 70°C zu 135°C bei 2°C/min., 10 min. bei 135°C, 135°C zu 220°C bei 4°C/min., 10 min. bei 220°C, 220°C zu 270°C bei 3,5°C/min., 20 min. bei 270°C.

Die Ionisation der Komponenten erfolgte durch Elektronenstoßionisation im positiven Ionenmodus und einer Elektronenenergie von 70 eV. Die Messung erfolgte im Full-Scan Mode im Bereich von 50-600 m/z.

Injektionsvolumen: 1 µL Splitlessverfahren, manuelle Injektion und einer Injektortemperatur von 270°C.

3.5.3 Identifizierung von Lignanen via GC-MS

Extraktion von Lignanen

Zunächst wurden 5 g Olivenöl in 50 mL Hexan und 100 mL Aceton gelöst und eine Stunde im Ultraschallbad inkubiert. Es folgte eine zweite Inkubation mit der Dauer von einer Stunde mit zusätzlichen 100 mL eines Aceton-Wassergemisches (70:30, v/v). Nach dem Ultraschallbad wurde die Aceton-Wasserphase abgetrennt und diese zweimalig mit Hexan gewaschen. Anschließend wurde die Lösung auf 30 mL im Rotavapor, zuerst bei 239 mbar und später bei 22 mbar, eingeeengt.

Säurehydrolyse

Zum Erhalt der Lignane als Aglyka wurde eine Säurehydrolyse vorgenommen, in dem 4 mL HCl (6N) zum Extrakt gegeben wurden und für eine Stunde bei 95 °C im Wasserbad unter mehrmaligem Schütteln hydrolysiert wurden.

Vor der dreimaligen Extraktion mit 10 mL Ethylacetat: n-Hexan (1:1, v/v) wurden 30 μ L einer Betulinol-Lösung (520 ppm gelöst in Aceton) als interner Standard zugegeben. Die kombinierten organischen Phasen wurden im Rotavapor bei 150 mbar abdestilliert und anschließend mit 100 μ L Pyridin und 100 μ L BSTFA 60 Minuten bei 60 °C derivatisiert. Vor der Injektion wurde die derivatisierte Probe in 100 μ L Heptan gelöst [Bonzanini et al., 2009].

Temperaturprogrammmethodik des GC-MS

Anfangsofentemperatur 60°C, 1 min. bei 60°C, 60°C zu 250°C bei 30°C/min., 10 min. bei 250°C, 250°C zu 280°C bei 2°C/min., 18 min. bei 280°C [Bonzanini et al., 2009].

Die Ionisation der Komponenten erfolgte durch Elektronenstoßionisation im positiven Ionenmodus unter Elektronenenergie von 70 eV. Die Messung erfolgte im Full-Scan Mode im Bereich von 50-750 m/z.

Injektionsvolumen 1 μ L im Splitverfahren mit einer Splitrate von 1/50, manuelle Injektion und einer Injektortemperatur von 250°C.

3.5.4 Identifizierung von unverseifbaren Fettnebenbestandteilen via GC-MS

Verseifung

Die Aufbereitung der Proben erfolgte nach Panfili et al. [2003]. Die Verseifung fand im Wasserbad bei 75 °C über 45 Minuten nach Zugabe der Chemikalien in nachstehender Reihenfolge statt. Dabei wurden zu 0,5 g Olivenöl 2 mL Kaliumhydroxid-Lösung (600 g/L), 2 mL 95% Ethanol, 2 mL Natriumchlorid-Lösung (10 g/L) und als Antioxidans 5 mL ethanolisches Pyrogallol (60 g/L), gegeben. Als interner Standard diente 1 mL einer 5 α -Cholestane-Lösung (200 ppm gelöst in Hexan).

Nach Abkühlung wurden 15 mL Natriumchlorid-Lösung (10 g/L) hinzugefügt. Es folgte eine zweimalige Extraktion mit 15 mL n-Hexan: Ethylacetat (9:1, v/v), bei der die organische Phase gesammelt und mit Natriumsulfat getrocknet wurde. Die Lösungsmittel wurden im Rotavapor bei 156 mbar abdestilliert. Das Extrakt wurde mit 2 mL Diethylether versetzt und unter Stickstoff getrocknet, bevor es mit 100 μ L Pyridin und 100 μ L BSTFA, bei 60 °C über 60 Minuten, silyliert wurde. Die derivatisierten Proben wurden anschließend mit 1 mL Heptan versetzt.

Temperaturprogrammmethodik des GC-MS

Anfangsofentemperatur 100°C, 2 min. bei 100°C, 100°C zu 270°C bei 30°C/min., 1 min. bei 270°C, 270°C zu 300°C bei 3°C/min., 2 min. bei 300°C.

Die Ionisation der Komponenten erfolgte durch Elektronenstoßionisation im positiven Ionenmodus unter Elektronenenergie von 70 eV. Die Messung erfolgte im Full-Scan Mode im Bereich von 50-600 m/z.

Injektionsvolumen 1 µL im Splitverfahren mit einer Splitrate von 1/50, manuelle Injektion bei einer Injektortemperatur von 250°C.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Resultate der Peroxidzahl

Die Peroxidzahl (PV) stieg über die Testdauer von 28 Tagen bei einer Temperatur von 60°C von 12,5 meq O₂/kg auf einen Wert von 39,3 meq O₂/kg (Tab. 5). Der Anstieg der Peroxidzahl verlief mit zunehmender Inkubationsdauer des Olivenöls bei 60°C annähernd linear mit R²=0,98, siehe Abb. 8.

Laut der EU Verordnung, *über die Merkmale von Olivenölen und Oliventresterölen sowie die Verfahren zu ihrer Bestimmung* [EWG/1991/2568, Anhang I] darf natives Olivenöl extra eine Peroxidzahl von 20 meq O₂/kg nicht überschreiten um verkehrsfähig zu bleiben. Ab dieser Peroxidzahl weisen auch die sensorischen Eigenschaften des Öles einen Fehlgeschmack auf. Zu Beginn des Lagerversuches lag der PV-Wert bei 12,3 meq O₂/kg, was unterhalb des zulässigen Wertes für natives Olivenöl extra liegt. Nach 8 Tagen der thermischen Behandlung wurde dieser Wert allerdings schon mit 20,7 meq O₂/kg überschritten.

Tab. 5: Resultate der Peroxidzahlbestimmung.

Dauer bei 60°C [d]	PV [meq O ₂ /kg]
0	12,5 (0,39)
4	16,5 (0,02)
8	20,7 (0,84)
12	26,1 (0,92)
16	30,7 (1,75)
20	34,3 (1,27)
24	37,0 (0,02)
28	39,3 (0,43)

Mittelwert aus Doppelbestimmung (Spannweite)

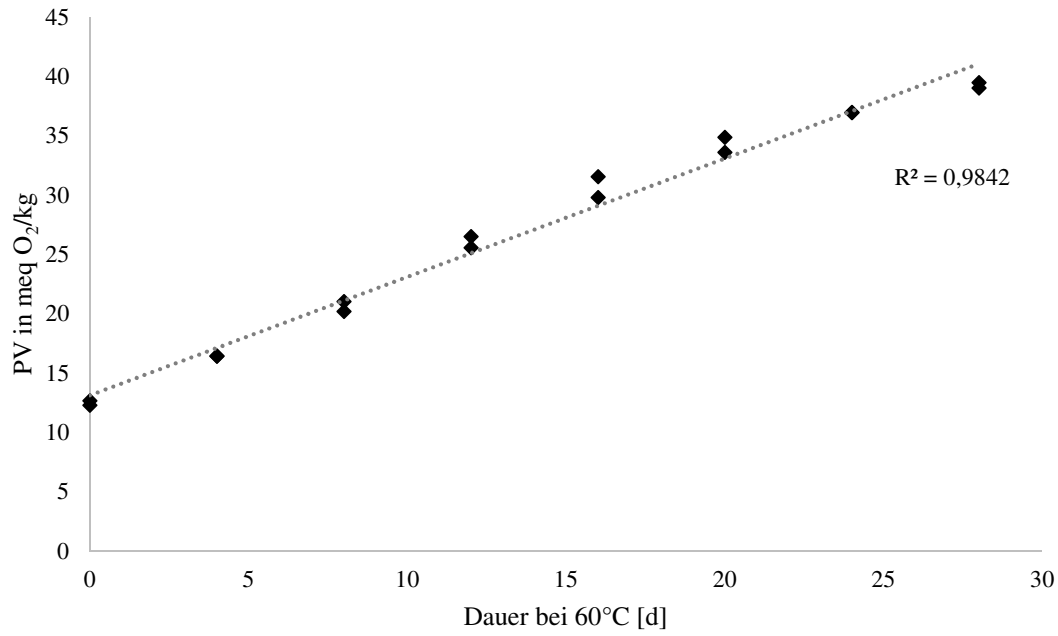


Abb. 8: Ermittelte Peroxidzahl von Olivenöl nach Inkubation bei 60 °C über 28 Tage. Anzeige der Doppelbestimmung.

4.2 Tocopherole

Zur Analyse der Tocopherole in nativem Olivenöl extra wurden α -Tocopherol sowie auch δ -Tocopherol detektiert. Zur Berechnung der Tocopherolgehalte diente eine erstellte Kalibriergerade der Peakflächen der Standardverdünnungsreihe. Zu Beginn des Oxidationstests lagen die Gehalte des α -Tocopherols bei 219,25 ppm. Dies ist im Einvernehmen mit Analysen von Psomiadou et al. [2000], der bei 25 nativen griechischen Olivenölen α -Tocopherolkonzentrationen zwischen 98 und 370 ppm fand, wobei jedoch 60 % der Proben über 200 ppm lagen. Nach 28 Tagen thermischer Behandlung lagen die Werte nur noch bei 76,34 ppm, das entspricht einer Abnahme von etwa 36 % (Tab. 6). Im Verlauf des Schaal-Ofen-Testes konnte eine annähernd quadratische Abnahme mit einer Korrelation von $R^2 = 0,97$ verzeichnet werden (Abb. 9).

Die δ -Tocopherolgehalte wurden nur in Spuren nachgewiesen und lagen unter 0,0024 ppm.

Tab. 6: Resultate der Bestimmung des α -Tocopherols mittels HPLC

Dauer bei 60°C [d]	α -Tocopherol [ppm]	PV [meq O ₂ /kg]
0	219,25 (0,90)	12,5
4	212,30 (3,20)	16,5
8	201,60 (9,00)	20,6
12	184,10 (0,20)	26,1
16	154,90 (2,20)	30,7
20	124,75 (0,70)	34,3
24	104,90 (1,40)	37,0
28	78,55 (4,50)	39,3

α -Tocopherol: Mittelwert aus Doppelbestimmung (Spannweite)

Zu Beginn w die Verlustrate des α -Tocopherolgehaltes mit niedrigerer Peroxidzahl geringer wohingegen diese mit zunehmender Peroxidzahl rapide anstieg bis hin zu einem Gesamtverlust von etwa 64 % (Vgl. Abb. 9 und Tab. 6).

Auch Nissiotis und Tasioula-Margari [2002] konnten eine kontinuierliche Abnahme des α -Tocopherolgehaltes mit zunehmendem Oxidationsgrad verzeichnen. Baldioli et al.

[1996] konnte einen synergistischen Effekt von α -Tocopherol und Hydroxytyrosol, sowohl in freier Form als auch in oleosidischer Form, in aufgereinigtem Olivenöl feststellen. Dabei konnte kein Effekt auf die Oxidationsstabilität anhand der Konzentration an Gesamttocopherolen nachgewiesen werden. Auch höhere Konzentrationen an Tocopherolen führten nicht zu einem höheren antioxidativen Effekt.

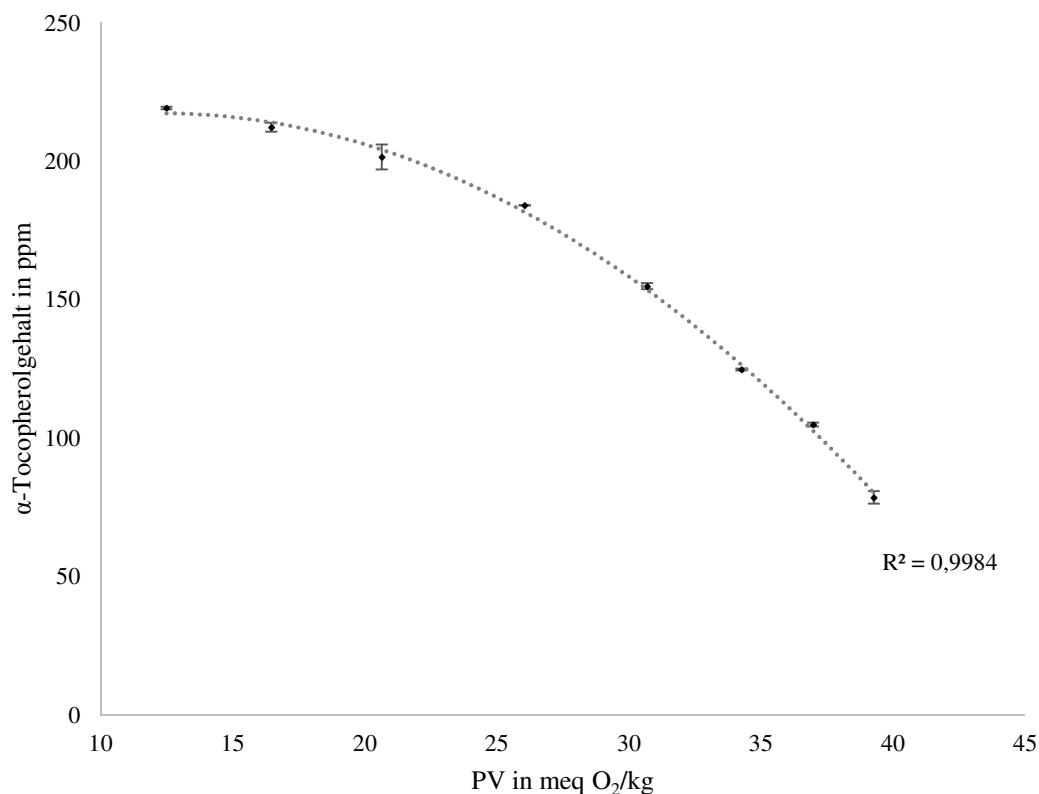
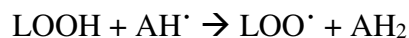


Abb. 9: Ermittelte α -Tocopherolgehalte mittels HPLC mit zunehmendem Oxidationsgrad. Mittelwert aus Doppelbestimmung mit Anzeige der Spannweite.

Blekas et al. [1995] analysierte antioxidative Effekte von α -Tocopherol verschiedener Konzentrationen (100 ppm, 500 ppm und 1000 ppm) in aufgereinigtem Olivenöl bei thermischer Oxidation von 40°C. Dabei zeigten alle Konzentrationen einen antioxidativen Effekt, wobei die geringste α -Tocopherolkonzentration den größten Effekt zeigte. Allerdings wurde auch eine pro-oxidative Wirkung des α -Tocopherols in frühen Stadien der Autoxidation gefunden. Dies bestätigte auch Satue [1995] bei dem α -Tocopherol in Konzentrationen von > 250 ppm als Pro-Oxidant wirkte. Dieser pro-oxidative Effekt wird durch einen Anfall hoher Konzentrationen des Alkylradikals (AH[•]) begünstigt und führt zu Peroxidradikalen [Schuler, 1990].

Pro-oxidative Aktivität



Laut Papadopoulos et al. [1992] ist die Stabilität des Olivenöls von zwei Faktoren abhängig wie dem α -Tocopherolgehalt und auch den polaren phenolischen Inhaltsstoffen. Die polaren phenolischen Inhaltsstoffe sind in den anfänglichen Autoxidationsstadien für deren Inhibition verantwortlich, wohingegen α -Tocopherol an Bedeutung gewinnt sobald eine kritische Konzentration an primären Autoxidationsprodukten erreicht ist. Auch Aparicio et al. [1999] misst den phenolischen und ortho-diphenolischen Verbindungen eine größere Bedeutung im Beitrag der Stabilisierung (51 %) von nativem Olivenöl zu als dem α -Tocopherol (11 %) oder der Fettsäuren Zusammensetzung (24 %) eines Öles.

Das bedeutet, dass α -Tocopherol sowohl als Radikalfänger fungiert wie auch als freier Radikal-Propagator [Blekas et al., 1995] und diese Wirkungen von der Konzentration und der enthaltenen Öl-Matrix abhängig sind.

4.3 Phenolische Inhaltsstoffe (Methanol-Wasser Extraktion)

4.3.1 Identifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe

Die Identifizierung erfolgte anhand von nachstehendem Chromatogramm (Abb. 10) mittels GC-MS.

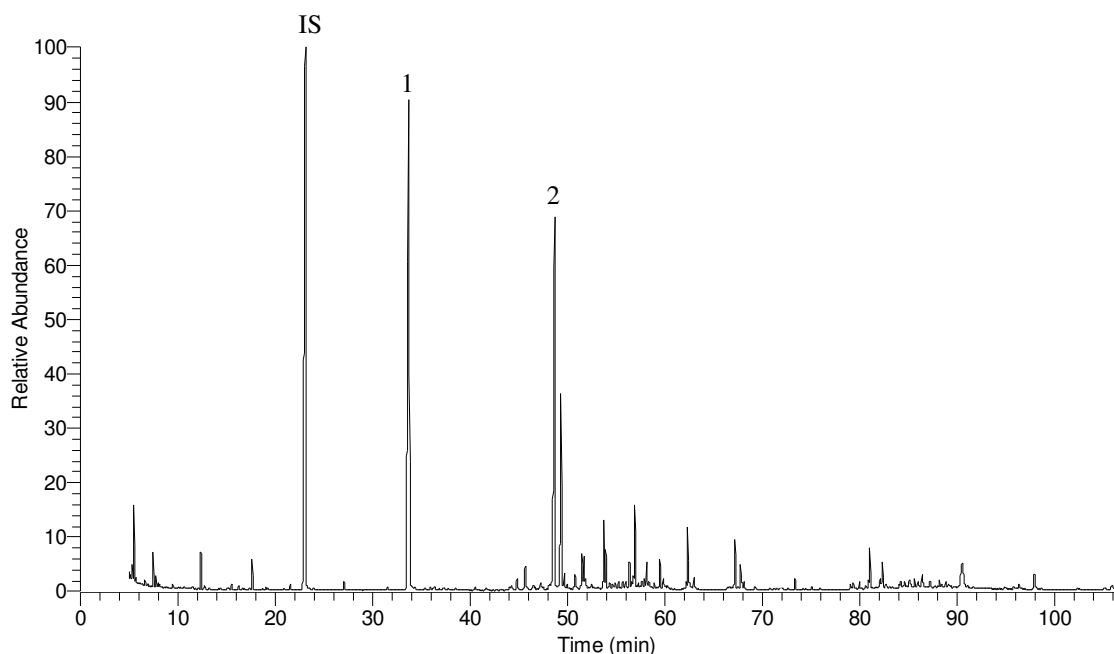


Abb. 10: Chromtogramm der phenolischen Inhaltsstoffe durch Methanol-Wasser Extraktion.

Peaks: IS = Interner Standard Resorcin (500 ppm); 1, Tyrosol; 2, Hydroxytyrosol

Dabei konnten folgende Substanzen identifiziert werden (siehe Tab. 7):

Als erstes eluierte die *Benzoessäure* mit einer Retentionszeit von 15,19 min. Durch einen vorher injizierten Referenzstandard konnte dies bestätigt werden.

Die *Phosphorsäure*, *Glycerol* und *Bernsteinsäure* konnten über die NIST-Datenbank und vergleichbare Retentionsindizes, sowie Massenspektren konfirmiert werden.

Tyrosol, zweifach TMS-derivatisiert, konnte aufgrund eines injizierten Referenzstandards bestätigt werden und wies folgendes Massenspektrum auf (siehe Abb. 11).

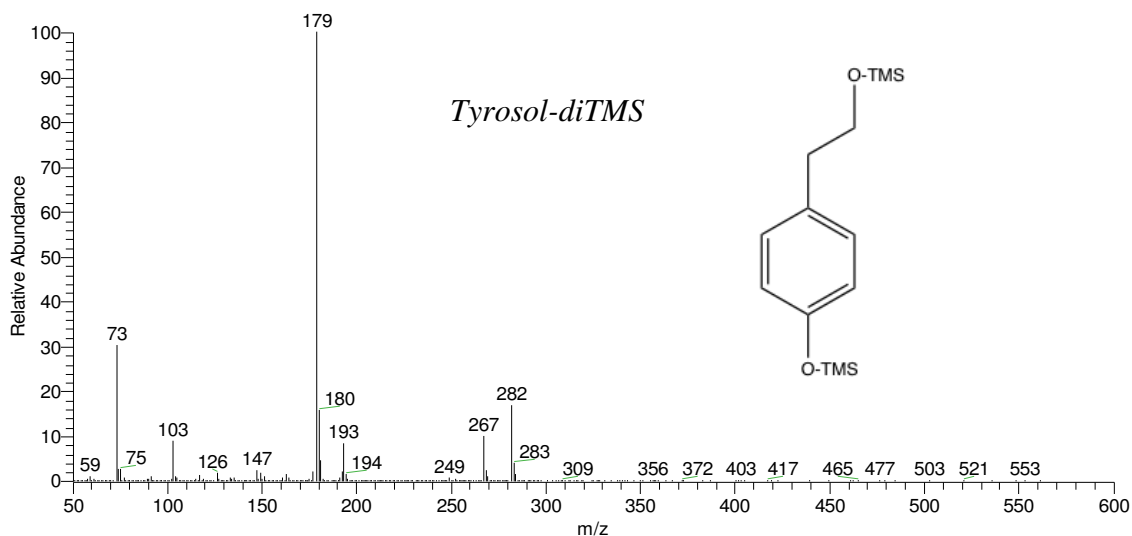


Abb. 11: Massenspektrum von Tyrosol in zweifach TMS-derivatisierter Form mit Rt 33,79 min. und Strukturformel.

4-Hydroxyphenyllessigsäure, zweifach TMS-derivatisiert wurde über die NIST-Datenbank 2005, ein vergleichbares Massenspektrum und den berechneten linearen Retentionsindex (1789) konfirmiert.

Vanillinsäure konnte durch einen Referenzstandard bestätigt werden.

Hydroxytyrosol, dreifach TMS derivatisiert, konnte ebenso aufgrund eines Referenzstandards bestätigt werden. Es zeigte folgendes Massenspektrum (Abb. 12).

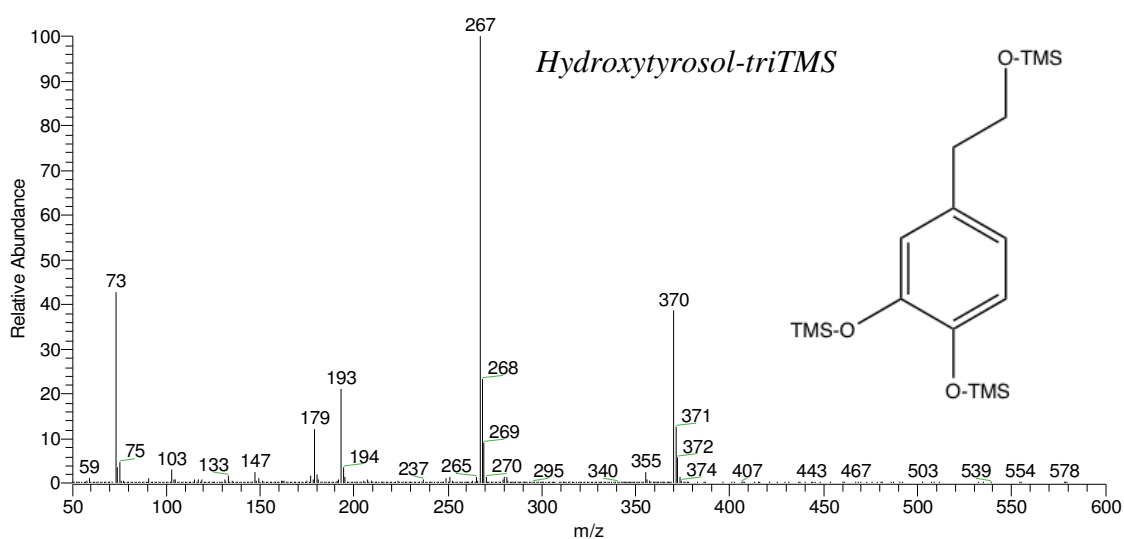


Abb. 12: Massenspektrum von Hydroxytyrosol mit Rt 48,76 min. und Strukturformel.

Die Identität von *Squalen* wurde über die NIST-Datenbank 2005 bestätigt.

β-Sitosterol konnte über einen vorher injizierten Referenzstandard bestätigt werden.

Pinoresinol in zweifach TMS-derivatisierter Form konnte durch ein Vergleichsmassenspektrum [Owen et al., 2000b] bestätigt werden.

Acetoxypinoresinol, konnte durch Vergleichsmassenspektren nachgewiesen werden [Owen et al., 2000b]. Es lag in zweifach derivatisierter Form vor.

Tab. 7: Identifizierte Substanzen durch Methanol-Wasser Extraktion via GC-MS

Name	Rt [min]	I ^T HP5	RI NIST05	Identifizierte Ionen [m/z]
Benzoessäure	15,19	1337	1253	194*, 179, 147, 135, 105, 73**
Phosphorsäure	17,35	1378	1289	314*, 299**, 239, 207, 170, 147, 120, 73
Glycerol	17,63	1384	1292	308*, 293, 263, 218, 205, 147, 133, 103, 73**
Bernsteinsäure	19,24	1413	1323	262*, 247, 218, 172, 147**, 73
Tyrosol	33,79	1665	1566	282*, 267, 249, 209, 193, 181, 179**, 148, 133, 118, 103, 73
p-Hydroxyphenyl- essigsäure	38,46	1729	1629	357, 296*, 252, 221, 199, 179, 147, 95, 73**
Vanillinsäure	48,31	1866	1753	312*, 297, 282, 267, 253, 223, 193, 178, 126, 73**
Hydroxytyrosol	48,76	1874	1773	370*, 279, 267**, 193, 179, 103
1-Monooleoylglyce- rol	81,02	2861	2788	500*, 485, 397, 368, 339, 257, 203, 147, 129, 73**
Squalen	82,29	2903	2914	410*, 398, 367, 325, 297, 271, 243, 215, 192, 69**
β-Sitosterol (1x TMS)	95,76	3409	2789	486*, 396, 357, 281, 207, 129, 73**
Pinoresinol (2x TMS)	96,31	3426	n.v.	502*, 487, 403, 293, 235, 223, 209, 179, 131, 73**
(+)-1-Acetoxypino- resinol	97,89	3461	n.v.	560*, 545, 351, 276**, 245, 235, 223, 217, 209, 194, 187, 179, 131, 73

Rt = Retentionsindex, I^T HP5 = linearer Retentionsindex HP5-Säule, RI NIST05 = Retentionsindex aus NIST-Datenbank 2005, n.v.= nicht verfügbar.

* = Molekülionenpeak (M⁺)

** = Basispeak

4.3.2 Quantifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe

Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Berechnung über die Peakfläche des internen Standards Resorcinol. Die Konzentrationen der analysierten phenolischen Inhaltsstoffe sind in Tab. 8 und Tab. 9 ersichtlich. Es erfolgte hierbei keine vorherige Hydrolyse der phenolischen Inhaltsstoffe (siehe 3.5.2).

Tab. 8: Konzentrationen der phenolischen Inhaltsstoffe analysiert via GC-MS mit zunehmendem Oxidationsgrad.

Dauer bei 60°C [d]	PV [meq O ₂ /kg]	p-HPA [ppm]	VS [ppm]	Pi [ppm]	AcO-Pi [ppm]
0	12,5	0,20 (0,01)	0,17 (0,00)	0,61 (0,74)	1,74 (0,14)
4	16,5	0,18 (0,02)	0,20 (0,21)	0,45 (0,25)	1,17 (0,35)
8	20,6	0,12 (0,04)	0,36 (0,06)	0,48 (0,61)	1,23 (1,39)
12	26,1	0,10 (0,01)	0,57 (0,25)	1,33 (0,21)	3,75 (0,62)
16	30,7	0,11 (0,00)	0,40 (0,00)	1,60 (0,00)	4,42 (0,00)
20	34,3	0,09 (0,01)	0,54 (0,01)	1,06 (0,55)	2,83 (0,97)
24	37,0	0,10 (0,02)	0,35 (0,02)	0,80 (0,69)	1,99 (1,37)
28	39,3	0,09 (0,01)	0,41 (0,03)	0,96 (0,00)	2,41 (0,13)

p-HPA = p-Hydroxyphenylelessigsäure; HV=Homovanillylalkohol; VS=Vanillinsäure; β -Si = β -Sitosterol; AcO-Pi = 1-Acetoxypinoresinol; Pi =Pinoresinol

Tab. 9: Konzentrationen des Tyrosol und Hydroxytyrosol analysiert via GC-MS mit zunehmendem Oxidationsgrad.

Dauer bei 60°C [d]	PV [meq O ₂ /kg]	OHTyr [ppm]	Tyr [ppm]	α -Tocopherol [ppm]
0	12,5	30,39 (0,59)	55,11 (3,85)	219,3
4	16,5	25,23 (2,62)	55,44 (14,14)	212,3
8	20,6	27,94 (9,73)	49,75 (12,77)	201,6
12	26,1	33,47 (7,50)	47,05 (6,16)	184,1
16	30,7	24,56 (0,00)	42,91 (0,00)	154,9
20	34,3	19,94 (0,85)	43,24 (2,76)	124,8
24	37,0	15,52 (2,21)	40,29 (1,56)	104,9
28	39,3	9,44 (3,27)	40,00 (0,21)	78,6

Mittelwert aus Doppelbestimmung (Spannweite); OHTyr = Hydroxytyrosol, Tyr= Tyrosol, 4-HPA = 4-Hydroxyphenylelessigsäure

Sowohl Tyrosol (-27 %) als auch Hydroxytyrosol (-69 %) verzeichneten nach vollständiger Lagerdauer eine Abnahme des Ausgangsgehaltes (siehe Tab. 9). Dabei konnte aber nur bei Tyrosol eine kontinuierliche Abnahme des Gehalts mit einer Korrelation von $R^2 =$

0,96 festgestellt werden. Der Gehalt des Hydroxytyrosols hingegen zeigte einen diskontinuierlicheren Verlauf. Zu Beginn des Lagerversuches sank die Konzentration an Hydroxytyrosol im Olivenöl um etwa 17 % von 30,38 ppm auf 25,23 ppm nach 4 Tagen, wobei nach 8 Tagen wieder ein Anstieg zu verzeichnen war. Jedoch nahm nach 12 Tagen und einer Peroxidzahl von 26,1 meq O₂/kg die Konzentration des Hydroxytyrosols einen linearen Abnahmeverlauf an mit einer Korrelation von $R^2 = 0,99$ (

Abb. 13). Dies lässt darauf schließen, dass zunächst das Hydroxytyrosol während der thermischen Oxidation verbraucht wurde. Anscheinend stabilisiert das Hydroxytyrosol das native Olivenöl anfänglich bei geringerer Peroxidzahl. Denn auch die anfängliche α -Tocopherol-Verlustrate war zu Beginn geringer. Insgesamt war Hydroxytyrosol dennoch von einem großen Verlust von etwa 69 % des Ausgangswertes betroffen. Dies ist im Einklang mit Ergebnissen von Nissiotis und Tasioula-Margari [2002], die einen Verlust von 66% detektierten. Dahingegen erlitt Tyrosol nicht solch einen großen Verlust, sondern lediglich eine Verringerung von etwa 27 % nach 28 Tagen thermischer Lagerdauer.

Demzufolge versorgte Tyrosol das Olivenöl mit weniger antioxidativer Aktivität. Auch Papadopoulou und Boskou [1991] bestätigten eine von Tyrosol ausgehende vernachlässigbare antioxidative Wirkung. Bei Temperaturen von 63°C konnte eine protektive Wirkung von Hydroxytyrosol, Kaffeesäure und Protocatechusäure in nativem Olivenöl festgestellt werden.

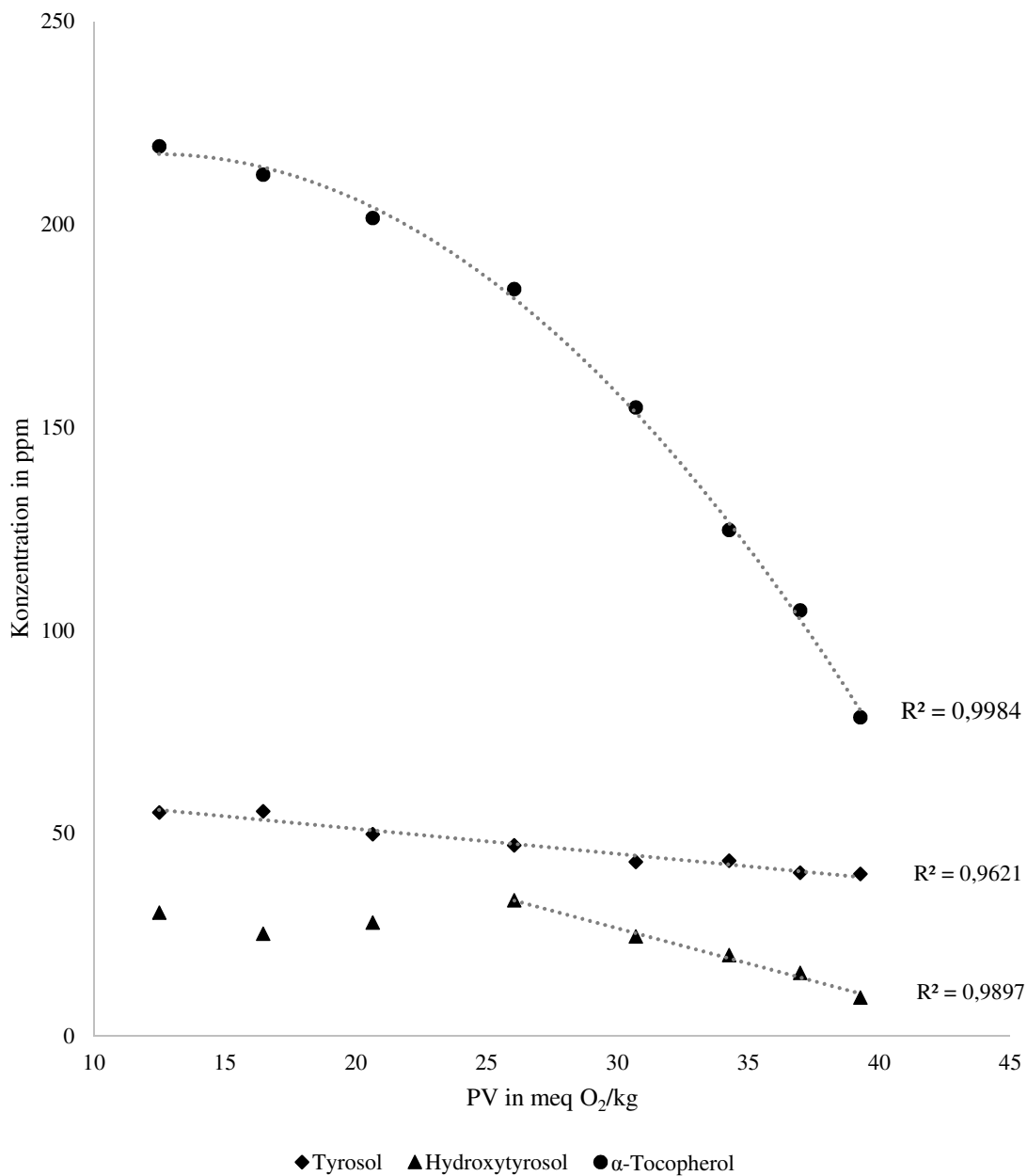


Abb. 13: Tyrosol- und Hydroxytyrosolgehalte mit zunehmendem Oxidationsgrad. Anzeige Mittelwert aus Doppelbestimmung.

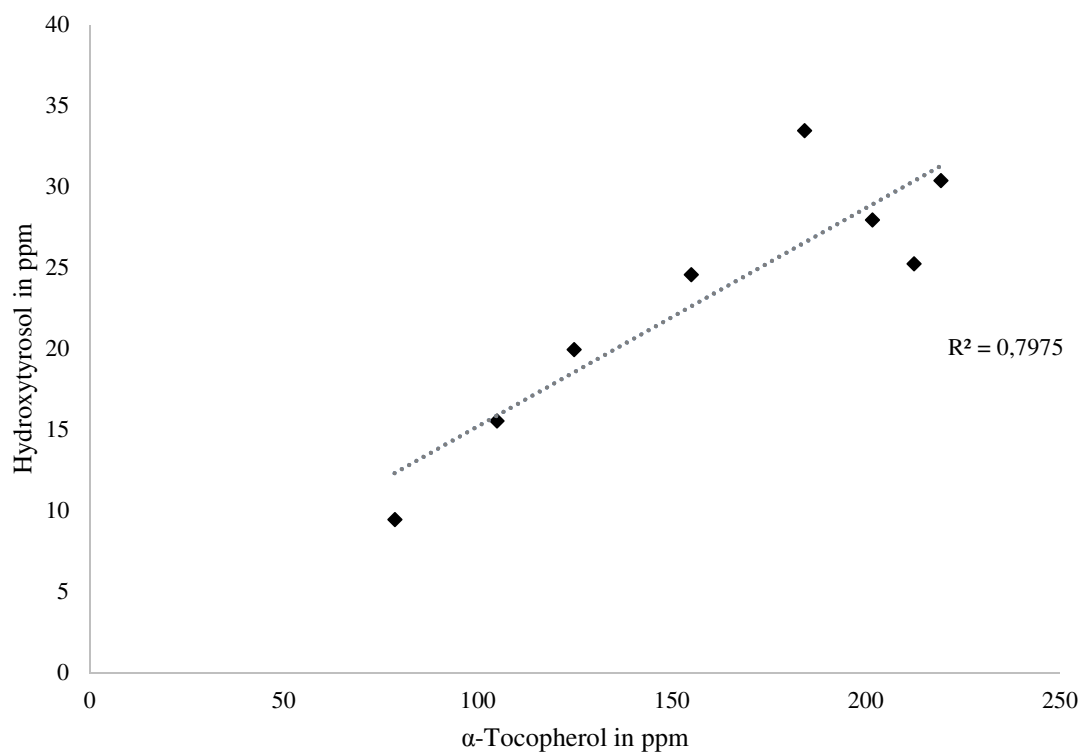


Abb. 14: Zusammenhang zwischen Hydroxytyrosol und α -Tocopherol mit zunehmendem Oxidationsgrad.

Peroxyradikale können auf 2 Wege die Autoxidation inhibieren. Zum einen durch Abstraktion eines Wasserstoffprotons des phenolischen Antioxidans (ArOH) wodurch ein Hydroperoxid (LOOH) und ein Aroxyradikal (ArO \cdot) (I) entsteht und zum anderen durch Rekombination zweier Radikale (II).



Bei phenolischen Inhaltsstoffen wie Kaffeesäure, Hydroxytyrosol und Oleuropein, bei denen eine sterische Behinderung vorliegt, kommt es häufiger zu Rekombination zweier Radikale wie in Reaktionen (II) und (IV) als zu Reaktionen (III) und (V). Dadurch sind Peroxylradikale und Alkoxyradikale von der Kettenreaktion ausgeschlossen und somit schlussendlich der Autoxidationsprozess unterbunden. Sterisch behinderte Phenole sind sozusagen effektive Antioxidantien. Dies gibt eine mögliche Erklärung der geringen antioxidativen Wirksamkeit des Tyrosols. Bei Tyrosol laufen vermehrt Reaktionen (III) und (V) ab und unter diesen Bedingungen entstehen autoxidationsförderndes Peroxylradikal und Aroxyradikal [Chimi et al., 1991].

Cinquanta et al. [1997; 2001] stellte einen Anstieg des Hydroxytyrosols nach einer Lagerdauer von einem Monat bei Lagertemperaturen zwischen 6°C (Winter) und 12°C (Sommer) bei nativen Olivenölen fest, mit späterem Anstieg des Hydroxytyrosolgehaltes nach 6 Monaten und Abfall dessen wiederum nach 12 und 18 Monaten. Während des Abfalls nach 12 Monaten kam es auch gleichzeitig zu einer Abnahme der komplexen Phenolfraction. Dadurch könnte sich dieser Anstieg des Hydroxytyrosol aus dieser Fraktion ableiten. Denn während dem Mahlen und Malaxationsprozess werden endogene β -Glucosidasen aktiviert welche die Hydrolyse von komplexeren phenolischen Inhaltsstoffen bewirken kann, u.a. dem Entstehen von Hydroxytyrosol, welches sich strukturell vom Oleuropein ableiten lässt [Rastrelli et al., 2002]. Auch der im Olivenöl enthaltene Säuregehalt könnte zum Abbau des Oleuropein beitragen, wie Brenes und de Castro [1998] dies durch Alkali- und Säurehydrolyse des Oleuropein bestätigen konnten.

Ebenfalls kam es bei Cinquanta et al. [1997] auch beim Tyrosol zu einer Zunahme der Konzentration, die in dieser Arbeit nicht festgestellt werden konnte. Montedoro et al. [1992] stellte bei einer Peroxidzahl von 50 meq O₂/kg eine Abnahme des Hydroxytyrosols fest und eine Zunahme von Tyrosol. Wobei das Tyrosol bei einem PV-Gehalt von 100 meq O₂/kg wiederum abnahm und Hydroxytyrosol gar nicht mehr detektiert wurde. Dieser Verlust des Hydroxytyrosols stellte Nissiotis auch durch thermische Oxidation von nativem Olivenöl bei 100°C fest.

Laut Angerosa et al. [1995] sind gewöhnlicherweise Oleuropein, Ligstroside, Verbascoside sowie Demethyloleuropein in ihrer glykosidischen Form in der Olive enthalten. Da diese Komponenten wasserlöslich sind und nur deren dazugehörigen Aglyka teilweise in

Öl löslich sind, wird angenommen dass nur Derivate dieser Aglyka im Olivenöl vorkommen.

Auch ein höherer Reifegrad von Oliven führte zu einer Abnahme an phenolischen Inhaltsstoffen. Denn der Oleuropeingehalt nimmt während dem Wachstum der Olive zu, bis ein Maximum erreicht wird. Während der ersten Phase des Reifeprozesses geht dieser zunächst zusammen mit dem Chlorophyllgehalt eine rapide Reduktion ein und im späteren Verlauf, wenn die Farbveränderung der Frucht eintritt, d.h. dem Auftreten von Anthocyanen, verlangsamt sich die Abnahme nochmals. Dementsprechend ist der Ausgangswert an Hydroxytyrosol in Olivenölen allgemein abhängig vom Reifegrad der verarbeiteten Oliven [Amiot et al., 1986; Amiot et al., 1989]. Mit der Reduktion des Oleuropeingehaltes treten zugleich Elenolsäureglucoside und Demethyloleuropein auf. Dies sind Abbauprodukte des Oleuropein, die wahrscheinlich durch das Enzym Esterase hervorgehen. Bestätigt ist auch eine Zunahme der Esteraseaktivität mit zunehmendem Reifeprozess [Amiot et al., 1989]. In der Arbeit war jedoch ein Anstieg von Hydroxytyrosol zu verzeichnen, der während der Lagerung und thermischen Behandlung von Olivenöl auftritt. Diese Verbindung ist ebenfalls ein Abbauprodukt von Oleuropein *in vitro*. Solch ein Anstieg trat auch während der thermischen Behandlung auf.

Baldioli et al. [1996] zeigte eine Korrelation der Konzentration hydrophiler Phenole mit der Oxidationsstabilität von nativem Olivenöl durch einen Ranzimatentest. Im Speziellen wurde ein Zusammenhang des Hydroxytyrosols in oleosidischer Form festgestellt der nicht auf dessen freie Form zurückzuführen war. Die oleosidische Form entsteht durch die in der Olive enthaltene Enzymaktivität der Glucosidase. Außerdem konnte auch eine hohe antioxidative Aktivität von Hydroxytyrosol-EDA (Dialdehyd von Elenolsäure verknüpft mit Hydroxytyrosol) und Hydroxytyrosol-EA (Isomer des Oleuropeinaglyka) in raffiniertem Olivenöl im Ranzimat festgestellt werden.

Eine direkte Vergleichbarkeit der Tyrosol- und Hydroxytyrosolkonzentrationen in Oxidations- und Lagerversuchen erwies sich aufgrund verschiedenster Faktoren als schwierig. Aufgrund unterschiedlichster Lagerbedingungen sowohl in Temperatur als auch Dauer und Schwankungen der Ausgangskonzentrationen durch Reifegrad oder anderen Umweltbedingungen war diese Gegenüberstellung erschwert.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit scheinen im Einverständnis mit der Theorie des polaren Paradoxes zu stehen. Diese besagt eine gewisse Abhängigkeit des Verhaltens von Antioxidantien in verschiedenen Medien. Polare Antioxidantien wie etwa Hydroxytyrosol und Tyrosol sind demnach wirksamer in einem unpolaren Medium, wie dem Olivenöl. Dagegen haben unpolare Antioxidantien eine bessere Wirksamkeit in polaren Medien [Shahidi und Zhong, 2011]. Dementsprechend ist die Aktivität polarer Antioxidantien in Ölen höher als in einer Öl-in-Wasser-Emulsionen. Denn die hydrophilen Antioxidantien siedeln sich an der Oberfläche des Öles an, demnach an der Schnittstelle zur Luft wo die Oxidationsprozesse ablaufen. Wohingegen sich die lipophilen Antioxidantien in der Ölphase lösen und dort weniger wirksam sind [Laguerre et al., 2013].

4.4 Lignane (Aceton-Wasser Extraktion)

4.4.1 Identifizierung der Lignane

Anhand des Chromatogramms in Abb. 15 wurden die in Tab. 10 nachstehenden Substanzen via GC-MS identifiziert. Bei dieser Methode erfolgte eine Säurehydrolyse der Lignane (siehe 3.5.3).

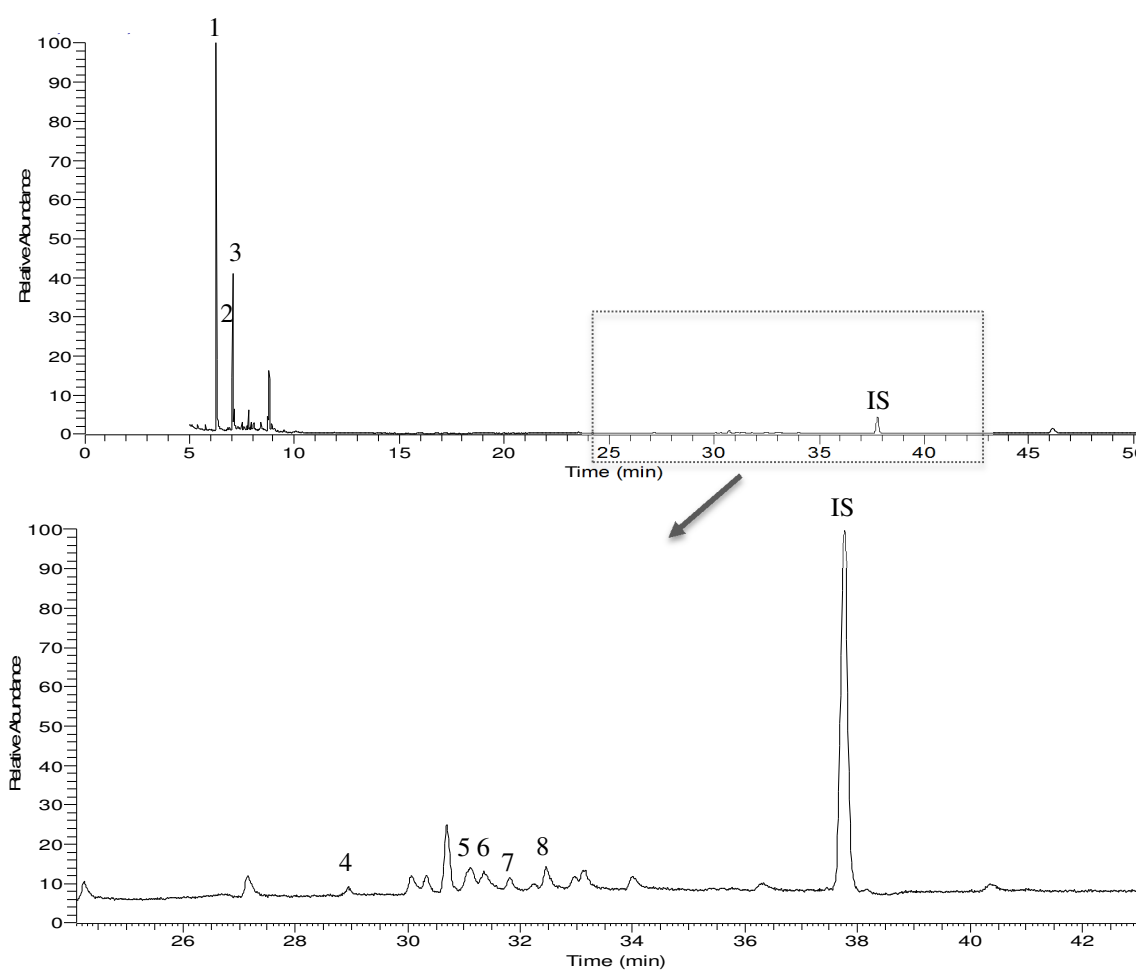


Abb. 15: Chromatogramm der Aceton-Wasser Extraktionsmethode. Untere Abbildung zeigt Chromatogramm vergrößert mit den Retentionszeiten 24 – 43 min.

Peaks: IS = Interner Standard Betulinol (520 ppm); 1, Tyrosol; 2, Hydroxytyrosol; 3, 4-Hydroxyphenylsigsäure; 4, 1-Monolinoleoyl-glycerol; 5, Pinoresinol; 6, Epi-Pinoresinol; 7, Hydroxypinoresinol; 8, Acetoxypinoresinol

Der erste Peak, *Tyrosol*, zweifach TMS-derivatisiert, konnte aufgrund der Verwendung eines Referenzstandards bestätigt werden. Zudem war der berechnete lineare Retentionsindex von 1578 nahe dem der NIST-Datenbank 2005 mit 1566 und ein vergleichbares Massenspektrum war vorzufinden.

Peak 2, *Hydroxytyrosol*, dreifach TMS-derivatisiert, konnte ebenso aufgrund eines Referenzstandards bestätigt werden.

Als dritter Peak konnte die *4-Hydroxyphenylessigsäure*, zweifach TMS-derivatisiert, detektiert werden. Die Konfirmation erfolgte durch ein vergleichbares Massenspektrum aus der NIST-Datenbank 2005 und dem berechneten linearen Retentionsindex (1789) sowie dem der Datenbank von 1994.

Tab. 10: TMS Derivate identifizierter Substanzen mittels GC-MS.

Peak	Name	Rt [min]	I ^T HP5	RI NIST05	Identifizierte Ionen [m/z]
1	Tyrosol	6,28	1578	1566	282*, 267, 249, 209, 193, 181, 179**, 148, 133, 118, 103, 73
2	Hydroxytyrosol	7,03	1778	n.v.	370*, 279, 267**, 193, 179, 147, 103, 73
3	4-Hydroxyphenylessigsäure	7,07	1789	1994	357, 296*, 252, 221, 199, 179, 147, 95, 73**
4	1-Monolinoleoylglycerol	28,95	3263	2796	500*, 485, 397, 368, 339, 257, 203, 147, 129, 73**
5	Pinoresinol	31,11	3338	n.v.	502*, 488, 281, 235, 209, 207**, 191, 147, 73
6	Epi-Pinoresinol	31,35	3346	n.v.	502*, 487, 281, 235, 223, 207**, 193, 179, 73
7	Hydroxypinoresinol	31,81	3362	n.v.	590*, 575, 502, 405, 366, 281, 224, 207, 73**
8	Acetoxypinoresinol	32,46	3386	n.v.	560*, 545, 276, 245, 207**, 73

Rt = Retentionsindex, I^T HP5= linearer Retentionsindex HP5-Säule, RI NIST05 = Retentionsindex aus Nistdatenbank 2005, n.v.= nicht verfügbar.

* = Molekülionenpeak (M+)

** = Basispeak

Peak 5 und 6 wiesen nahezu identische Massenspektren auf (Abb. 16), ersichtlich aus Abb. 16. Yamamoto [2004] detektierte eine Isomerform des *Pinoresinols*, die unmittelbar

nacheinander eluiert wurden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich hier auch um die Isomerform des *Pinoresinols* *Epi-Pinoresinol* handelt. *Pinoresinol* (Peak 5) [Owen et al., 2000b] und *Epi-Pinoresinol* (Peak 6) wurden aufgrund der Elutionsreihenfolge und dem Vergleich mit Referenzmassenspektren bestimmt und liegen in zweifach TMS-derivatisierter Form vor. Somit haben diese bei einer Molekülmasse von 358 einen Molekülionenpeak von 502.

Hydroxypinoresinol, Peak 7, in dreifach TMS-derivatisierter Form (siehe Abb. 16) konnte durch ein Referenzmassenspektren bestimmt werden [Owen et al., 2000b]. Der Molekülionenpeak war 590 und die Molekülmasse underivatisiert 374. Ebenso lag auch eine zweifach TMS-derivatisierte Form vor und demnach wäre der Molekülionenpeak 518, also 72 m/z weniger [Owen et al., 2000b]. Diese Form konnte allerdings im Chromatogramm nicht detektiert werden und tritt wahrscheinlich auch nur bei kurzer Derivatisierungsdauer auf.

Acetoxypinoresinol, Peak 8, konnte durch Vergleichsmassenspektren nachgewiesen werden [Owen et al., 2000b]. Es lag in zweifach TMS-derivatisierter Form vor, dadurch wurden 144 m/z zur Molekülmasse 416 addiert und ergaben einen Molekülionenpeak von 560.

Ergebnisse und Diskussion

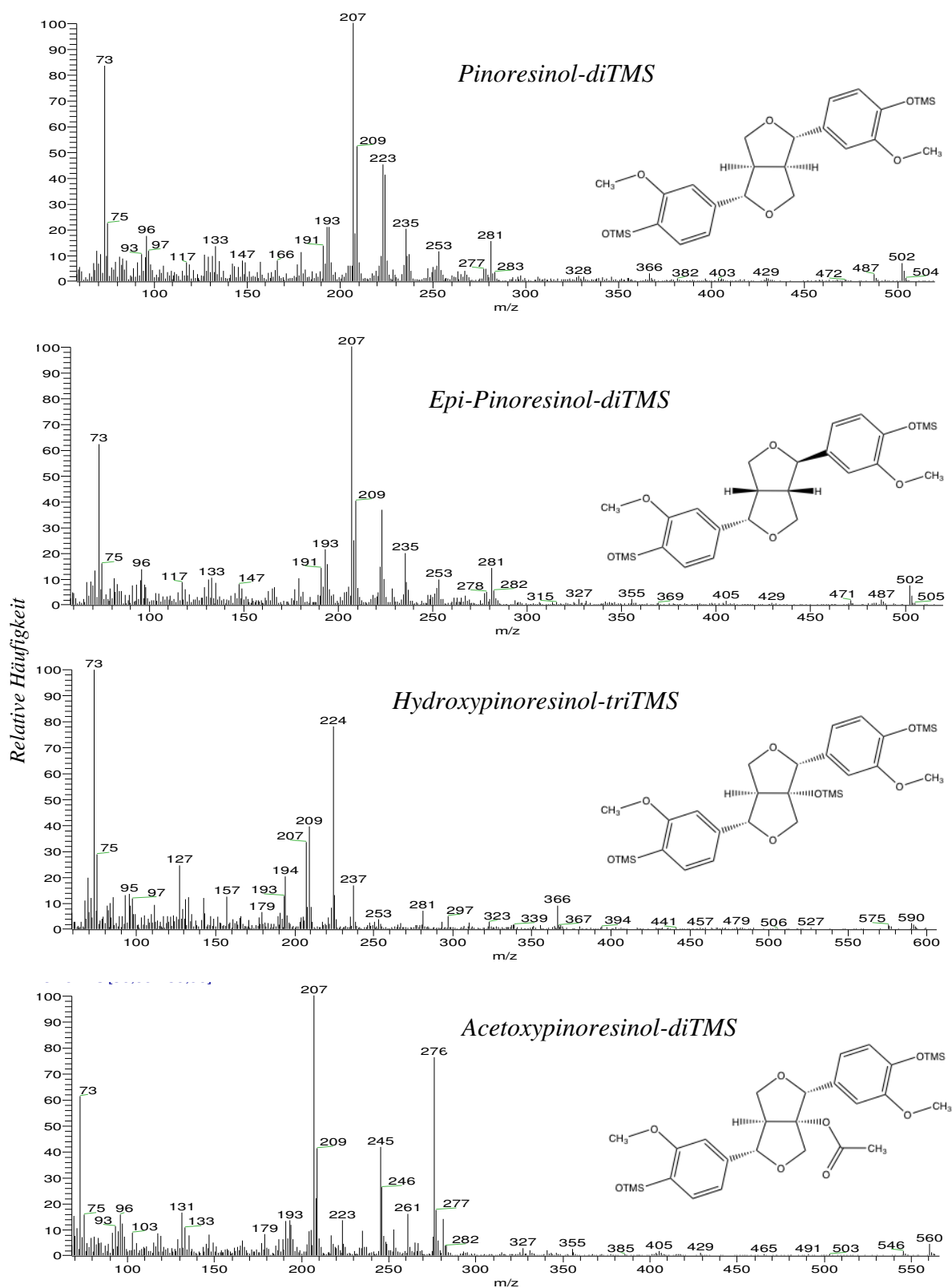


Abb. 16: Massenspektren der identifizierten Lignane mit Strukturformeln.

4.4.2 Quantifizierung der Lignane

Die Quantifizierung der Lignane erfolgte über die Berechnung der Peakfläche des internen Standards Betulinol. Die quantifizierten Mengen sind in Tab. 11 ersichtlich.

Tab. 11: Konzentration der Lignane in nativem Olivenöl extra durch Extraktion von Aceton-Wasser.

Dauer bei 60°C [d]	PV [meq O ₂ /kg]	AcO-Pi [ppm]	OH-Pi [ppm]	Epi-Pi [ppm]	Pi [ppm]	Σ [ppm]
0	12,5	0,18 (0,07)	0,16 (0,00)	0,13 (0,02)	0,50 (0,11)	0,96
4	16,5	0,92 (0,50)	0,15 (0,08)	0,85 (0,63)	0,65 (0,29)	2,57
8	20,6	0,16 (0,08)	0,09 (0,05)	0,32 (0,14)	0,76 (0,93)	1,32
12	26,1	0,27 (0,14)	0,14 (0,09)	0,24 (0,10)	0,38 (0,26)	1,03
16	30,7	0,37 (0,73)	0,15 (0,29)	0,27 (0,53)	0,46 (0,92)	1,24
20	34,3	0,26 (0,34)	0,09 (0,03)	0,21 (0,25)	0,31 (0,04)	0,88
24	37,0	0,67 (0,18)	0,17 (0,06)	0,39 (0,76)	0,91 (0,76)	2,14
28	39,3	0,59 (0,15)	0,16 (0,00)	0,29 (0,54)	0,83 (0,17)	1,87

Mittelwert aus Doppelbestimmung (Spannweite); AcO-Pi = Acetoxypinoresinol, OH-Pi = Hydroxy-pinoresinol, Epi-Pi = Epi-Pinoresinol, Pi = Pinoresinol, Σ = Summer der Lignane (AcO-Pi, OH-Pi, Epi-Pi, Pi)

Die Gehalte der Summe der Lignane lagen zwischen 0,96 ppm und 2,57 ppm. Hydroxypinoresinol schien konstant die geringsten Konzentrationen zu haben mit Werten zwischen 0,09 ppm und 0,17 ppm. Generell waren die Lignangehalte sehr niedrig im Vergleich zu anderen Analysen. Andere Studien konnten einen Pinoresinolgehalt von 2,43 bis 2,48 ppm in nativem Olivenöl extra detektieren und 0,04 ppm Lariciresinol [Milder et al., 2005]. Die Werte in dieser Arbeit waren weitaus geringer und dazu konnte auch keine Detektion von Lariciresinol stattfinden. Es wurden Pinoresinolwerte von 11,7 ppm bis 41,2 ppm und 1-Acetoxypinoresinolwerte von 2,7 ppm bis 66,9 ppm in nativem Olivenöl extra von 5 verschiedenen Olivenkultivare gefunden. 1-Acetoxypinoresinol unterlag dabei größeren Schwankungen. Allgemein konnten große Unterschiede der Lignangehalte aufgrund der Olivensorten festgestellt werden [Brenes et al., 2000].

Gründe für die geringen Gehalte an Lignanen im untersuchten Öl könnten auf deren Sorte zurückzuführen sein oder aber auch in der Methodik liegen. Denn durch das mehrmalige Entfetten mit Hexan könnte ein Teil der Aceton-Wasserphase in die Hexanphase übergegangen sein und demnach verworfen worden sein.

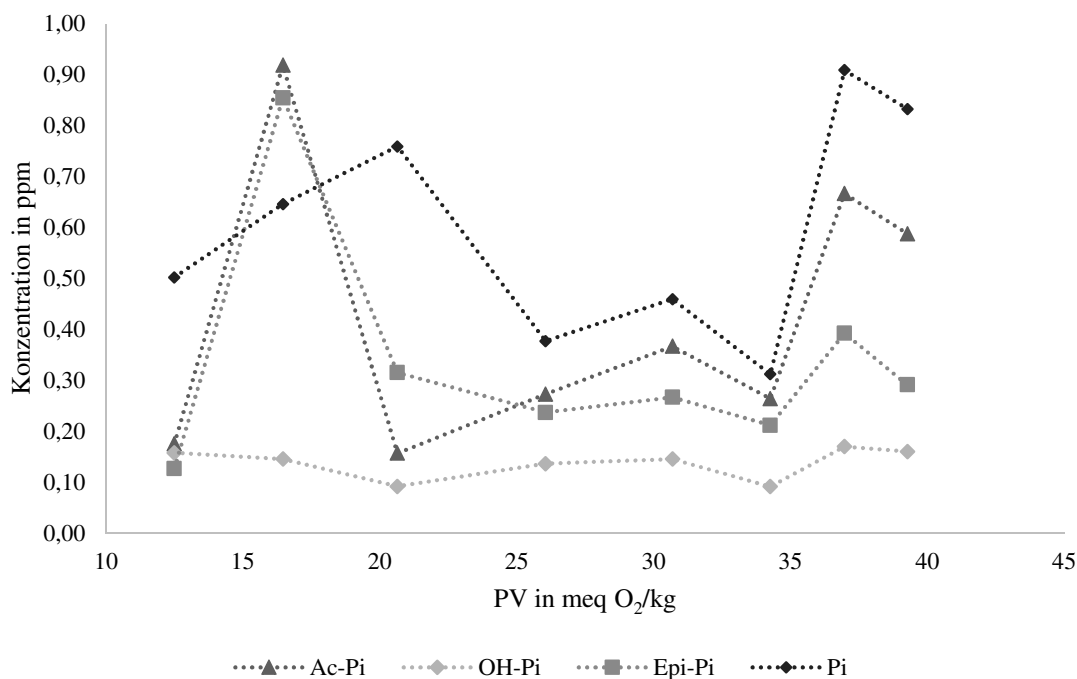


Abb. 17: Konzentrationen von 1-Acetoxypinoresinol, Hydroxypinoresinol, Epi-Pinoresinol und Pinoresinol mit zunehmendem Oxidationsgrad.

Die Konzentration der Lignane von 1-Acetoxypinoresinol, Hydroxypinoresinol, Epi-Pinoresinol und Pinoresinol zeigten mit zunehmendem Oxidationsgrad kein spezielles Muster (Abb. 17). Dies lässt auf einen geringen Einfluss der Lignane auf Oxidationsprozesse im Öl schließen. Brenes et al. [2001] fand keine signifikanten Veränderungen in den Gehalten von Pinoresinol und 1-Acetoxypinoresinol in einem Lagerversuch, bei 30°C unter Licht und Sauerstoffabschluss über 340 Tage. Diese Stabilität der Lignane während der Lagerung von Olivenöl über einen Zeitraum von 12 Monaten (Dunkel, gemäßigte Temperatur) konnte auch in einer anderen Analyse gezeigt werden [Morelló et al., 2004]. Dennoch konnte in Lignanen, welche mit Methanol aus Olivenöl extrahiert wurden, ein hohes antioxidatives Potential gezeigt werden [Owen et al., 2000c]. Allerdings lagen die Lignangehalte mit 41,53 ppm weitaus höher als in dieser Arbeit, mit höchstens 2,14 ppm in der Summe (Tab. 11). Demnach müssten weitere Untersuchungen mit Olivenölen, die

sortenbedingt hohe Lignangehalte aufweisen, gemacht werden, um deren antioxidatives Verhalten in der Olivenölmatrix genauer zu untersuchen.

4.5 Unverseifbare Fettnebenbestandteile

4.5.1 Identifizierung der unverseifbaren Fettnebenbestandteile

Die Identifizierung der unverseifbaren Fettnebenbestandteile erfolgte durch nachstehendes Chromatogramm über GC-MS-Analyse (Abb. 18). Eine vollständige Auflistung der identifizierten Substanzen ist in Tab. 12 ersichtlich, sowie die zugehörigen Massenspektren in Abb. 19.

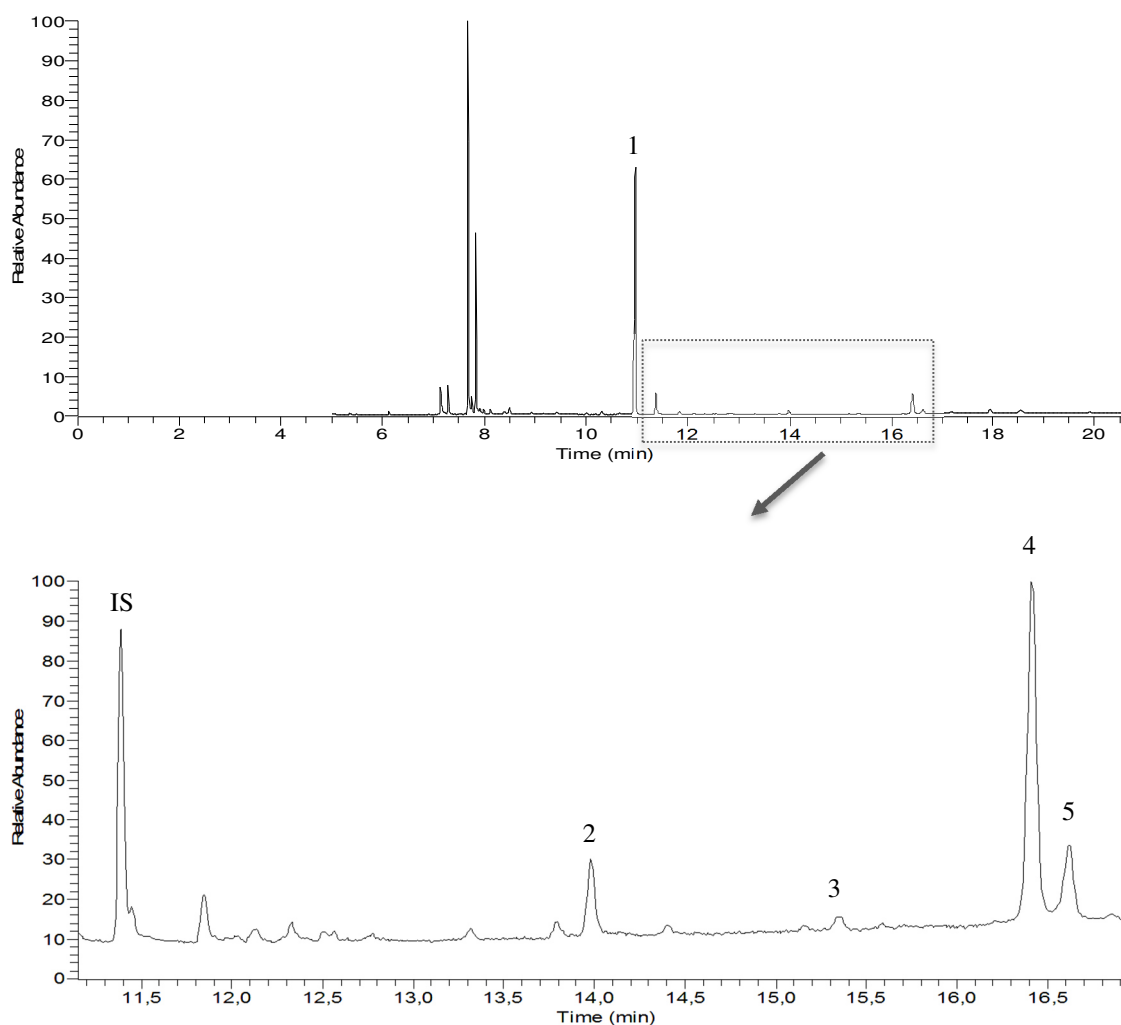


Abb. 18: Ausschnitt des GC-MS Chromatogramms der unverseifbaren Fettnebenbestandteile von nativem Olivenöl extra. Untere Abbildung zeigt das Chromatogramm vergrößert mit den Retentionszeiten 11 – 17 min.

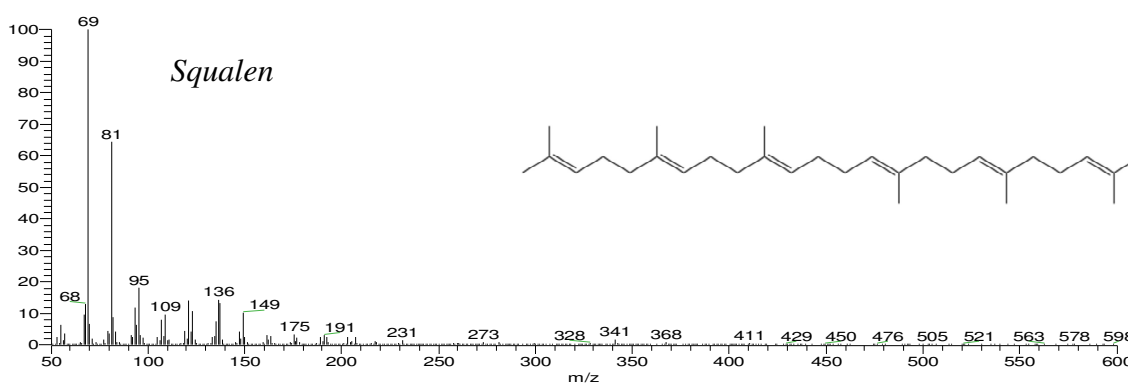
Peaks: IS= Interner Standard α -Cholestane (200 ppm); 1, Squalen; 2, α -Tocopherol; 3, Campesterol; 4, β -Sitosterol; 5, Δ^5 -Avenasterol.

Der höchste Peak des *Squalen*, konnte über die Nistdatenbank konfirmiert werden.

Das α -*Tocopherol* einfach TMS-derivatisiert wurde über die Nistdatenbank 2005 identifiziert.

Campesterol, einfach TMS derivatisiert, wies einen Molekülionenpeak von 472 m/z auf und konnte durch ein Referenzspektrum [Beveridge et al., 2002] bestätigt werden. Ebenso konnte Δ^5 -*Avenasterol* über ein Referenzspektrum [Beveridge et al., 2002] identifiziert werden.

Die Identität des β -*Sitosterols*, einfach TMS-derivatisiert konnte durch einen vorher injizierten Referenzstandard konfirmiert werden.



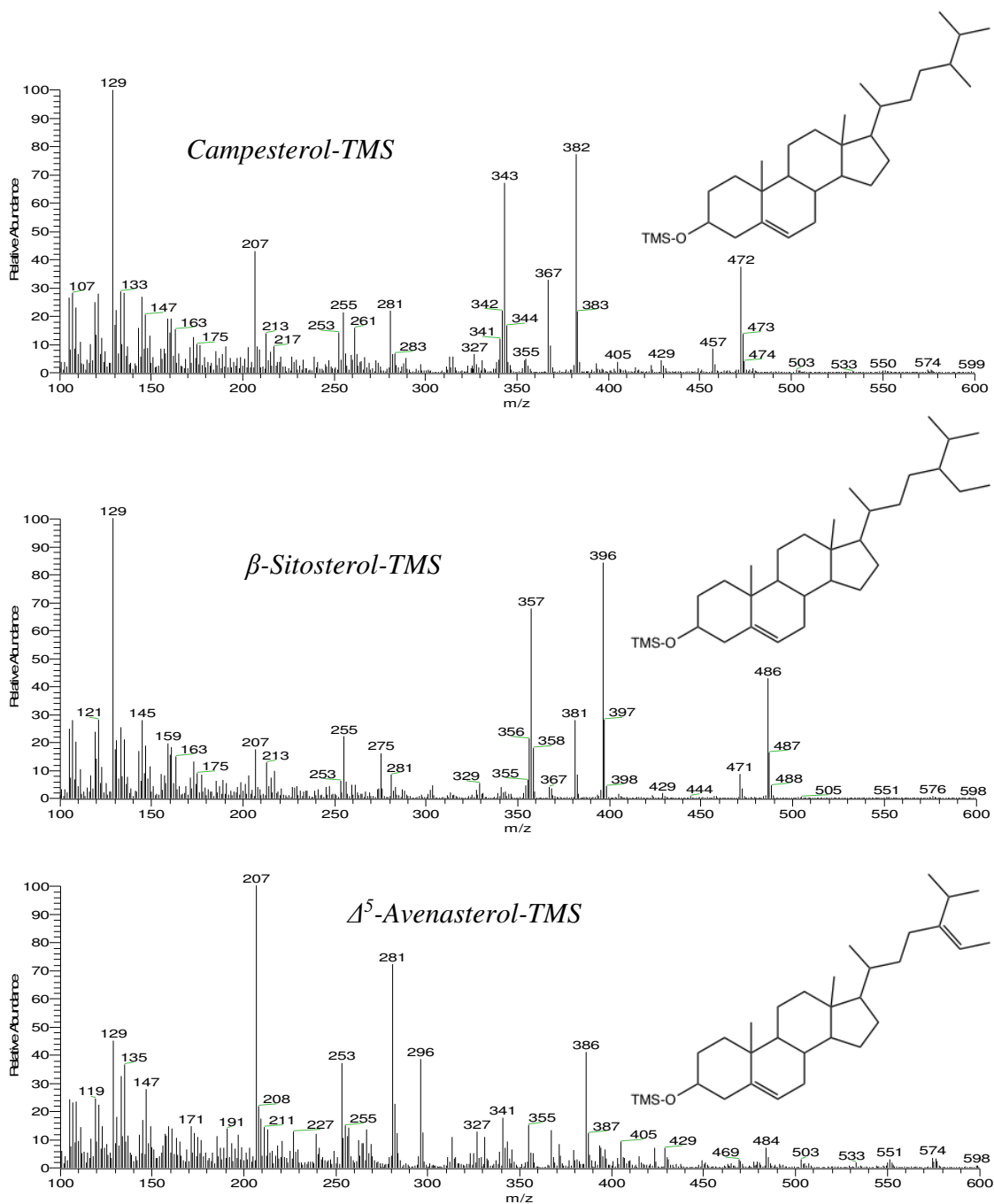


Abb. 19: Massenspektren und Strukturformeln von unverseifbaren Fettnebenbestandteilen.

Tab. 12: TMS-Derivate der unverseifbaren Fettnebenbestandteile.

Peak	Name	Rt [min]	I ^T HP5	RI NIST05	Identifizierte Ionen [m/z]
1	Squalen	10,97	2842	2757	410*, 367, 325, 297, 271, 243, 215, 192, 69**
2	α -Tocopherol	13,98	3285	3226	502*, 277, 237, 73**
3	Campesterol	15,36	3369	3230	472*, 457, 382, 367, 343, 213, 207, 129**, 73
4	β -Sitosterol	16,40	3387	2789	486*, 396, 381, 357, 329, 255, 213, 129**, 73
5	Δ^5 -Avenasterol	16,62	3430	n.v.	484*, 469, 394, 386, 379, 355, 207**, 129, 83, 73, 55

Rt = Retentionsindex, IT = linearer Retentionsindex, HP5 = Säule, RI NIST05 = Retentionsindex aus Nist-datenbank 2005, n.v.= nicht verfügbar.

* = Molekülionenpeak (M+)

** = Basispeak

4.5.2 Quantifizierung der unverseifbaren Fettnebenbestandteile

Die Quantifizierung der unverseifbaren Fettnebenbestandteile erfolgte über Berechnung der Peakfläche des internen Standards α -Cholestane.

Tab. 13: Konzentrationen der unverseifbaren Fettnebenbestandteile.

Dauer bei 60°C [d]	PV [meq O ₂ /kg]	Squalen [ppm]	Campesterol [ppm]	β -Sitosterol [ppm]	Δ^5 -Avenasterol [ppm]
0	12,5	4581,87 \pm 101,24	49,08 \pm 2,88	673,08 \pm 35,05	163,55 \pm 8,36
4	16,5	4206,60 \pm 84,19	37,35 \pm 1,80	535,06 \pm 63,44	132,53 \pm 20,29
8	20,6	4169,39 \pm 126,73	32,13 \pm 2,24	550,66 \pm 25,02	138,94 \pm 5,79
12	26,1	4054,38 \pm 307,99	31,40 \pm 3,36	535,13 \pm 20,27	136,95 \pm 5,98
16	30,7	3941,38 \pm 297,10	45,26 \pm 16,50	614,45 \pm 36,98	147,87 \pm 14,83
20	34,3	4089,65 \pm 252,31	36,52 \pm 3,33	623,86 \pm 72,48	149,79 \pm 7,47
24	37,0	4209,10 \pm 325,82	42,63 \pm 6,69	630,47 \pm 67,52	170,70 \pm 6,83
28	39,3	4237,43 \pm 87,14	44,43 \pm 4,57	688,79 \pm 83,11	181,02 \pm 3,38

Mittelwert aus Doppelbestimmung und Dreifachinjektion \pm Standardabweichung

Die Gehalte der unverseifbaren Fettnebenbestandteile blieben weitestgehend stabil während der thermischen Behandlung (siehe Tab. 13). Demnach bestand kein Zusammenhang zwischen den Gehalten an unverseifbaren Fettnebenbestandteilen und deren Oxidationsgrad.

Die im nativen Olivenöl extra quantifizierten Konzentrationen des Squalen lagen zwischen 3941,38 \pm 297,10 ppm und 4581,87 \pm 101,24 ppm. Der Gehalt von Squalen ist laut Manzi et al. [1998] abhängig von der Olivensorte. Das Squalen macht den größten Anteil der unverseifbaren Fraktion aus und dennoch scheinen auch andere Studien keine signifikanten Veränderungen während der Lagerung festzustellen [Manzi et al., 1998; Rastrelli et al., 2002], ausgenommen einer signifikanten Abnahme nach 6 und 8 Monaten der Lagerung [Rastrelli et al., 2002].

Psomiadou und Tsimidou [1999] zeigten lediglich eine protektive, konzentrationsabhängige oxidationsstabilisierende Wirkung des Squalen in aufgereinigtem Olivenöl und einer Lagerungstemperatur von 40°C und 62°C. Höhere Temperaturen von 100°C und 120°C zeigten keinen Effekt des Squalen. Demnach scheint die protektive Wirkung des Squalen

in aufgereinigtem Olivenöl temperaturabhängig zu sein. Dahingegen konnte in einer Matrix in der α -Tocopherol und Kaffeesäure vorkamen nur in den anfänglichen Autoxidationsstadien, bei geringem Anfall an Hydroperoxiden eine protektive Wirkung des Squalens festgestellt werden und welches auch keine kettendeterminierenden Eigenschaften zeigte [Psomiadou und Tsimidou, 1999]. Manzi et al. [1998] fand einen höheren prozentualen Verlust des Squalens während der Lagerung, als den des α -Tocopherols. α -Tocopherol wirkt als Kettenabbruchs-Antioxidans indem es freie Peroxylradikale abfängt und dadurch die Kettenpropagation unterbindet, wobei es während der Reaktion selbst eine Modifikation eingeht. Das α -Tocopherol fängt schneller Radikale ab als das Squalen. Dadurch kann das Squalen möglicherweise das α -Tocopheroxylradikal reduzieren und somit α -Tocopherol regenerieren [Kohno et al., 1995].

Die antioxidative Wirkung des Squalen scheint in nativem Olivenöl begrenzt zu sein und wird anscheinend durch andere phenolische Inhaltsstoffe vermindert.

Den höchsten Gehalt der Phytosterole wies das β -Sitosterol auf mit Konzentrationen zwischen $535,06 \pm 63,44$ ppm und $688,79 \pm 83,11$ ppm. Die Sterole Δ^5 -Avenasterol (min: $132,53 \pm 20,29$; max: $181,02 \pm 3,38$) und Campesterol (min: $31,40 \pm 3,36$; max: $49,08 \pm 2,88$) zeigten geringere Gehalte.

Die Konzentrationen von Campesterol, β -Sitosterol und Δ^5 -Avenasterol blieben während der Autoxidation stabil (Abb. 20). Auch Rastrelli [2002] konnte keine Änderung in den Gehalten der Sterole in nativem Olivenöl während einer Lagerung von 12 Monaten bei Raumtemperatur feststellen.

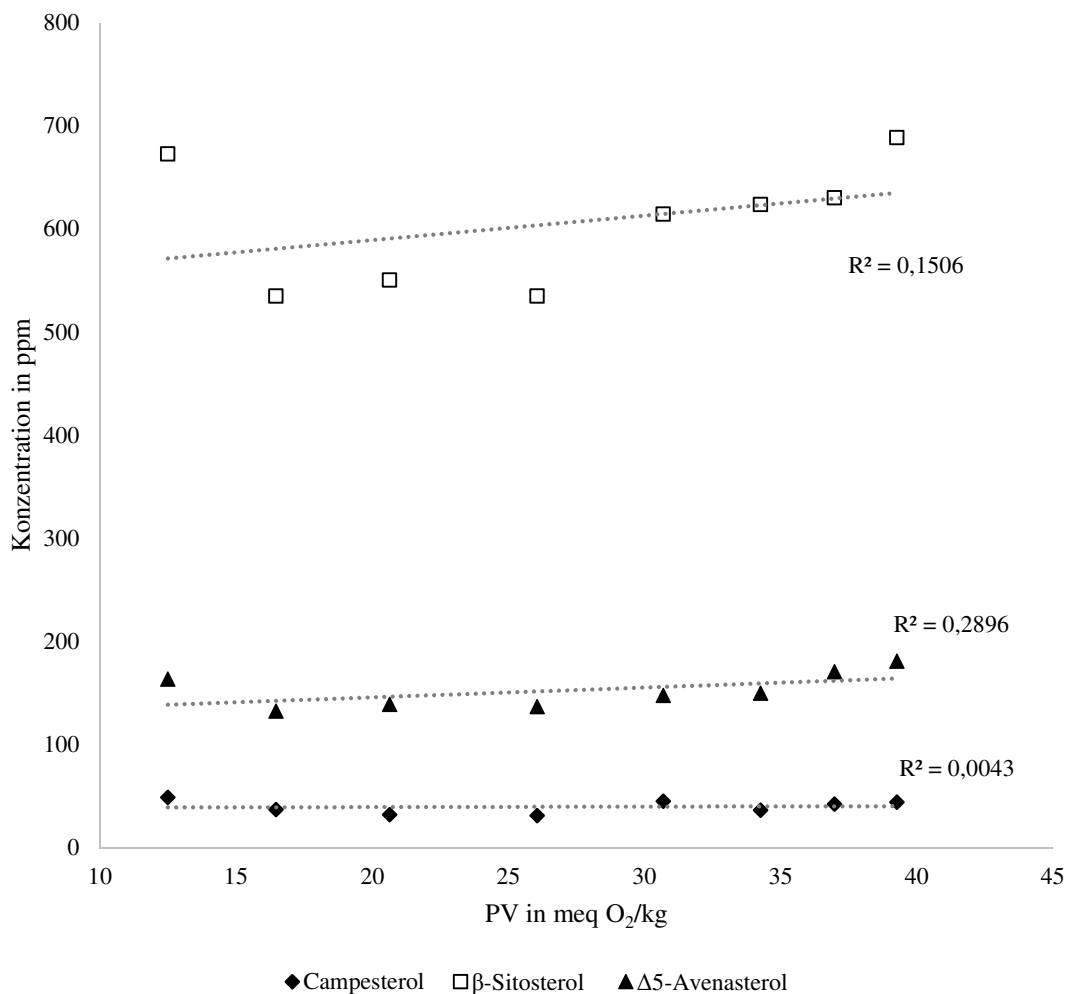


Abb. 20: Konzentrationen der analysierten Phytosterole mit zunehmendem Oxidationsgrad. Mittelwert aus Doppelbestimmung und Dreifachinjektion mit Anzeige der Standardabweichung.

Bei niedrigen Temperaturen zeigten Phytosterole keinen Effekt gegenüber der Oxidationsstabilität von Olivenöl [Velasco und Dobarganes, 2002]. Jedoch konnte eine Aktivität bei hohen Temperaturen (180°C) festgestellt werden. Dabei zeigten Δ⁵-Avenasterol und verwandte Sterole wie Δ⁷-Avenasterol und Citrostadienol eine Wirkung indem die Sterole schnell mit den unbehinderten C-Atomen der Allylgruppen der Lipide reagierten und dadurch relativ stabile allylische tertiäre freie Radikale entstanden, welche sehr langsam weiterreagierten [Gordon und Magos, 1983]. Diese Wirkung konnte allerdings nicht bei Stigmasterol, Campesterol und β-Sitosterol gefunden werden. Dies beruht womöglich auf dem strukturellen Unterschied der Seitenkette. Citrostadienol, Δ⁵-Avenasterol und Δ⁷-Avenasterol enthalten eine Ethylidengruppe in der Seitenkette [Boskou und Morton,

1975], von der bei hohen Temperaturen Peroxylradikale die Fähigkeit besitzen ein H-Atom zu abstrahieren [Belitz et al., 2008]. Diese Struktur ist bedeutend für deren antioxidative Wirkung [Sims et al., 1972]. Letztendlich konnte in dieser Arbeit kein Effekt auf die Stabilität von Olivenöl ausgehend von den Sterolen oder dem Squalen nachgewiesen werden, da es zu keinen auffälligen Veränderungen während der Lagerung von Olivenöl kam.

5 Schlussbetrachtung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit verschiedene Vorgänge und deren Auswirkungen von phenolischen Minorkomponenten von nativem Olivenöl extra während einer thermischen Belastung aufgezeigt werden konnten.

Dabei zeigten die identifizierten Lignane Acetoxypinoresinol, Hydroxypinoresinol, Epi-Pinoresinol und Pinoresinol die in nur sehr geringen Konzentrationen vorlagen kein antioxidatives Verhalten gegenüber der Stabilität des Olivenöls. Weitere Untersuchungen mit gezielter Sortenwahl, die sich durch hohe Lignangehalte kennzeichnen wären für eine tiefer greifende Analyse sinnvoll.

Auch die unverseifbaren Fettnebenbestandteile, Squalen und die Phytosterole β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol und Campesterol zeigten keine auffälligen Konzentrationsänderungen während der thermischen Belastung. Dennoch scheint ein Einfluss des Squalens vorzuliegen, indem dieses womöglich eine wichtige Rolle in der Regeneration des α -Tocopherols spielt.

Die phenolischen Inhaltsstoffe Tyrosol und Hydroxytyrosol, sowie das α -Tocopherol verzeichneten mit zunehmendem Oxidationsgrad eine Abnahme in deren Konzentration. Zu Beginn der Oxidation konnte eine geringere Verlustrate des α -Tocopherols festgestellt werden die später mit zunehmender Peroxidzahl (ab 20 meq O_2 /kg) rapide zunahm. Zunächst stabilisieren die polaren Phenole das Olivenöl aufgrund ihrer höheren antioxidativen Wirksamkeit im Olivenöl, wobei das α -Tocopherol an Bedeutung gewinnt sobald eine kritische Konzentration an primären Autoxidationsprodukten erreicht ist.

In der Arbeit konnte eine kontinuierliche Abnahme des Tyrosolgehaltes festgestellt werden wohingegen der Gehalt des Hydroxytyrosols fluktuierte, indem dieser zunächst abnahm, gefolgt von einem Anstieg und einem wiederholten Abfall. Dabei wurde zu Beginn das Hydroxytyrosol für die Stabilisierung des Öles verbraucht. Der Anstieg ist womöglich durch enzymatische Abbauprozesse sowie durch die Hydrolyse von Oleuropein bedingt.

Ein besseres Verständnis der verschiedenen Wirkungen der phenolischen Inhaltsstoffe in der Olivenölmatrix und deren synergistischen Wirkungen und Interaktionen untereinander hinsichtlich oxidativer Prozesse könnte schließlich dazu führen bessere Aussagen über die Qualität und Lagerbeständigkeit von Olivenöl treffen zu können.

Da womöglich das Hydroxytyrosol eine hohe antioxidative Wirksamkeit im Olivenöl aufweist und dieser Inhaltsstoff durch Hydrolyse von Oleuropein entsteht, könnten durch weitere Untersuchungen dieser Secoiridoide (komplexere Oleuropeinderivate) während oxidativer Prozesse genauere Kenntnisse über deren Verhalten abgeleitet werden. Zudem ist der Gehalt der Secoiridoide auch stark abhängig von Reifegrad, Sorte und Anbaubedingungen der Oliven. Dadurch könnten durch gewählte Reifegrade, gezielte Sortenwahl, sowie genaue Abpassung der Erntezeitpunkte die Haltbarkeit von Olivenöl beeinflusst werden und dadurch eine höhere Qualität erreicht werden.

6 Zusammenfassung

Die traditionelle mediterrane Ernährung zeigt in epidemiologischen Studien eine protektive Wirkung gegenüber Krebs oder koronaren Herzerkrankungen. In dieser Ernährungsweise hat Olivenöl einen besonders hohen Stellenwert und zählt zugleich zu dem bedeutendsten Fettlieferanten. Diese Wirkungen sind hauptsächlich auf die phenolischen Inhaltsstoffe zurückzuführen, aber auch auf die Fettsäuren-Zusammensetzung. Da Olivenöl im Gegensatz zu anderen pflanzlichen Ölen eine hohe Stabilität gegenüber Oxidation aufweist, war ein Ziel dieser Arbeit die Konzentrationsänderung verschiedener Minorkomponenten von nativem Olivenöl extra nach einer thermischen Belastung (28 Tage bei 60°C), in einem offenen Gefäß unter Lichtausschluss, zu verschiedenen Messzeitpunkten zu quantifizieren. Dies setzte eine vorherige Identifizierung dieser Komponenten voraus.

Der Oxidationsgrad des Öles wurde über die Peroxidzahl bestimmt. Diese verzeichnete einen linearen Anstieg von 12,30 meq O₂/kg (Tag 0) bis zu einem Wert von 39,49 meq O₂/kg nach 28 Tagen. Die Messung lipophiler Tocopherole erfolgte anhand von HPLC-Analytik. Detektiert wurde dabei α -Tocopherol mit einem Anfangsgehalt von 219,25 ppm und δ -Tocopherol, welches allerdings nur in Spuren gefunden werden konnte. Es konnte ein Zusammenhang in der Degradation des α -Tocopherols mit zunehmendem Oxidationsgrad festgestellt werden. Zu Beginn war die Verlustrate geringer, die aber ab einer Peroxidzahl von 20 meq O₂/kg einen rapiden Anstieg verzeichnete bis hin zu einem Gesamtverlust von 64 % (78,55 ppm). Dieser rapide Anstieg kann auf den erhöhten Anfall an primären Autoxidationsprodukten zurückgeführt werden, da in den anfänglichen Stadien der Autoxidation polare phenolische Inhaltsstoffe wirksamer sind.

Sowohl Tyrosol als auch Hydroxytyrosol, die anhand einer GC-MS-Analytik durch Methanol-Wasser-Extraktion identifiziert wurden, verzeichneten eine Abnahme von 27 % (Tyrosol) und 69 % (Hydroxytyrosol) nach 28 Tagen der thermischen Belastung des Olivenöls. Hierbei konnte eine kontinuierliche Abnahme des Tyrosolgehaltes festgestellt werden, wohingegen der Gehalt des Hydroxytyrosol fluktuierte, indem dieser zunächst abnahm, gefolgt von einem Anstieg und einem wiederholten Abfall. Zunächst wird das Hydroxytyrosol während der thermischen Oxidation für die Stabilisierung des Öles ver-

braucht. Auch die anfängliche α -Tocopherol-Verlustrate war zu Beginn geringer. Der Anstieg des Hydroxytyrosols ist dadurch zu erklären, dass sich Oleuropein durch Hydrolyse zu Hydroxytyrosol umwandelt.

Die Konzentration der Lignane Acetoxypinoresinol, Hydroxypinoresinol, Epi-Pinoresinol und Pinoresinol, die durch Aceton-Wasser-Extraktion mittels GC-MS identifiziert wurden wiesen in der Summe zwischen 0,96 ppm und 2,57 ppm auf. Hydroxypinoresinol zeigte dabei die geringsten Werte. In Bezug auf die Oxidation konnte kein spezifisches Verhalten abgeleitet werden. Die Konzentrationen der Lignane blieben weitestgehend stabil. Ebenso zeigten auch die analysierten Phytosterole β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol und Campesterol sowie das Squalen keine Konzentrationsänderungen mit zunehmendem Oxidationsgrad auf. Das native Olivenöl extra enthielt Squalengehalte zwischen 3941,38 ppm und 4581,87 ppm. Die höchsten Gehalte der Phytosterole hatte das β -Sitosterol gefolgt vom Δ^5 -Avenasterol und Campesterol. Dennoch scheint das Squalen eine wichtige Rolle in der Regeneration des α -Tocopherols zu spielen und auch die Avenasterole tragen bei höheren Temperaturen (180°C) zur Stabilität bei.

Bessere Kenntnisse der verschiedenen Wirkungen von Minorkomponenten und deren synergistischen Wirkungen und Interaktionen untereinander in Bezug auf ihr Oxidationsverhalten könnten schließlich zu einer höheren Qualität und Haltbarkeit von Olivenöl führen.

7 Abstract

Epidemiological studies show protective effects of the traditional Mediterranean diet towards cancer and coronary heart diseases. Olive oil plays an important key factor in this diet and accounts likewise as a main fat source. These protective effects are mainly associated with phenolic compounds besides the composition of fatty acids. In contrast to other plant oils olive oil exhibits a high stability against oxidation. For this reason the aim of this work was to quantify the concentration of several phenolic minor components of native olive oil extra after thermal exposure (28 days at 60°C) in an open vessel under exclusion of UV-light at various measuring points. This required a previous identification of the components.

The degree of oxidation was measured via the peroxide value, which displayed a linear increase from 12.30 meq O₂/kg (day 0) to a value of 39.49 meq O₂/kg after 28 days. The measurement of lipophilic phenolics like tocopherols was conducted via HPLC-measurements; thereby the identification of α -tocopherol with an initial value of 219.25 ppm and δ -tocopherol, which comprised only in traces, was conducted. No association of the degradation of α -Tocopherol with increasing degree of oxidation could be determined. Initially the loss rate was lower, but from a peroxide value of 20 meq O₂/kg on a rapid increase was recorded until a total loss of 64 % (78.55 ppm). This rapid increase may be attributed to the higher loss of primary autoxidation products, due to the fact that polar phenolic compounds are more effective in the initial autoxidation phases.

Both tyrosol and hydroxytyrosol, which were identified by GC-MS via methanol-water-extraction, showed a decrease of 27 % (tyrosol) and 69 % (hydroxytyrosol) after 28 days of thermal exposure of the olive oil. A continuous decrease of tyrosol was detected whereas the content of hydroxytyrosol fluctuated, after initial decrease it increased and finally ended in a repetitive loss. In the beginning the hydroxytyrosol is consumed during the thermal oxidation for the stabilization of the oil. The initial α -tocopherol loss rate is lower at the beginning as well. The increase of Hydroxytyrosol, which is structurally derived from oleuropein, is produced through enzymatic degradation and hydrolysis of oleuropein.

The concentration of the lignans acetoxypinoresinol, hydroxypinoresinol, epi-pinoresinol and pinoresinol, which have been identified via GC-MS and acetone-water-extraction,

showed in total values between 0.96 ppm and 2.57 ppm, with the lowest values for hydroxy-pinoinositol. Referring to oxidation, no specific behaviour could be determined. The concentrations of the lignans remained widely stable. Likewise, the analyzed phytosterols β -sitosterol, campesterol and Δ^5 -avenasterol and the squalene showed no changes in their concentration with increasing degree of oxidation. The extra virgin olive oil extra contained squalene values between 3941.38 ppm and 4581.87 ppm. The highest levels of phytosterols exhibited the β -sitosterol followed by Δ^5 -avenasterol and campesterol. Nevertheless, squalene appears to play an important role in the regeneration of the α -tocopherol and Δ^5 -avenasterol seems to contribute to a higher stability of the oil at higher temperatures (180°C).

Further knowledge and understanding of the various effects of minor components and their synergistic effects and interactions with each other regarding their oxidative behaviour could eventually lead to a higher quality and durability of olive oil.

Literaturverzeichnis

- Amiot M-J, Fleuriet A, Macheix J-J. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry* 1989;28(1):67-9.
- Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1986;34(5):823-6.
- Angerosa F, d'Alessandro N, Konstantinou P, Di Giacinto L. GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995;43(7):1802-7.
- Aparicio R, Roda L, Albi MA, Gutiérrez F. Effect of Various Compounds on Virgin Olive Oil Stability Measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999;47(10):4150-5.
- Arslan D, Karabekir Y, Schreiner M. Variations of phenolic compounds, fatty acids and some qualitative characteristics of Sariulak olive oil as induced by growing area. *Food Research International* 2013;54(2):1897-906.
- Arts J, Kuiper GG, Janssen JM, Gustafsson JA, Löwik CW, Pols HA, van Leeuwen JP. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology* 1997;138(11):5067-70.
- Baldioli M, Servili M, Perretti G, Montedoro GF. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 1996;73(11):1589-93.
- Bartolí R, Fernández-Bañares F, Navarro E, Castellà E, Mañé J, Alvarez M, Pastor C, Cabré E, Gassull MA. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: Modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E2 synthesis. *Gut* 2000;46(2):191-9.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. Vitamine. In *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6. Auflage Springer. 2008: 412-431.
- Beveridge THJ, Li TSC, Drover JCG. Phytosterol Content in American Ginseng Seed Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50(4):744-50.
- Bianco A, Coccioli F, Guiso M, Marra C. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chemistry* 2002;77(4):405-11.
- Blekas G, Tsimidou M, Boskou D. Contribution of α -tocopherol to olive oil stability. *Food Chemistry* 1995;52(3):289-94.
- Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* 2007;190(1):181-6.

- Bonanome A, Pagnan A, Caruso D, Toia A, Xamin A, Fedeli E, Berra B, Zamburlini A, Ursini F, Galli G. Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000;10(3):111-20.
- Bonzanini F, Bruni R, Palla G, Serlataite N, Caligiani A. Identification and distribution of lignans in *Punica granatum* L. fruit endocarp, pulp, seeds, wood knots and commercial juices by GC-MS. *Food Chemistry* 2009;117(4):745-9.
- Boskou D, Morton ID. Changes in the sterol composition of olive oil on heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1975;26(8):1149-53.
- Boskou D, Tsimidou M, Blekas G. Olive Oil composition. In *Olive Oil Chemistry and Technology*, Boskou D., 2006a, American Oil Chemists' Society, 2. Auflage: 41-72.
- Boskou D, Tsimidou M, Blekas G. Polar phenolic compounds. In *Olive Oil Chemistry and Technology*, Boskou D., 2006b, American Oil Chemists' Society, 2. Auflage: 73-92.
- Boskou D. Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit. In *Olive Oil Chemistry and Technology*, Boskou D., 2006, American Oil Chemists' Society, 2. Auflage: 13-20.
- Brenes M, de Castro A. Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1998;77(3):353-8.
- Brenes M, García A, García P, Garrido A. Acid Hydrolysis of Secoiridoid Aglycons during Storage of Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001;49(11):5609-14.
- Brenes M, Hidalgo F, García A, Rios J, García P, Zamora R, Garrido A. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2000;77(7):715-20.
- Caruso D, Visioli F, Patelli R, Galli C, Galli G. Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism* 2001;50(12):1426-8.
- Chimi H, Cillard J, Cillard P, Rahmani M. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1991;68(5):307-12.
- Cinquanta L, Esti M, Di Matteo M. Oxidative stability of virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2001;78(12):1197-202.
- Cinquanta L, Esti M, Notte E. Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1997;74(10):1259-64.
- Corona G, Tzounis X, Assunta Dessì M, Deiana M, Debnam ES, Visioli F, Spencer JPE. The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: Implications of gastric

- and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radical Research* 2006;40(6):647-58.
- DGF F-II 4a (00). Bestimmung der freien Tocopherole und Tocotrienole in Ölen per HPLC mit Fluoreszenzdetektor. In *Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen*. 2000
- EG/2007/1234. Verordnung über eine gemeinsame Organisation der Agrarmärkte und mit Sondervorschriften für bestimmte landwirtschaftliche Erzeugnisse (Verordnung über die einheitliche GMO). Anhang XVI, Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:299:0001:0149:DE:PDF>, (Stand: 25.06.2015).
- EU/2013/1308. Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:347:0671:0854:de:PDF>, (Stand: 06.06.2015).
- EWG/91/2568. Verordnung über die Merkmale von Olivenölen und Oliventresterölen sowie die Verfahren zu ihrer Bestimmung, Internet: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/HTML/?uri=CELEX:31991R2568&from=en>, (Stand: 06.06.2015).
- Fiebig HJ, Godelmann R. Bestimmung der Peroxidzahl (Methode nach Wheeler) - Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen: Analyse von Fetten XXXVII. *Lipid / Fett* 1997;99(5):194-6.
- Fito M, Cladellas M, de la Torre R, Marti J, Munoz D, Schroder H, Alcantara M, Pujadas-Bastardes M, Marrugat J, Lopez-Sabater MC, et al. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 2007;62(4):570-4.
- Gordon MH, Magos P. The effect of sterols on the oxidation of edible oils. *Food Chemistry* 1983;10(2):141-7.
- 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* 1990;67(10):626-34.
- Guiso M, Marra C, Cavarischia C. Isochromans from 2-(3',4'-dihydroxy)phenylethanol. *Tetrahedron Letters* 2001;42(37):6531-4.
- Iesce MR, Cermola F, Temussi F. Photooxygenation of Heterocycles. *Current Organic Chemistry* 2005;9(2):109-39.
- IOC COI/T.15, International Olive Council, Trade standard applying to olive oils. COI/T.15/NC No 3/Rev. 8, 2015.
- IUPAC 2.501, Pacquot C, Hautfenne A. *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. Blackwell Scientific: Oxford, 1987: 199-200.

- Joyner NT, McIntyre JE. The oven test as an index of keeping quality. *Oil Soap* 1938;15(7):184-6.
- Kalogeropoulos N, Tsimidou M. Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils. *Antioxidants* 2014;3(2):387-413.
- Kamal-Eldin A, Appelqvist L-Å. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 1996;31(7):671-701.
- Kamal-Eldin A. Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2006;108(12):1051-61.
- Keys A. Epidemiological studies related to Coronary Heart Disease: Characteristics of men aged 40-59 in seven countries*. *Acta Medica Scandinavica* 1966;180:4-5.
- Kohno Y, Egawa Y, Itoh S, Nagaoka S-i, Takahashi M, Mukai K. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1995;1256(1):52-6.
- Koidis A, Boskou D. The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2006;108(4):323-8.
- Laguerre M, Bayrasy C, Panya A, Weiss J, McClements DJ, Lecomte J, Decker EA, Villeneuve P. What Makes Good Antioxidants in Lipid-Based Systems? The Next Theories Beyond the Polar Paradox. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2013;55(2):183-201.
- Lamensdorf I, Eisenhofer G, Harvey-White J, Hayakawa Y, Kirk K, Kopin IJ. Metabolic stress in PC12 cells induces the formation of the endogenous dopaminergic neurotoxin, 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde. *J Neurosci Res* 2000;60(4):552-8.
- Leger CL, Carbonneau MA, Michel F, Mas E, Monnier L, Cristol JP, Descomps B. A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes. *Eur J Clin Nutr* 2005;59(5):727-30.
- León-Camacho M, Morales MT, Aparicio R. Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Traceability Issues. In *Handbook of Olive Oil*; Aparicio, R. and Harwood, J., Eds.; Springer Science: New York, 2013: 164-213.
- Manna C, Galletti P, Maisto G, Cucciolla V, D'Angelo S, Zappia V. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters* 2000;470(3):341-4.
- Manzi P, Panfili G, Esti M, Pizzoferrato L. Natural antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from different cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1998;77(1):115-20.

- Milder IEJ, Arts ICW, Putte Bvd, Venema DP, Hollman PCH. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition* 2005;93(03):393-402.
- Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semi-quantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992;40(9):1571-6.
- Morelló J-R, Motilva Ma-J, Tovar Ma-J, Romero Ma-P. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry* 2004;85(3):357-64.
- Nissiotis M, Tasioula-Margari M. Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Food Chemistry* 2002;77(3):371-6.
- NIST. Gas Chromatographic Retention Data, Internet: <http://webbook.nist.gov/chemistry/gc-ri/>, (Stand: 07.04.2015).
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer* 2000a;36(10):1235-47.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology* 2000;1(2):107-12.
- Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clinical Chemistry* 2000b;46(7):976-88.
- Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, 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 and Chemical Toxicology* 2000c;38(8):647-59.
- Panfili G, Fratianni A, Irano M. Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51(14):3940-4.
- Papadopoulos G, Tsimidou M, Boskou D. Stability of virgin olive oil: assessment of natural antioxidants and other related factors. In *Food Flavors, Ingredients and Composition*, Proc. 7th Int. Flavor Conf., Samos, Greece, 1992. Elsevier. Amsterdam, 1992: 321-6.
- Perona JS, Botham KM. Olive Oil as Functional Food: Nutritional and Health Benefits. In *Handbook of Olive Oil*; Aparicio, R. and Harwood, J., Eds.; Springer Science: New York, 2013: 677-703.

- Petrakis C. Olive Oil Extraction. In Handbook of Olive Oil; Aparicio, R. and Harwood, J., Eds.; Springer Science: New York, 2013: 191-223.
- Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi A-M. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000;80(7):939-66.
- Psomiadou E, Tsimidou M, Boskou D. α -Tocopherol Content of Greek Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000;48(5):1770-5.
- Psomiadou E, Tsimidou M. On the role of squalene in olive oil stability. 1999(0021-8561 (Print)).
- Qiao L, Kozoni V, Tsioulis GJ, Koutsos MI, Hanif R, Shiff SJ, Rigas B. Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1995;1258(2):215-23.
- Rastrelli L, Passi S, Ippolito F, Vacca G, De Simone F. Rate of Degradation of α -Tocopherol, Squalene, Phenolics, and Polyunsaturated Fatty Acids in Olive Oil during Different Storage Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50(20):5566-70.
- Salas-Salvado J, Garcia-Arellano A, Estruch R, Marquez-Sandoval F, Corella D, Fiol M, Gomez-Gracia E, Violes E, Aros F, Herrera C, et al. Components of the mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 2007;62(5):651-9.
- Satue MT, Huang S-W, Frankel E. Effect of natural antioxidants in virgin olive oil on oxidative stability of refined, bleached, and deodorized olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 1995;72(10):1131-7.
- Scaccini C, Nardini M, D'Aquino M, Gentili V, Di Felice M, Tomassi G. Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J Lipid Res* 1992;33(5):627-33.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition* 2000;130(8S Suppl):2073S-85S.
- Schuler P. Natural Antioxidants Exploited Commercially. Edition ed. In: Hudson BJB, ed. *Food Antioxidants*: Springer Netherlands, 1990:99-170.
- Shahidi F, Zhong Y. Revisiting the polar paradox theory: a critical overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011;59(8):3499-504.
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58(2):362-6.

- Sigma-Aldrich, Internet: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/r8769bul.pdf>, (Stand: 07.04.215).
- Sims RJ, Fioriti JA, Kanuk MJ. Sterol additives as polymerization inhibitors for frying oils. *J Am Oil Chem Soc* 1972;49(5):298-301.
- Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers HJ. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000;80(7):1013-23.
- Tanahashi T, Nagakura N, Inoue K, Inouye H, Shingu T. Sambacolignoside, a new Lignan-Secoiridoid glucoside from *Jasminum Sambac* Chemical & Pharmaceutical Bulletin 1987;35(12):5032-5.
- Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy Traditional Mediterranean Diet: an Expression of Culture, History, and Lifestyle, 1997.
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition research reviews* 2005;18(1):98-112.
- Tsimidou M. In *Handbook of Olive Oil*; Aparicio, R. and Harwood, J., Eds.; Springer Science: New York, 2013: 19-56.
- Tsimidou MZ. Chapter 61 - Squalene and Tocopherols in Olive Oil: Importance and Methods of Analysis. Edition ed. In: Watson VRPR, ed. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. San Diego: Academic Press, 2010:561-7.
- Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002;13(11):636-44.
- Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*;13(11):636-44.
- Vandendool H, Kratz PD. A Generalization of the Retention Index System including linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography *J Chromatogr* 1963;11:463-71.
- Velasco J, Dobarganes C. Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2002;104(9-10):661-76.
- Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, Caruso D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters* 2000;468(2-3):159-60.
- Visioli F, Galli C. Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998;46(10):4292-6.
- Vossen P. Growing Olives for Oil, In *Handbook of Olive Oil*; Aparicio, R. and Harwood, J., Eds.; Springer Science: New York, 2013:19-56.

- Vossen P. Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils. *HortScience* 2007;42(5):1093-100.
- Wiseman SA, Mathot JNNJ, de Fouw NJ, Tijburg LBM. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* 1996;120(1-2):15-23.
- Yamamoto S, Otto A, Simoneit BRT. Lignans in resin of *Araucaria angustifolia* by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2004;39(11):1337-47.
- Zampelas A, Kafatos AG, Levin BE. Olive oil intake in relation to cardiovascular diseases. *Grasas Aceites* 55, 2004: 24-32.
- Zhang J, Fang A, Wang B, Kim SH, Bogdanov B, Zhou Z, McClain C, Zhang X. iMatch: A retention index tool for analysis of gas chromatography-mass spectrometry data. *J Chromatogr A* 2011;1218(37):6522-30.

Lebenslauf

Name Annika Storz

Schulbildung

09/2003 - 06/2006 **Technisches Gymnasium,
Offenburg (Deutschland)**
Allgemeine Hochschulreife

08/1997 - 07/2003 **Klostergymnasium „Unserer Lieben Frau“,
Offenburg (Deutschland)**

Studium

seit 03/2012 **Universität Wien**
Master of Science in Ernährungswissenschaften
• Spezialisierungsrichtung: Lebensmittelqualität
und -sicherheit

10/2006 - 08/2011 **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**
Bachelor of Science in Ökotrophologie