

SKUPNI POLIFENOLI, HIDROKSITIRO SOL IN TIROSOL V OLJČNIH OLJIH SLOVENSKE ISTRE V DVEH ZAPOREDNIH LETIH (1996, 1997)

Bojan BUTINAR

ZRS, SI-6000 Koper, Garibaldijeva 18, E-mail: Bojan.Butinar@zrs-kp.si

Milena BUČAR-MIKLAVČIČ

LABS, 6310 Izola, Zelena ulica 8, E-mail: Milena.Miklavcic@guest.arnes.si

Darinka ČALIJA

LABS, SI-6310 Izola, Zelena ulica 8

IZVLEČEK

Polifenoli (PFOH) so antioksidanti rastlinskega izvora. Plodovi oljke (*Olea europaea* L.) vsebujejo PFOH, ki jih delimo v tri skupine: v iridoidne glikozide - oleuropein (OLE), verbaskozid, ligstrozid (LIG); v flavonoide ter v neflavonoidne spojine, derivate hidroksibenzojske oziroma cimetne kisline - hidroksitirosol (3,4-DHPEA) in tirosol (p-HPEA). V našem laboratoriju smo 16 vzorcem oljčnih olj (OO) letnika 1996 in 21 vzorcem OO letnika 1997 določevali skupne PFOH. Vsebnost skupnih PFOH letnika 1996 je bila med 46 in 383 mg/kg, letnika 1997 pa med 56 in 408 mg/kg.

Vzorcem OO letnika 1997 smo določili vsebnost PFOH p-HPEA (4,2-57,0 mg/kg) in 3,4-DHPEA (0,0-54,2 mg/kg). Delež vsote p-HPEA in 3,4-DHPEA se je za OO letnika 1997 v povprečju gibal med 3 in 51 odstotki skupnih PFOH.

Ključne besede: istrska belica, oljčno olje, oleuropein, polifenoli, iridoidni glikozidi, tirosol, hidroksitirosol

UVOD

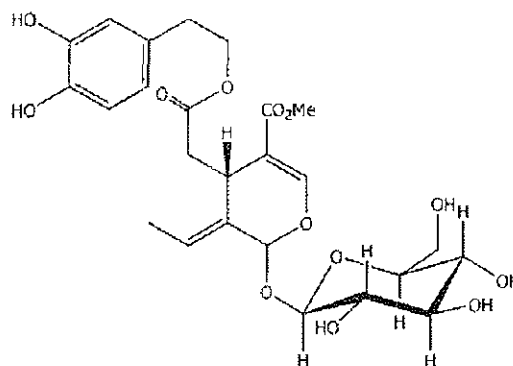
Družina fenolnih spojin, ki jo iz praktičnih razlogov imenujemo tudi polifenoli, je zelo pestra. Sestavlja dobršen del "polarne frakcije", ki jo definiramo kot segment, pridobljen pri ekstrakciji plodov ali olja z mešanico metanola in vode. Termin polifenoli pa kljub vsemu ni najbolj posrečen, saj niso vse fenolne spojine, ki sestavljajo poфарно frakcijo, polihidroksilne.

Najbolj ohlapna definicija polifenolov je zato naslednja: to so rastlinske učinkovine, ki imajo na aromatskem obroču eno ali več hidroksilnih skupin. Polifenoli dajejo rastlinam barvo in okus.

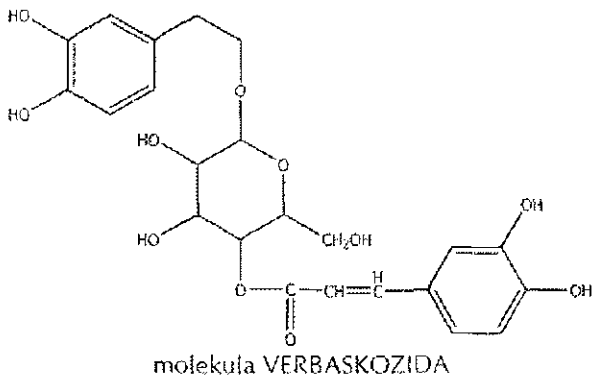
PREGLED DOSEDANJIH OBJAV

Iz literature je poznano, da vsebujejo tako oljčni brstiči kot tudi listje in plodovi (in posledično olje) oljke (*Olea europaea* L.) (De Laurentis *et al.*, 1997) polifenole, ki jih v grobem razdelimo v tri skupine:

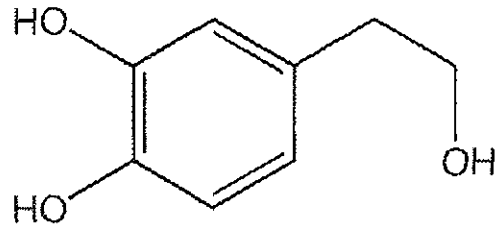
- v iridoide oziroma sekoiridoide (monoterenske laktone) - oleuropein, verbaskozid, ligstrozid, ... (Hiroshi Kuwajima *et al.*, 1988; Andary *et al.*, 1982; Gariboldi *et al.*, 1986).



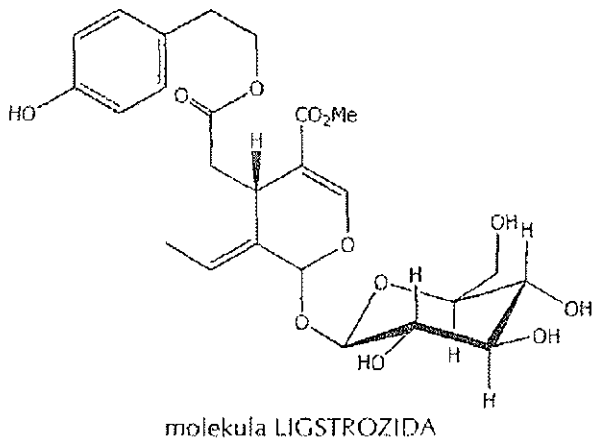
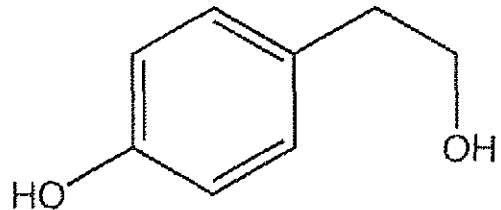
molekula OLEUROPEINA (zgornji segment je fenolni, srednji kislinski, spodnji pa glukozni)



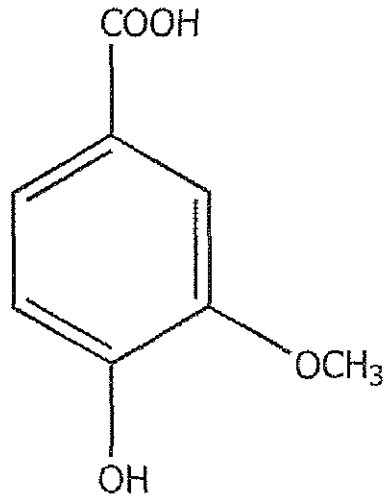
HIDROKSITIROSOI (3,4-DHPEA)



TIROSOL (p-HPEA)

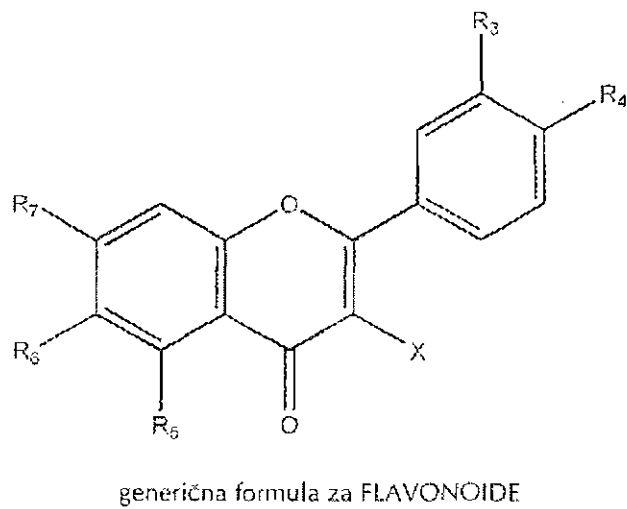
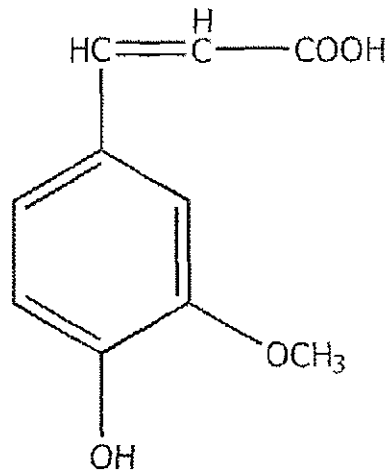


VANILINSKA KISLINA

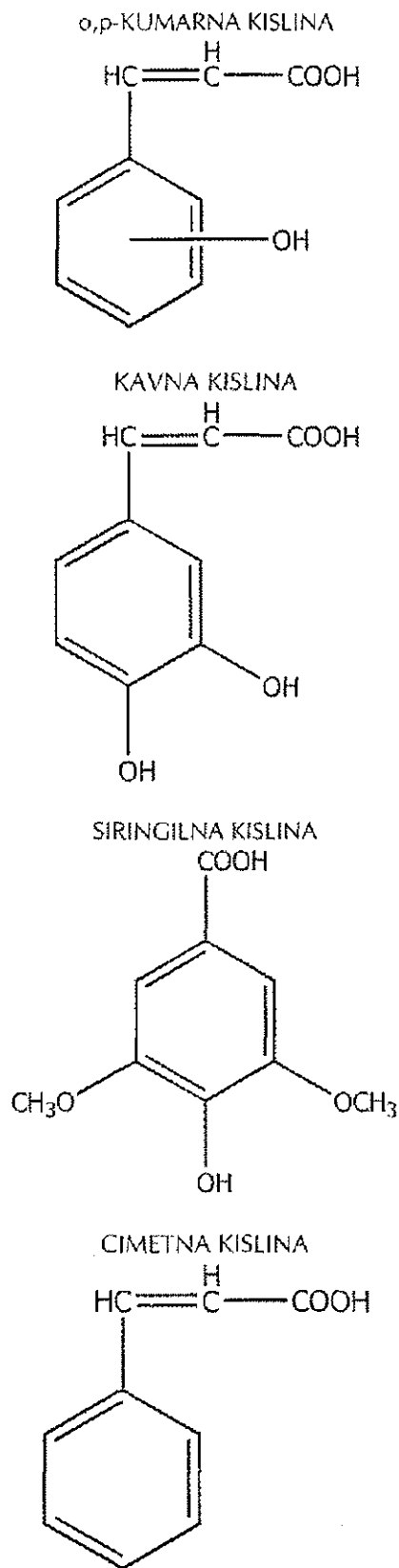


- v flavonoide (Amiot *et al.*, 1986) - apigenin, kvercetin, luteolin-7-glikozid...

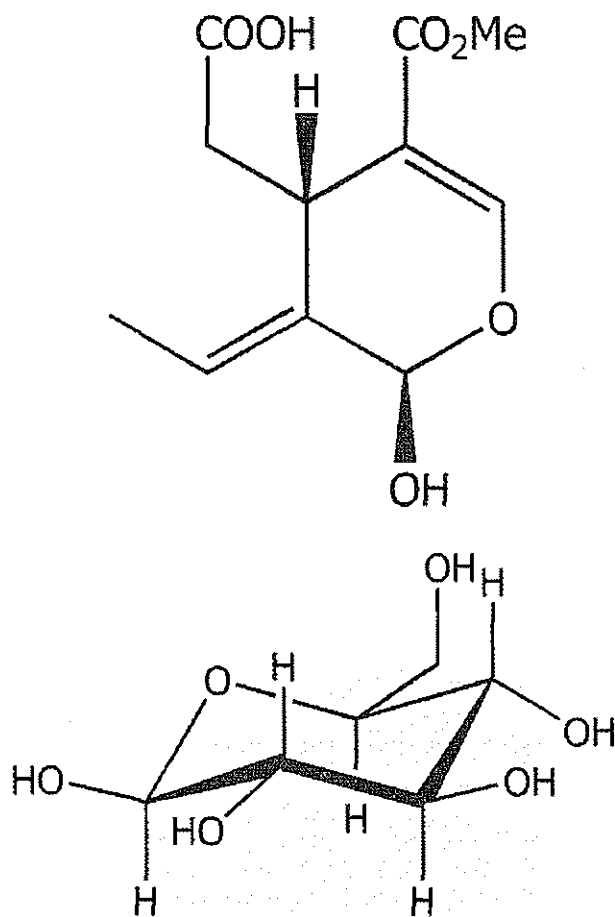
FERULNA KISLINA



- in neflavonoidne spojine, ki so predvsem derivati hidroksibenzojske oziroma cimetine kisline (e.g. hidroksitirozol, tirosol, vanilinska kislina, kavna kislina,...) - (Butinar *et al.*, 1996; Vrhovšek, 1996). Za slovensko poimenovanje nekaterih polifenolov glej Lavrenčič & Stibilj, 1999).



V zadnjih letih je pri oljčnih polifenolih težnja raziskav na sekoiridoidnih polifenolih - predvsem na oleuropeinu in na njegovih razpadnih produktih (Walter *et al.*, 1973). Oleuropein je glikozid, spojina hidroksitirosolnega estra elenolne kisline z β -D-glukopiranozo - oglejmo si ju na sl. 1.

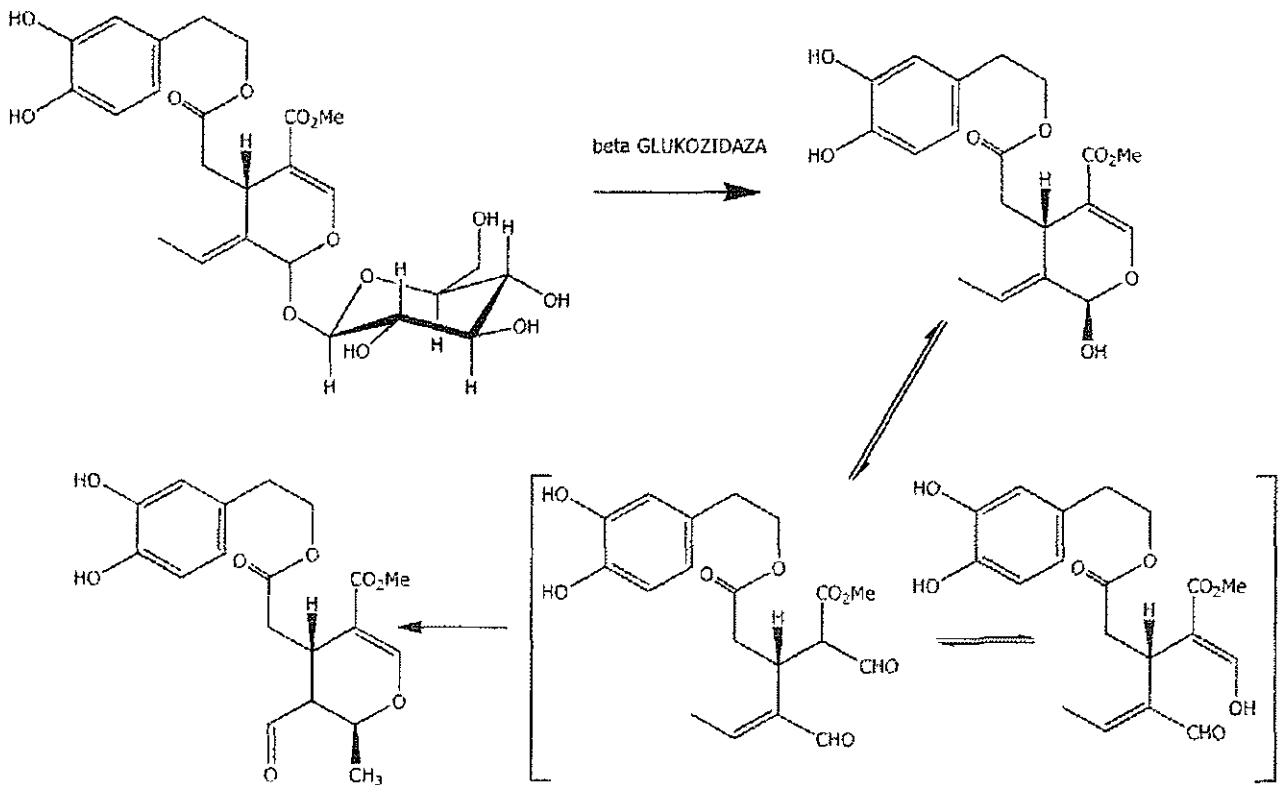


Sl. 1: Molekuli ELENOLNE KISLINE in β -D-GLUKOPIRANOZE.

Fig. 1: Molecules of ELENOLIC ACID and β -D-GLUCOPYRANOSE.

Koncentracija oleuropeina je v plodovih najvišja na prehodu pomladi v poletje, z dozorevanjem pa potekajo predvsem reakcije encimatske hidrolize - nastanek aglikona (3,4-DHPEA-EA) (Capasso *et al.*, 1996), ki kasneje prek vrste reakcij zreagira do končnih stopenj - elenolne kisline in hidroksitirosola (3,4-DHPEA) (Montedoro *et al.*, 1992a, 1992b, 1993). Podobno je pri ligstrozidu, le hidroksitirosol je v vseh stopnjah zamenjan s tirosolom (p-HPEA).

Na sl. 2 je prikazana shema encimatske hidrolize oleuropeina do oleuropein aglikona (3,4-DHPEA-EA) ter njegova izomerizacija prek dialdehidne oblike (3,4-DHPEA-EDA) oziroma (p-HPEA-EDA).



Sl. 2: Encimatska hidroliza oleuropeina do oleuropein aglikona (3,4-DHPEA-EA) ter njegova izomerizacija prek dialdehidne oblike (3,4-DHPEA-EDA) - (Marsilio *et al.*, 1996).

Fig. 2: Enzymatic hydrolysis of oleuropeine to oleuropeine aglycone (3,4-DHPEA-EA) and its isomerisation through the dialdehydic form (3,4-DHPEA-EDA) step - (Marsilio *et al.*, 1996).

Del raziskav oleuropeinske razpadne verige skuša tako v primeru olj kot tudi plodov te produkte analitsko ločiti, okarakterizirati in določiti njihovo vsebnost (Cinquanta *et al.*, 1997). Ločba in ovrednotenje potekata skoraj izključno ob pomoči preparativne kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) (Evangelisti *et al.*, 1997). Pri karakterizaciji pa je treba uporabiti različne spektroskopske metode (NMR, UV, IR, MS) (Limiroli *et al.*, 1995; Angerosa *et al.*, 1995).

Tako je bilo v zadnjih letih na osnovi HPLC polarne frakcije oljčnih olj (oziroma oljk) določenih kar nekaj produktov oleuropeinske razpadne verige (Baldioli *et al.*, 1996).

MATERIAL IN METODE

Material Olja

Raziskavo smo naredili na 16 vzorcih oljčnih olj letnika 1996 in na 21 vzorcih letnika 1997. Pri letniku 1996 je bila sortna sestava naslednja: istrska belica (IB) - 6 vzorcev, istrska belica cepljena na črnico (IBC) - 3 vzorci, 5 vzorcev je bilo mešanic (MIX), za 2 vzorca pa

nismo imeli podatka (BP). 4 vzorci (3 MIX in 1 IB) so bili stisnjeni iz oljk, ki so bile med trganjem in predelavo hranjene v morski vodi oziroma slanici.

Pri letniku 1997 pa: istrska belica (10 vzorcev), lecino (5 vzorcev), mešanice (6 vzorcev).

Vsi vzorci so bili skladiščeni pri temperaturi 20 °C, nepredušno zaprti v temne steklenice.

Standardi Skupni in orto difenoli

Za standardizacijo pri določevanju količine skupnih polifenolov smo uporabili Folin-Ciocalteu reagent proizvajalca Fluka Chemie AG (Buchs, Švica), kataloška številka 47641, in pa kavno kislino proizvajalca Fluka Chemie AG (Buchs, Švica), kataloška številka 60020.

Tirosol za HPLC

Proizvajalec standarda je Fluka Chemie AG (Buchs, Švica), njegova kataloška številka je 56105. Za umeritev smo pripravili metanolno raztopino tirosola koncentracije 420 mg/L (5 µL vbrizg).

Metode

Ekstrakcija polifenolov

5 g olja smo raztopili v 50 mL heksana in iz tako pripravljene raztopine ekstrahirali polifenole s trikrat po 20 mL 60% vodne raztopine metanola. Pri vsaki ekstrakciji smo fazi stresali 2 minuti. Iz združenih ekstraktov smo na rotavaporju pri temperaturi 40 °C odparili topilo. Suhi preostanek smo rekonstituirali v 1 mL metanola in ga do analize hranili pri temperaturi -20 °C.

Določevanje skupnih polifenolov

Skupne polifenole smo določevali tako, kot je to opisano v literaturi (Gutfinger, 1981). Princip metode sloni na modro obarvanem kompleksu, ki nastane pri oksidaciji polifenolov v alkalnem mediju ob pomoči fosforwolframove (VI) in fosformolibdenove (VI) kisline (Ranalli *et al.*, 1999). 100 µL ekstrakta smo v 10 mL merilni bučki z vodo razredčili na 5 mL. Raztopini smo dodali 500 µL Folin-Ciocalteu reagenta. Po 3 minutah smo v bučko prilili 1 mL nasičene raztopine natrijevega karbonata (cca. 35%) ter vsebino premešali in dolili vodo do 10 mL oznake. Po 1 uri smo izmerili absorbanco pri 725E-9 m glede na slepi vzorec, ki so ga sestavljali vsi omenjeni reagenti. Umeritveno krivuljo smo izvedli s kavno kislino v koncentracijskem območju 0-100 µg na 10 mL raztopine. Absorbance smo izmerili s spektrofotometrom proizvajalca Milton Roy, model Spectronic Genesys 5.

Določevanje tirosola in hidroksitirosola

Tirosol smo določili s tekočinsko kromatografijo visoke (HPLC) na osnovi retenzijskih časov uporabljenega standarda in znane umeritvene koncentracije. Hidroksitirosolnega standarda nismo našli v nobenem katalogu kemikalij, zato smo njegovo koncentracijo v vzorcih določili na osnovi literaturne primerjave retenzijskega časa in pa privzetega odgovora detektorja (response factor) za tirosol.

HPLC

Uporabljali smo sistem, opremljen z gradientno črpalko, z avtoinjektorjem in UV/VIS detektorjem, model 1050, proizvajalca Hewlett Packard. Polifenole smo ločevali na koloni Hypersil ODS 5µm, 4.6 x 200 mm (HP). Absorbanco eluata smo merili pri 280E-9 m.

Za ločevanje smo uporabili mobilno fazo, ki je omenjena v literaturi (Brenes *et al.*, 1992). Sestavljena je bila iz vode, nakisane s fosforno kislino do pH 2 (A), in acetonitrila (B), za lastne potrebe pa smo jo modificirali tako, da smo dosegli čim boljše ločevanje polifenolov.

Pretok mobilne faze je bil 1 mL/min, čas analize pa 40 minut. Začeli smo s 95% A in 5% B. V 20 minutah smo A znižali na 75%, B pa zvišali na 25%. V naslednjih 20 minutah se je A spustil na 50%, B pa dvignil na 50%. V tej točki smo prenehali meriti absorbanco eluata. Začeli smo s čiščenjem kolone, in sicer tako, da se je v naslednjih 5 minutah A znižal na 25%, B pa dvignil na 75%. Pri taki sestavi mobilne faze smo kolono čistili 10 minut in nato v naslednji minuti vzpostavili začetno stanje (95% A in 5% B) ter stabilizirali kolono še 14 minut pred naslednjim vbrizgom. Vbrizg je bil 50 µL metanolnega ekstrakta. Umeritev smo izvedli z metanolno raztopino tirosola koncentracije 420 mg/L.

REZULTATI

V tab. 1 so zbrani statistični podatki vsebnosti skupnih polifenolov v oljčnih oljih letnika 1996 in 1997 v mg/kg: povprečje, standardna napaka (SD), mediana, min, max, število vzorcev (n). Pri vzorcih OO letnika 1996 smo vrednosti podali samo za vzorce OO, ki niso bili stisnjeni iz oljk, hranjenih v slanici.

Tab. 1: Vsebnost polifenolov v oljčnih oljih letnikov 1996 in 1997 v mg/kg OO.

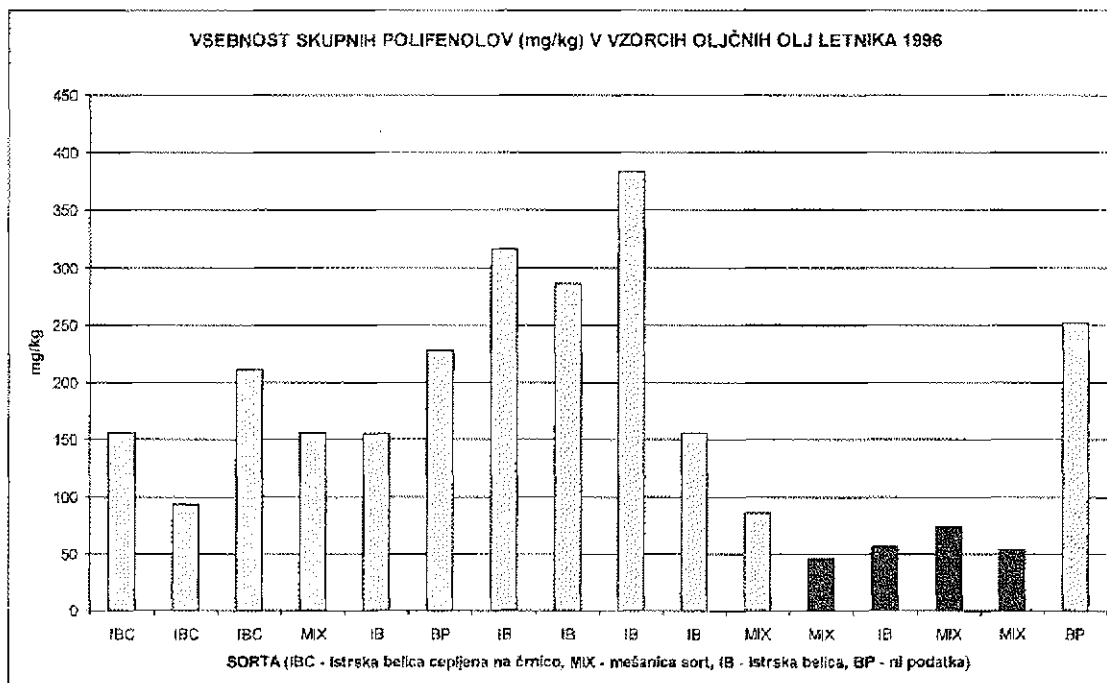
	letnik 1996	letnik 1997
Povprečje	207	213
SD	90	103
Mediana	184	210
Min	86	56
Max	383	408
n	12	21

Podatki o vsebnosti skupnih polifenolov v vzorcih ločljivosti letnika 1996 so grafično ponazorjeni na sl. 3.

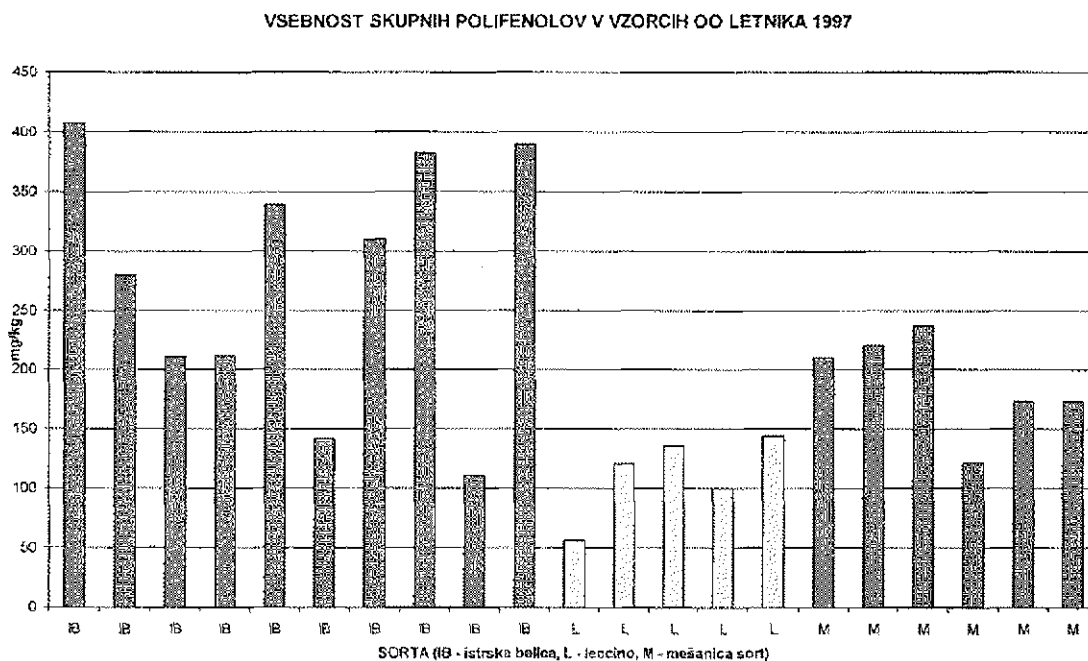
Kot smo že ugotovili v prejšnjih letih (Butinar *et al.*, 1996), so vrednosti najvišje pri vzorcih, ki so stisnjeni iz sorte istrska belica oziroma iz mešanic, kjer ima istrska belica največji delež.

Zanimive so vrednosti za vzorce, ki so označeni temno - pri teh vzorcih so bile oljke pred prešanjem hranjene v slanici oziroma morski vodi. Kljub dejstvu da je sorta istrska belica prevladujoča sorta, so vrednosti relativno nizke. Te podatke gre pripisati dejstvu, da so glavni polifenoli (oleuropein in njegovi derivati) izredno dobro topni v polarnih topilih in se zato pri daljšem skladiščenju oljk v morski vodi oziroma slanici preprosto izločijo (»izlužijo«) iz plodov. Taka olja so seveda tudi senzorično in antioksidativno revnejša.

Na sl. 4 smo prikazali vsebnost skupnih polifenolov v vzorcih oljčnih olj letnika 1997 - vzorci so razvrščeni po sortah. IB - istrska belica, L - leccino, M - mešanice dveh ali več sort.

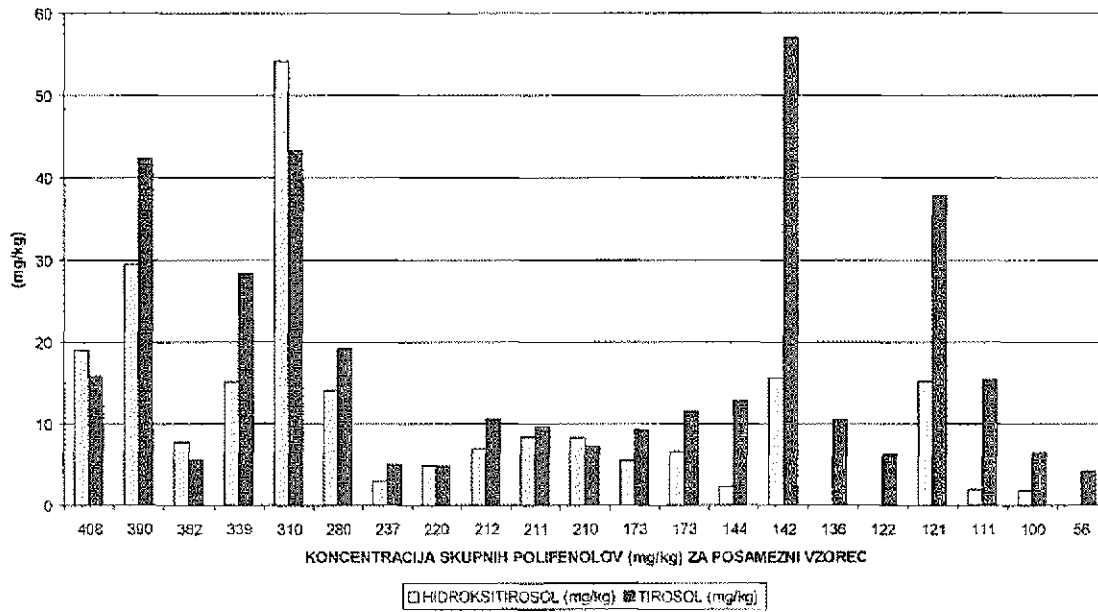


Sl. 3: Vsebnost skupnih polifenolov v vzorcih OO letnika 1996.
 Fig. 3: Total polyphenols content in OO samples from the 1996 crop.



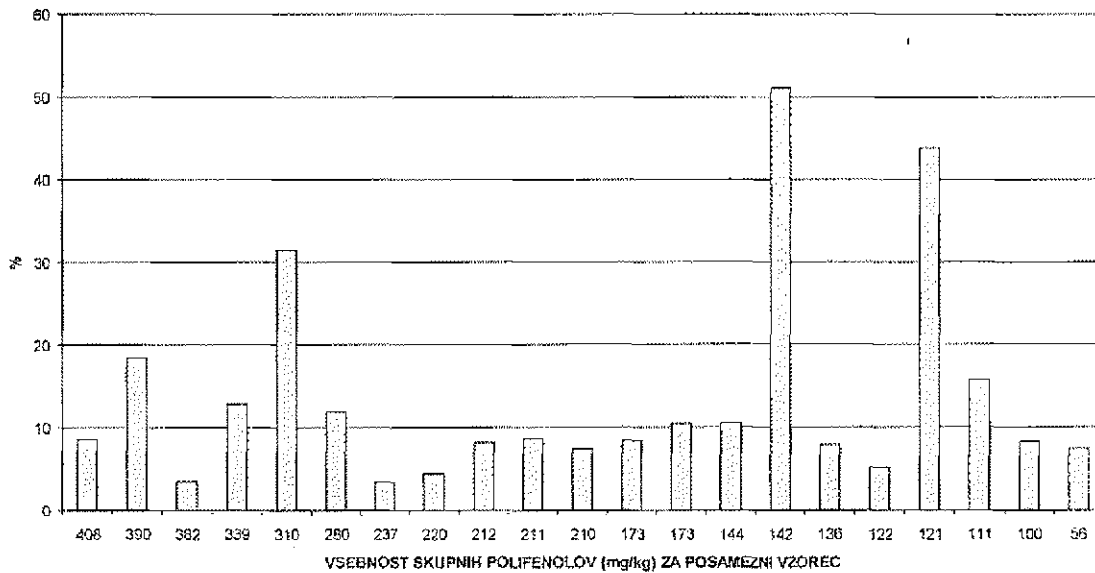
Sl. 4: Vsebnost skupnih polifenolov v vzorcih OO letnika 1997.
 Fig. 4: Total polyphenols content in OO samples from the 1997 crop.

VSEBNOSTI HIDROKSITIROSOI IN TIROSOI V VZORCIH OLJČNIH OLJ LETNIKA 1997



Sl. 5: Vsebnost hidroksitirosoi in tirosoi v vzorcih OO letnika 1997.
 Fig. 5: Content of hydroxytyrosol and tyrosol in OO samples from the 1997 crop.

ODSTOTNI DELEŽ VSOTE TIROSOI IN HIDROKSITIROSOI OD SKUPNIH POLIFENOLOV V OLJČNIH OLJH LETNIKA 1997



Sl. 6: Odstotni delež vsote tirosoi in hidroksitirosoi v polifenolnem delu OO letnika 1997.
 Fig. 6: Sum of hydroxytyrosol and tyrosol vs. total polyphenols content in OO samples from the 1997 crop, in %.

Vzorci smo razdelili po sortah. Ugotovili smo, da vzorci OO, ki so stisnjeni iz sorte istrska belica, vsebujejo več polifenolov (povprečje 279 mg/kg) v primerjavi z leccinom (povprečje 111 mg/kg) oziroma mešanicami (povprečje 189 mg/kg).

Vzorcem OO letnika 1997 smo določili tudi vsebnost polifenolov tirosola in hidroksitirosola. Znano je, da je polifenol hidroksitirosol eden izmed končnih produktov razgraditve sekoiridoidnega glikozida oleuropeina. Visoke vrednosti vsebnosti hidroksitirosola ob hkratni visoki vsebnosti skupnih polifenolov kažejo na olja z bogato senzorično in z dobrimi antioksidativnimi lastnostmi.

Sl. 5 prikazuje vsebnost tirosola in hidroksitirosola za posamezne vzorce, ob hkratnem podatku za vrednost skupnih polifenolov.

Iz grafa vidimo, da je vsebnost hidroksitirosola praviloma nižja od vsebnosti tirosola. Povprečni delež obeh polifenolov je 14 odstotkov in se giblje v intervalu med 3 in 51 odstotki - sl. 6.

ZAKLJUČEK

Pri oljčnih oljih letnika 1996 nam je uspelo zaslediti odvisnost med ekspozicijo obranih plodov v polarnih toplih (slanica, skladiščenje pred predelavo) in količino skupnih polifenolov - le-ta je nekajkrat nižja glede na plodove iste sorte, ki so bili razmeroma hitro predelani v olje. Pri vzorcih oljčnih olj letnika 1997 smo potrdili že znano dejstvo, da je oljčna sorta istrska belica tista, ki ima višjo koncentracijo skupnih polifenolov v primerjavi z drugo raziskovano sorto leccino (279 mg/kg vs. 111 mg/kg).

Pri HPLC polarne frakcije (pri 280E-9 m - sekoiridoidni segment polifenolov) nam je uspelo identificirati in določiti vsebnost dveh razpadlih produktov oleuropeina oziroma ligstrozida - tirosol in hidroksitirosol.

V prihodnje bi bilo zanimivo poskusiti identificirati in kvantizirati še preostale razpadne intermedie oleuropeina.

Iz primerjave podatkov za koncentracije skupnih polifenolov in za koncentracije tirosola ter hidroksitirosola je razvidno, da ostaja delež vsote tirosola in hidroksitirosola glede na vsoto skupnih polifenolov približno enak (s staranjem se le znižuje "zaloga" skupnih polifenolov). Pri zelo starih oziroma slabo skladiščenih vzorcih - pa tudi pri vzorcih, ki so bili pripravljene iz poškodovanih, prezrelih ali slabo skladiščenih oljk, pa se to ravnotežje zelo hitro poruši, ker encimatski razpad sekoiridoidnih polifenolov poteče že med skladiščenjem oziroma rastjo (Amiot *et al.*, 1986).

ZAHVALA

Naša zahvala gre Ministrstvu za znanost in tehnologijo Republike Slovenije, Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije, Mestni občini Koper ter Občini Izola in Piran za financiranje raziskovalnega dela. Dr. Vekoslavi Stibilj smo hvaležni za številne nasvete, laboratoriju LABS za nesebično pomoč pri eksperimentalnem delu, društvu DOSI za koordinacijo pri zbiranju vzorcev in pa seveda gospodu Angelu Hlaju, ki vsakič poskrbi za zlahkne vzorce OO sorte istrska belica.

TOTAL POLYPHENOLS, HYDROXYTYROSOL AND TYROSOL IN THE OLIVE OILS OF SLOVENE ISTRA IN TWO CONSECUTIVE YEARS (1996, 1997)

Bojan BUTINAR

ZRS, SI-6000 Koper, Caribaldijeva 18, E-mail: Bojan.Butin@zrs-kp.si

Milena BUČAR-MIKLAVČIČ

LABS, 6310 Izola, Zelena ulica 8, E-mail: Milena.Miklavcic@guest.ames.si

Darinka ČALIJA

LABS, SI-6310 Izola, Zelena ulica 8

SUMMARY

Polyphenols (PFOH) are antioxidants of vegetable origin. Olive (Olea europaea L.) contains PFOH, which can be divided into three groups: iridoid glucosides - oleuropeine, verbascoside, ligstroside - flavonoids and non-flavonoid compounds, derivatives of hydroxybenzoic or cinnamic acid - hydroxytyrosol (3,4-DHPEA), tyrosol (p-HPEA). Oleuropeine is a glucoside, a compound of ester between 3,4-DHPEA and elenolic acid with β -D-glucopyranose,

while in ligstroside the 3,4-DHPEA is replaced with *p*-HPEA. During the maturing of fruits, reactions of enzymatic hydrolysis take place - creation of aglycone, which through a series of reactions turns to elenolic acid and 3,4-DHPEA or *p*-HPEA. These products can be separated with gradient HPLC. In our laboratory we recorded HPLC chromatograms of polar fraction in 21 samples of olive oils (OO) from the 1997 crop and determined the content of *p*-HPEA (4.2-57.0 mg/kg) and 3,4-DHPEA (0.0-54.2 mg/kg). The high values of the 3,4-DHPEA content and at the same time the high content of total PFOHs indicate oils with rich sensorics and good antioxidative characteristics. Total PFOHs were also determined in OO, i.e. in 16 samples from the 1996 crop (46-383 mg/kg) and 21 samples from the 1997 crop (56-408 mg/kg). The highest values were recorded in those OO samples that had been pressed out of the cv. "Istrska belica" or the blends in which "Istrska belica" had the highest share. An exception were the values of some 1996 OO, the olives of which had been prior to the processing kept in saline water (46-74 mg/kg). Such OO are of course also sensorically and antioxidatively poorer.

Key words: hydroxytyrosol, iridoid glucosides, oleuropein, olive oil, polyphenols, tyrosol

LITERATURA

- Amiot, M.-J., Fleuriot, A., Macheix, J.-J. 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 823-826.
- Andary, C., Wylde, R., Laffite, C., Privat, G., Winternitz, F. 1982. Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobancha rapum-genistae*. *Phytochemistry*, 21, 5, 1123-1127.
- Angerosa, F., d'Alessandro, N., Konstantinou, P., Di Giacinto, L. 1995. GC-MS Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1802-1807.
- Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G., Montedoro, G.F. 1996. Antioxidant Activity of Tocopherols and Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil. *JAOCS*, 73, 11, 1589-1593.
- Brenes, P., Garcia, M., Duran, C., Garrido, A. 1992. Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olives. *Journal of food science*, 58, 2, 347-350.
- Butinar, B., Bučar-Miklavčič, M., Čalija, D. 1994. Polifenoli v vzorcih oljčnih olj slovenske Istre. Neobjavljeni rezultati.
- Butinar, B., Bučar-Miklavčič, M., Čalija, D. 1996. Polifenoli v izbranih oljčnih oljih slovenske Istre. Neobjavljeni rezultati.
- Capasso, R., Evidente, A., Visca, C., Gianfreda, L., Maremonti, M., Greco, G. 1996. Production of Glucose and Bioactive Aglycone by Chemical and Enzymatic Hydrolysis of Purified Oleuropein from *Olea europea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 61, 365-377.
- Cinquanta, L., Esti, M., La Notte, E. 1997. Evolution of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil During Storage. *JAOCS*, 74, 10, 1259-1264.
- De Laurentis, N., Crescenzo, G., Lai, O. R., Milillo, M. A. 1997. Investigation on the extraction and concentration of oleuropein and flavonoids in *Olea europaea* L. based products. *Pharm Pharmacol Lett*, 7, 27-30.
- Evangelisti, F., Zunin, P., Tiscornia, E., Petacchi, R., Drava, G., Lanteri, S. 1997. Stability to Oxidation of Virgin Olive Oils as Related to Olive Conditions: Study of Polar Compounds by Chemometric Methods. *JAOCS*, 74, 8, 1017-1023.
- Gariboldi, P., Jommi, G., Verotta, L. 1986. Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 25, 865-869.
- Gutfinger, T. 1981. Polyphenols in olive oils, *JAOCS*, 58, 966-968.
- Hiroshi Kuwajima, Takeshi Uemura, Kiyozaku Takaishi, Kenichiro Inoue, Hiroyuki Inouye, 1988. A secoiridoid glucoside from *Olea Europaea*. *Phytochemistry*, 27, 6, 1757-1759.
- Lavrenčič, A., Stibilj, V. 1999. Derivati cimetne kisline in lignin: vsebnost, struktura in lastnosti. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, 74-1, 19-35.
- Limiroli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilio, V., Bianchi, G., Zetta, L., 1995. ¹H and ¹³C NMR characterization of new oleuropein aglycones. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1, 1519-1523.
- Marsilio, V., Lanza, B., Pozzi, N. 1996. Progress in Table Olive Debittering: Degradation in vitro of Oleuropein and its Derivatives by *Lactobacillus plantarum*. *JAOCS*, 73, 5, 593-597.

- Montedoro, G. F., Servili, M., Baldioli, M., Miniati, E. 1992a.** Simple and Hydrolyzable compounds in Virgin Olive Oil. 1. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1571-1576.
- Montedoro, G. F., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E. 1992b.** Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Initial Characterization of the Hydrolyzable Fraction. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1577-1580.
- Montedoro, G. F., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., Macchioni, A. 1993.** Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 2228-2234.
- Ranalli, A., Mattia, G. De, Patumi, M., Fontanazza, G. 1999.** Caratteristiche analitiche e compositive dell'olio della cultivar 1-77. *Olivo & Olio*, 5, 34-43.
- Vrhovšek, U. 1996.** Fenoli kot antioksidanti v vinu. 1. slovenski vinogradniško-vinarski kongres, Portorož, 4-6 december, 124-134.
- Walter, W. M., Fleming, H. P., Etchells, J. L. 1973.** Preparation of antimicrobial compounds by Hydrolysis of Oleuropein from Green Olives. *Applied Microbiology* 26, 5, 773-776.