

TOKOFEROLI V OLJČNIH OLJIH SLOVENSKE ISTRE V TREH ZAPOREDNIH LETIH

Bojan BUTINAR

ZRS, SI-6000 Koper, Caribaldijeva 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

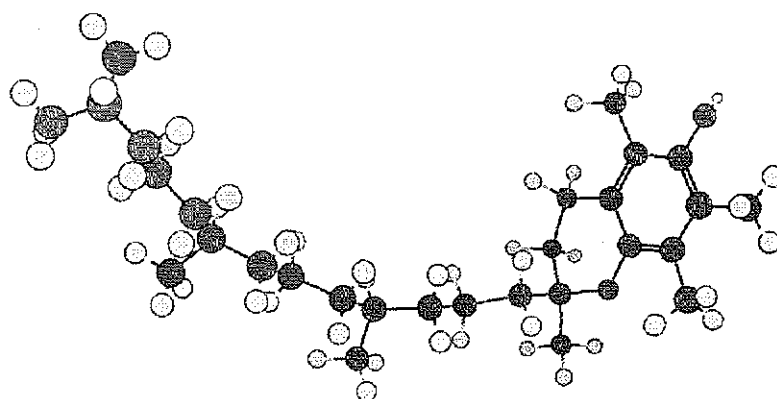
Antioksidanti so spojine, ki oljčna olja (OO) varujejo pred staranjem. Vitamin E je antioksidant, ki se predvsem v obliki α -tokoferola pojavlja v ekstra deviških OO. Rezultati analiz vsebnosti skupnih tokoferolov (ST) v OO slovenske Istre (letniki 1995, 1996 in 1997) so 3,18 mg/100 g; 6,73 mg/100 g in 4,09 mg/100 g. Pri treh vzorcih OO letnika 1995, pri katerih smo raziskovali vpliv neustreznega skladiščenja na vsebnost ST, je vsebnost le-teh padla pod 1 mg/100 g.

Ključne besede: antioksidanti, hidroksitirosof, oljčno olje, polifenoli, tirosof

UVOD

Znano je, da ekstra deviška oljčna olja vsebujejo precej visok delež tako imenovanih neumljivih sestavin, takih, ki ne spadajo k triacilglicerolom. Vse te spojine olja senzorično bogatijo - dajejo jim aromo. Še posebej zanimivi so vitamin E in (poli)fenoli, saj so le-ti antioksidanti, spojine torej, ki olje varujejo pred "sta-

ranjem" (deterioracijo in razpadom). Olje je zaščiteno pred oksidacijo vse dotlej, dokler je v njem še kaj antioksidantov. Najvažnejši dejavnik, ki vpliva na vsebnost vitamina E, je prav gotova sorta, potem pa sledijo klimatske razmere v času dozorevanja plodov ter seveda način predelave in skladiščenja. Na sl. 1 je kemijska formula homologa vitamina E, α -tokoferola.

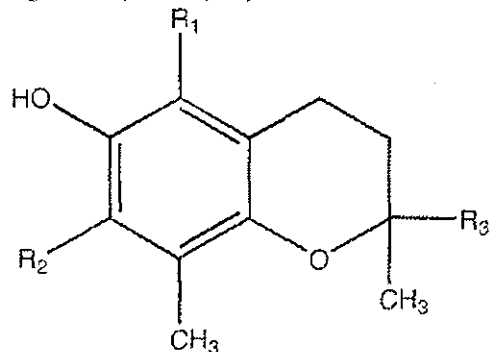


Sl. 1: 3D kemijska formula homologa vitamina E α -tokoferola.
Fig. 1: 3D structural formula of a homologue of vitamin E α -tocopherol.

PREGLED DOSEDANJIH OBJAV

Poznanih je osem naravnih substanc, ki jih generično imenujemo vitamin E. Kemijsko jih delimo v skupini tokotrienolov in tokoferolov. Tokoferoli in tokotrienoli (s skupnim imenom tokoli) so visokomolekularni ciklični alkoholi.

Tokoferoli in tokotrienoli združujejo α , β , γ in δ homologe. Sl. 2 prikazuje njihove strukture.



TOKOFEROLI	R ₁	R ₂	R ₃
α - tokoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₂ [CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂] ₃ H
β - tokoferol	CH ₃	H	CH ₂ [CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂] ₃ H
γ - tokoferol	H	CH ₃	CH ₂ [CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂] ₃ H
δ - tokoferol	H	H	CH ₂ [CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂] ₃ H

TOKOTRIENOLI	R ₁	R ₂	R ₃
α - tokotrienol	CH ₃	CH ₃	CH ₂ [CH ₂ CH=C(CH ₃)CH ₂] ₃ H
β - tokotrienol	CH ₃	H	CH ₂ [CH ₂ CH=C(CH ₃)CH ₂] ₃ H
γ - tokotrienol	H	CH ₃	CH ₂ [CH ₂ CH=C(CH ₃)CH ₂] ₃ H
δ - tokotrienol	H	H	CH ₂ [CH ₂ CH=C(CH ₃)CH ₂] ₃ H

Sl. 2: Strukture tokolov (Shukla et al., 1997; White & Xing, 1997).

Fig. 2: Structures of tocols (Shukla et al., 1997; White & Xing, 1997).

Tokoli so bogato zastopani v rastlinskih tkivih, predvsem v orehih in lešnikih, rastlinskih oljih, sadju in zelenjavi. Še posebej veliko jih je v pšeničnih kalčkih, koruzi, sončničnem semenu, semenu ogrščice, sojinem olju, v črni detelji in v solati. Oljčna olja se po vsebnosti vitamina E uvrščajo na sredino lestvice rastlinskih olj.

Antioksidativna aktivnost tokolov je odvisna od geometrije molekule (vrste in števila substituent (e.g. R₁, R₂ in R₃)) in od temperature. Pri temperaturi 37°C je antioksidativna moč naslednja: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$. Pri povišanih temperaturah (50-100°C) pa se antioksidativna moč obrne: $\alpha > \beta > \gamma$. δ tokoferol je biološko daleč najbolj zastopan tokolni homolog - njegova biološka aktivnost je dvakrat večja od β in δ homologov ter 100 krat večja od γ homologa (Madhavi et al., 1996).

Omenili smo, da tokoli olja varujejo pred staranjem - pred razpadom in deterioracijo. Eden izmed glavnih razlogov za deterioracijo olja sta encimatski in oksidacijski proces. Tokoli preprečujejo oksidacijo olj in lipidnih sestavin v živilih tako, da kot antioksidanti preprečujejo avtooksidacijo in fotooksidacijo.

Avtooksidacija

Avtooksidacija je vrsta radikalne substitucijske reakcije, ki je shematsko ponazorjena na sl. 3.

$LH \rightarrow L^\bullet$	INICIACIJA (nastanek prostega radikala)
$L^\bullet + O_2 \rightarrow LO_2^\bullet$	REAKCIJA RADIKALA S KISIKOM
$LO_2^\bullet + LH \rightarrow L^\bullet + LOOH$	PROPAGACIJA
$LO_2^\bullet + E \rightarrow E^\bullet + LOOH$	REAKCIJA Z ANTIOKSIDANTOM
$E^\bullet + E^\bullet \rightarrow E-E; L^\bullet + L^\bullet \rightarrow L-L$	TERMINACIJA

LH - maščobna kislina, L[•] - maščobnokislinski radikal, LO₂[•] - peroksi radikal, E - tokoferol, LOOH - hidroperoksid

Sl. 3: Radikalni mehanizem avtooksidacijske reakcije v oljih (Deshpande et al., 1996).

Fig. 3: Radical reaction mechanism of the autooxidation reaction in oils (Deshpande et al., 1996).

V živih tkivih - v celičnih membranah - pa avtooksidacijsko verigo tvori še regeneracijska stopnja tokoferola (Deshpande et al., 1996):

	REGENERACIJA
$E^\bullet + C \rightarrow E + C^\bullet$	C - askorbinska kislina
$C^\bullet + NADPH \rightarrow C + NADP$	GSH - reducirani glutation
$E^\bullet + 2GSH \rightarrow E + GSSG$	GSSG - glutation disulfid
$GSSG + NADPH \rightarrow NADP + 2GSH$	

Hitrost reakcije avtooksidacije in podrobna struktura nastalih hidroperoksidov sta v veliki meri odvisna od resonančno stabiliziranega alilnega radikala L[•], ki nastane iz nenasičene kisline LH.

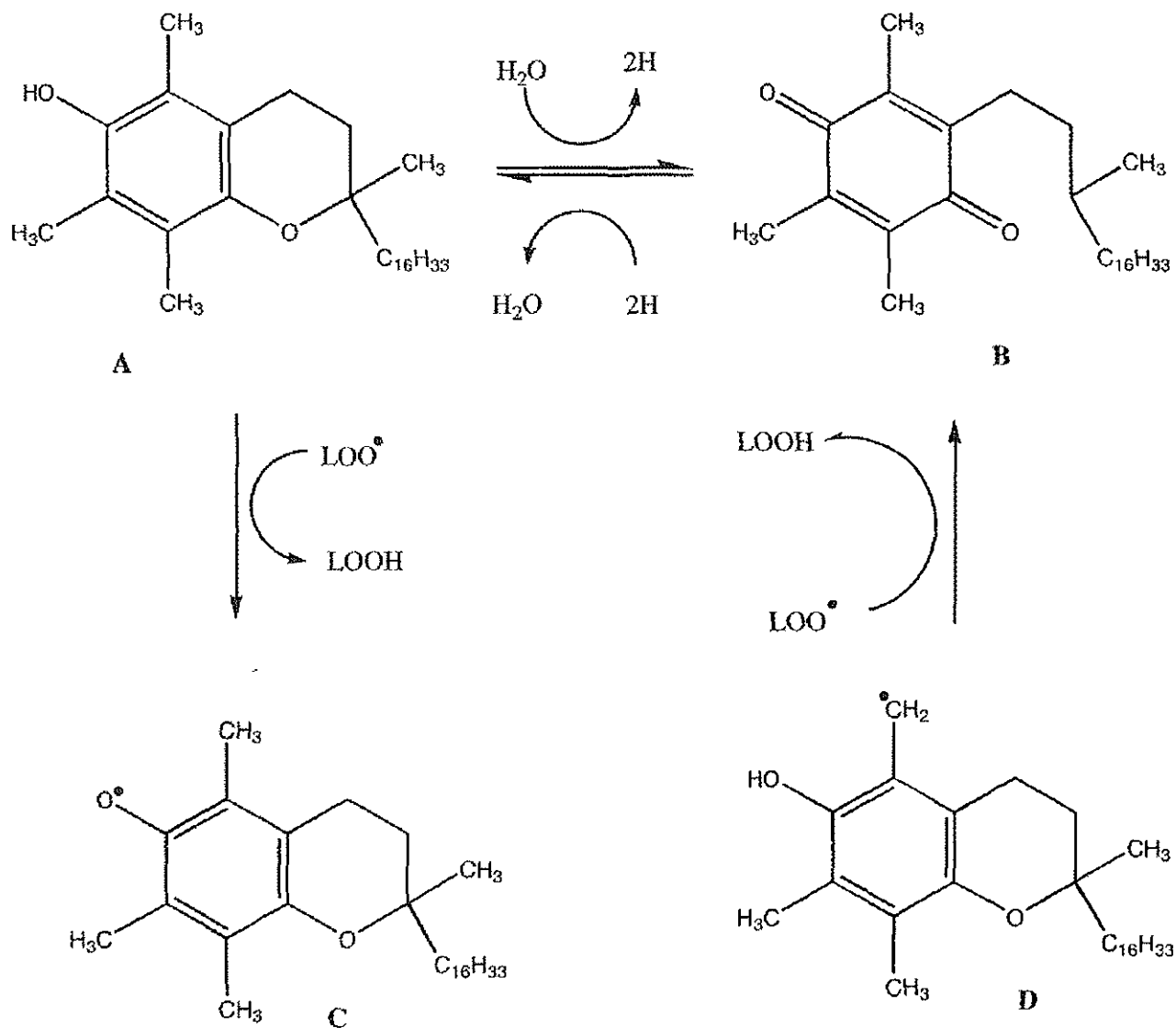
Podrobna geneza inicializacijskega koraka še ni popolnoma pojasnjena, čeprav je znano, da ga favorizirajo ustrezni radikali, e.g. taki, ki nastajajo s kovinsko kataliziranim razpadom predhodno nastalih hidroperoksidov.

Predhodno nastali hidroperoksidi so lahko produkt te iste avtooksidacije oziroma so nastali s fotooksidacijo, ki pa jo favorizirajo sledovi pigmentov v olju, npr. klorofil. Vidimo torej, da lahko reakcijo avtooksidacije

znatno zavremo, če poskrbimo, da je koncentracija kovin, v glavnem železa in bakra, minimalna.

Antioksidanti pa lahko preprečujejo reakcijo avto-oksிடacije tako, da favorizirajo radikalne terminacijske procese in s tem seveda skrajšujejo propagacijske

procesе, oziroma tako, da z LH tekmujejo za reakcijo z LO_2^\bullet , pri čemer se tvori veliko bolj stabilni LOOH (Cuppett et al., 1997). Ta proces ponazarjajo reakcije s sl. 4.



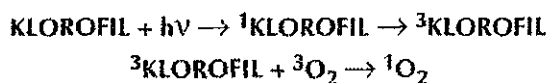
Sl. 4: Oksidacija α -tokoferola (A) v α -tokoferil kinon (B) prek semikinonskih intermediatov (C, D) (Cuppett et al., 1997).

Fig. 4: α -tocopherol (A) oxidation to α -tocopheryl quinone (B) through semiquinone intermediates (C, D) (Cuppett et al., 1997).

Fotooksigencija

Pogoj za fotooksidacijo je singletni kisik, ki nastane v reakciji iz tripletnega kisika s pomočjo svetlobe in ustreznе spojine (angl. *sensitizer*), ki je v primeru oljčnih

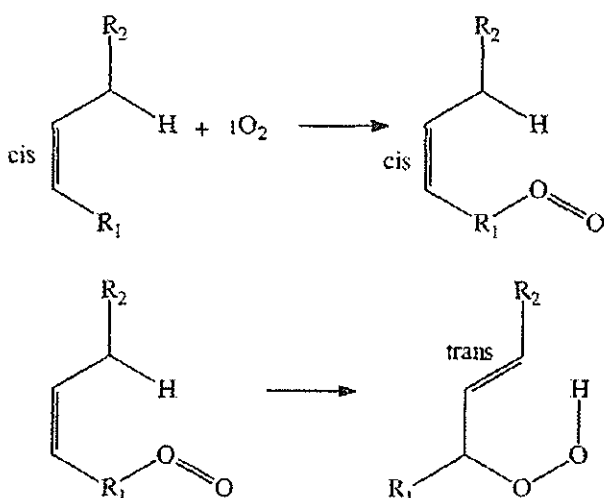
olj klorofil. Jasno je, da ta reakcija uspešno poteče le, če je na voljo svetloba, predsem svetloba z valovno dolžino iz ultravijoličnega dela spektra (UV). Omenjena reakcija je prikazana na sl. 5.



Sl. 5: Shematski prikaz reakcije, pri kateri iz tripletnega kisika in klorofila s pomočjo svetlobe nastane singletni kisik.

Fig. 5: Schematic reaction showing the formation of the singlet oxygen from the triplet oxygen and chlorophyll in the presence of the UV light.

Tako nastali singletni kisik se adira na olefinski del nenasičene maščobne kisline, v nadaljevanju pride do premestitve dvojne vezi in do spremembe konfiguracije na dvojni vezi iz *cis* v *trans*. Ta mehanizem je prikazan na sl. 6.



Sl. 6: Reakcija fotooksidacije.
Fig. 6: The photooxygenation reaction.

Na hitrost reakcije fotooksidacije v nasprotju z avtooksidacijo ne vplivajo antioksidanti, znatno pa jo zmanjšujejo preprečevalci nastajanja singletnega kisika (angl. *radical quencher*), e.g. karoteni in tudi tokoli - v oljčnem olju je tetraterpen β karoten (sl. 7).

Reakcija fotooksidacije je znatno hitrejša od reakcije avtooksidacije. V tab. 1 so navedene relativne

reakcijske hitrosti avtooksidacije in fotooksidacije za kisline C 18:1 (*cis*-9), C 18:2 (*cis* 9,12) in C 18:3 (*cis*-9,12,15), ki so pomembnejše nenasičene kisline v oljčnem olju.

Tab. 1: Relativne reakcijske hitrosti oksidacij za pomembnejše nenasičene maščobne kisline OO (Gunstone, 1984).

Tab. 1: Relative oxydation reaction rates for the main unsaturated fatty acids of olive oils (Gunstone, 1984).

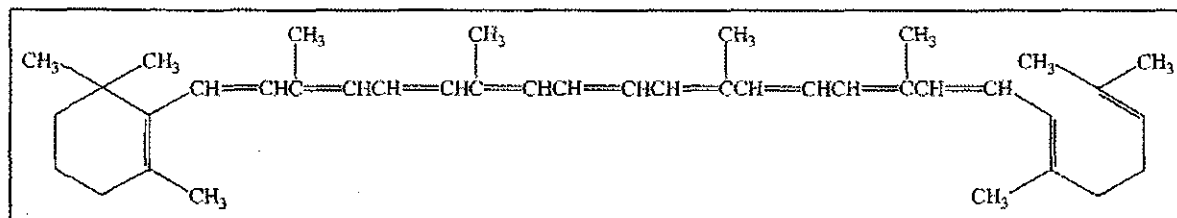
PROCES	MAŠČOBNE KISLINE		
	C 18:1	C 18:2	C 18:3
AVTOOKSIDACIJA	1	27	77
FOTOOKSIDACIJA	3E4	4E4	7E4

Reakcijski poti avtooksidacije in fotooksidacije sta različni, njuni reakcijski hitrosti sta tudi različni - in seveda dajeta tudi različne produkte. Poglejmo si vse hidroperoksidi, ki nastanejo po obeh reakcijskih poteh iz oleinske kisline C 18:1 (*cis*-9). Reakcija avtooksidacije da štiri različne hidroperoksidi, reakcija fotooksidacije pa dva (Bučar-Miklavčič *et al.*, 1995a in b). Sl. 8 in sl. 9.

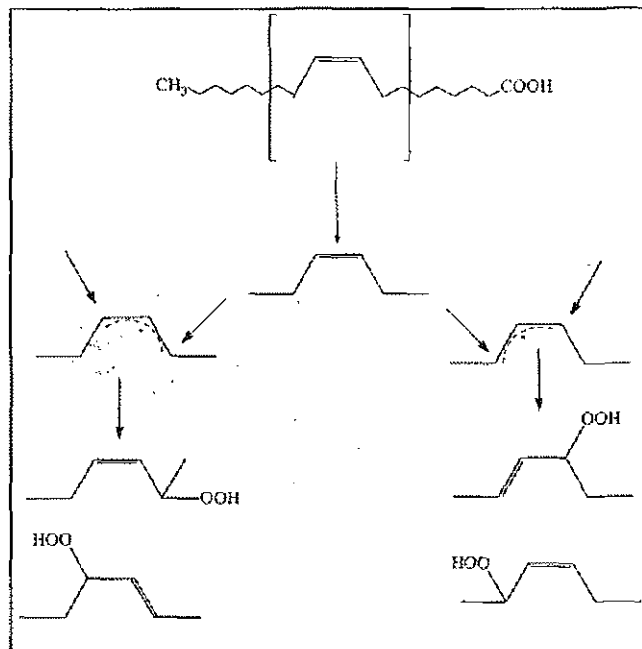
Oljčna olja vsebujejo od 5 do 300 mg/kg celokupnih tokoferolov, od tega je cca. 95% α - tokoferola in 5% β in γ - tokoferola. δ tokoferol se v oljčnih oljih pojavlja samo v sledih, in sicer v koncentracijah od 0,2 mg - 2 mg/kg (Boskou, 1996).

Zanimivo je, da večina semenskih olj vsebuje znatno višje koncentracije γ tokoferola kot pa α tokoferola (e.g. sojino olje, koruzno olje, bučno olje) - (Madhavi *et al.*, 1996). To dejstvo lahko tudi izkoristimo pri analitskem določevanju adulteracije oljčnih olj s semenskimi (Kiritsakis, 1998).

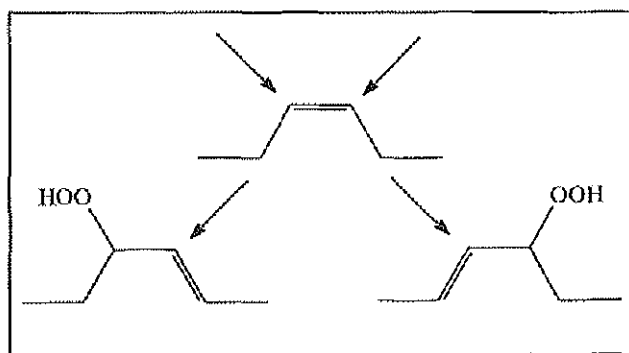
Vsebnost tokoferolov v oljčnih oljih je odvisna od sorte, klimatskih razmer v času dozorevanja, časa in načina predelave ter skladiščenja. Olja iz zgodaj obranih in predeleanih plodov imajo znatno višje vsebnosti tokoferolov. Kakovostna olja vsebujejo od 100-300 mg/kg tokoferolov (Cimato *et al.*, 1992), medtem ko imajo olja z visoko vsebnostjo prostih maščobnih kislin nizko vsebnost tokoferolov (Bučar-Miklavčič *et al.*, 1995b).



Sl. 7: β -karoten.
Fig. 7: β -carotene.



Sl. 8: Produkti avtooksidacije oleinske kisline.
Fig. 8: The products of the autooxidation of oleic acid.



Sl. 9: Produkti fotooksidacije oleinske kisline.
Fig. 9: The products of the photooxygenation of oleic acid.

MATERIAL IN METODE

Material

Oljčna olja

Prvi del raziskave smo opravili na 24 vzorcih OO letnika 1995, določitev november 1996; na 27 vzorcih OO letnika 1996, določitev maj 1997 ter na 30 vzorcih OO letnika 1997, določitev maj 1998. Vsa OO so bila do analize skladiščena v temi, v neprodušno zaprtih temnih steklenicah brez zračne atmosfere nad oljem, pri temperaturi 15°C.

Pri drugem delu raziskave pa smo na populaciji 5

vzorcev OO letnika 1995 določili koncentracijo tokoferolov takoj po predelavi (december 1995) in pa po 6 mesecih namerno izbranega neustreznega skladiščenja (prozorne steklenice, neposredna svetloba, sobna temperatura). Izbrani vzorci so bili naslednji: MEŠANICA NOV. 95 (mešanica OO, ki so bila predelana novembra 1995), VISOKO KŠ (mešanica OO z visoko vsebnostjo prostih maščobnih kislin takoj po predelavi), MEŠANICA DEC. 95 (mešanica OO, ki so bila predelana decembra 1995), MEŠANICA SLANICA (mešanica OO, ki so bila predelana iz plodov, ki so bili pred predelavo hranjeni v slanici) ter OO IB (vzorec OO sorte istrska belica).

Standardi

Pri karakterizaciji in določevanju koncentracije tokoferolov smo uporabili standarde prizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija). Pripravili smo umeritveno mešanico naslednjih koncentracij:

tokoferol	koncentracija (ng/μL)
α - tokoferol	5,1
β - tokoferol	6,1
γ - tokoferol	6,0
δ - tokoferol	5,5

Koncentracijo pripravljenih standardov smo preverili po A.O.C.S. metodi Ce 8-89 (AOCS, 1990; Balz *et al.*, 1996).

Metode

Priprava vzorcev

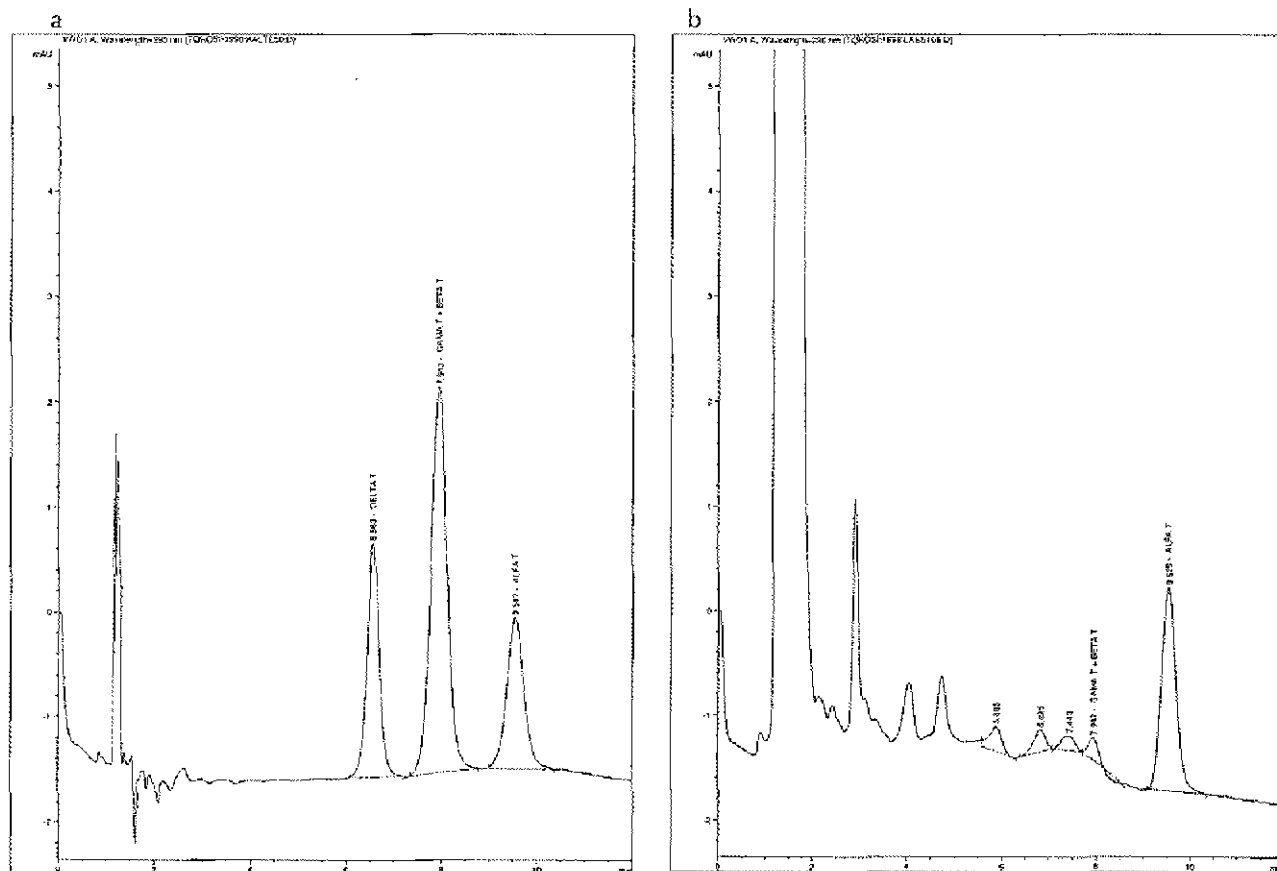
300 do 500 mg vzorca OO smo natehtali v 4 mL vialo in dodali 3,0 mL metanola. Vialo smo dobro premešali in stresali oziroma ekstrahirali na supersonični kopeli 15 minut. Po končani ekstrakciji smo iz ločene polarne faze odpipetirali cca. 1 mL metanolne raztopine in jo prenesli v temno 2 mL vialo HPLC avtoinjektorja.

Oprema

Vsebnost tokoferolov smo določevali s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) na osnovi retenzijskih časov in koncentracije uporabljene standarda.

HPLC

Uporabljali smo sistem, opremljen z gradientno črpalko, z avtoinjektorjem in UV/VIS detektorjem, model 1050, proizvajalca Hewlett Packard. Tokoferole smo ločevali na koloni Hypersil ODS 5μm, 4.6 x 200 mm (HP). Absorbanco eluata smo merili pri 290E-9 m.



Sl. 10: HPLC kromatogram standardne mešanice tokoferolov (a) in pa vzorca OO letnika 1997 (b).
 Fig. 10: HPLC chromatogram of the standard mixture of tocopherols (a) and of OO sample from the 1997 crop (b).

Za ločevanje smo uporabili mobilno fazo, sestavljeno iz vode (92%) in metanola (8%). Pretok mobilne faze je bil 2 mL/min, čas analize pa 12 minut.

Vbrizg je bil 50 µL metanolnega ekstrakta. Omenjeni kromatografski sistem ne ločuje med β in γ tokoferolno izomero, a smo se vendarle odločili zanj, saj sta njuni koncentraciji v OO znatno nižji od koncentracije α-tokoferola. Pri umeritvi smo upoštevali vsoto obeh izomer.

Na sl. 10 sta HPLC kromatograma standardne mešanice in pa vzorca OO letnika 1997.

REZULTATI

Rezultati določitev vsebnosti skupnih tokoferolov za OO letnikov 1995, 1996 in 1997 so zbrani v tab. 2 (v mg skupnih tokoferolov/100 g OO).

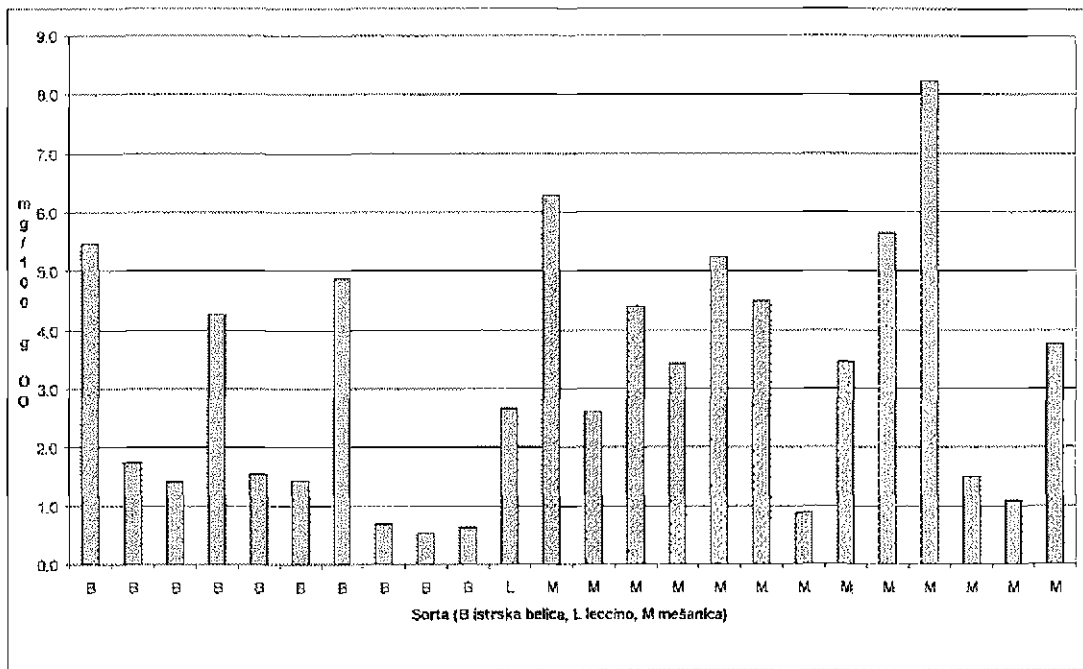
V drugem nizu eksperimentalnih podatkov pa so prikazane vrednosti za vsebnost skupnih tokoferolov v izbranih vzorcih OO letnika 1995, pri katerih smo raziskovali vpliv staranja v razmerah neustreznega skladiščenja na količino skupnih tokoferolov.

Rezultate si oglejmo v tab. 3.

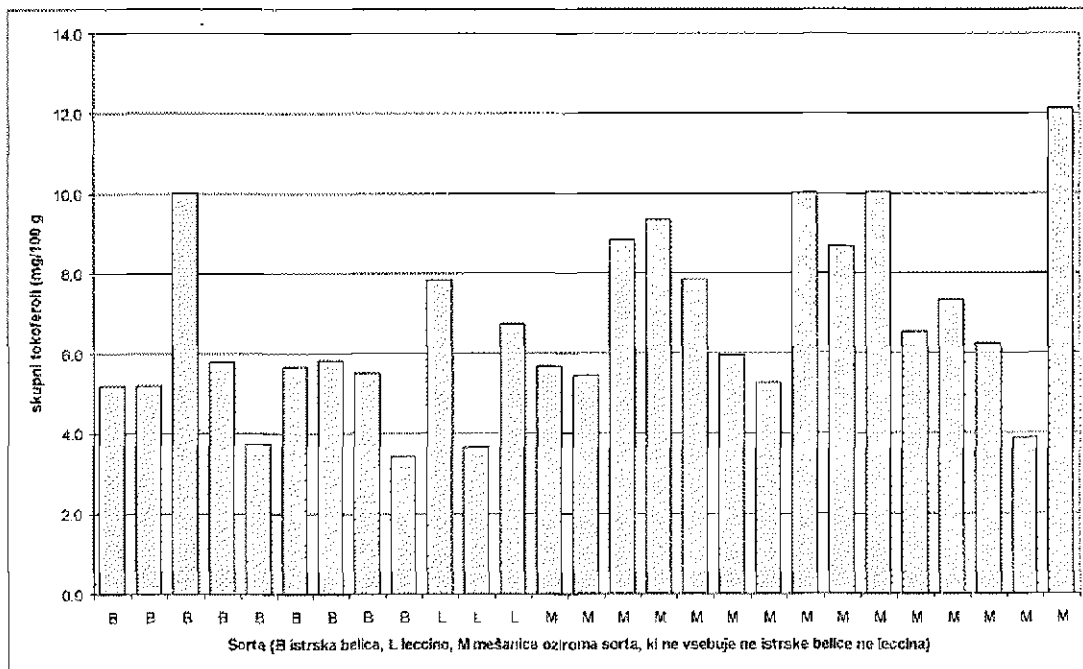
Tab. 2: Dobljeni rezultati za ST v vzorcih OO letnikov 1995, 1996 in 1997.
 Tab. 2: Results of determination of ST in OO samples from the 1995, 1996 and 1997 crops.

LETNIK	ŠTEVILO VZORCEV	POVPREČJE	STANDARDNI ODKLON	MEDIANA	MIN	MAX
1995	24	3,18	2,11	3,05	0,53	8,22
1996	27	6,73	2,26	5,95	3,43	12,13
1997	30	4,09	2,67	3,07	1,35	14,38

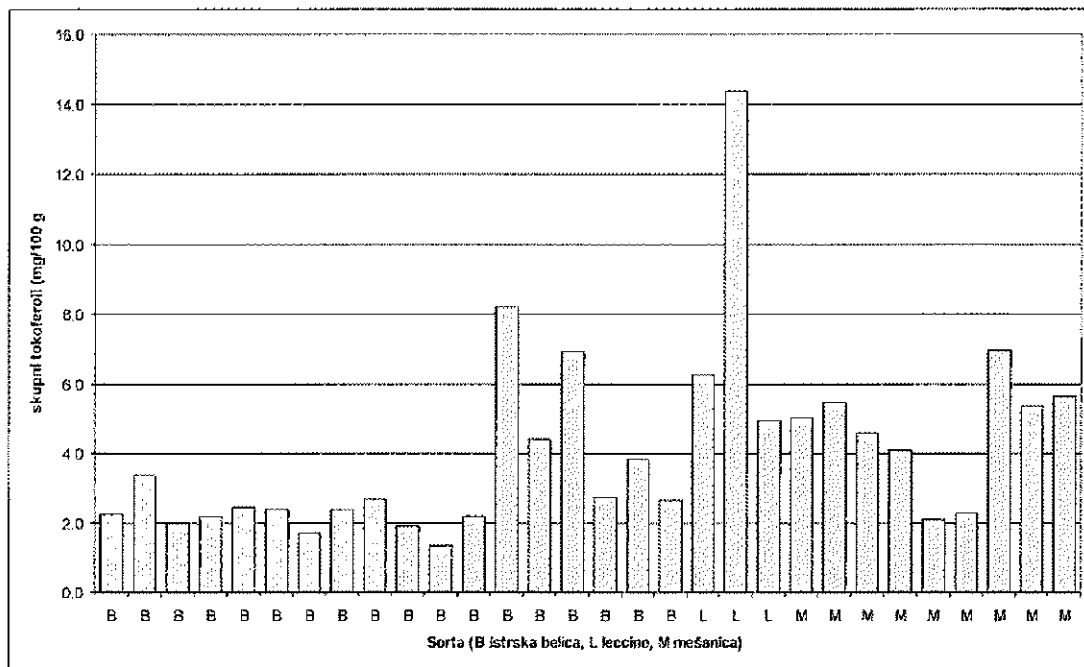
Sl. 11, 12 in 13 pa prikazujejo vsebnosti skupnih tokoferolov v vzorcih OO letnikov 1995, 1996 in 1997.



Sl. 11: Grafična ponazoritev vsebnosti skupnih tokoferolov za OO letnika 1995, določitev november 96.
 Fig. 11: Graphical representation for the total tocopherols content in OO from the 1995 crop, analyzed in November 1996.

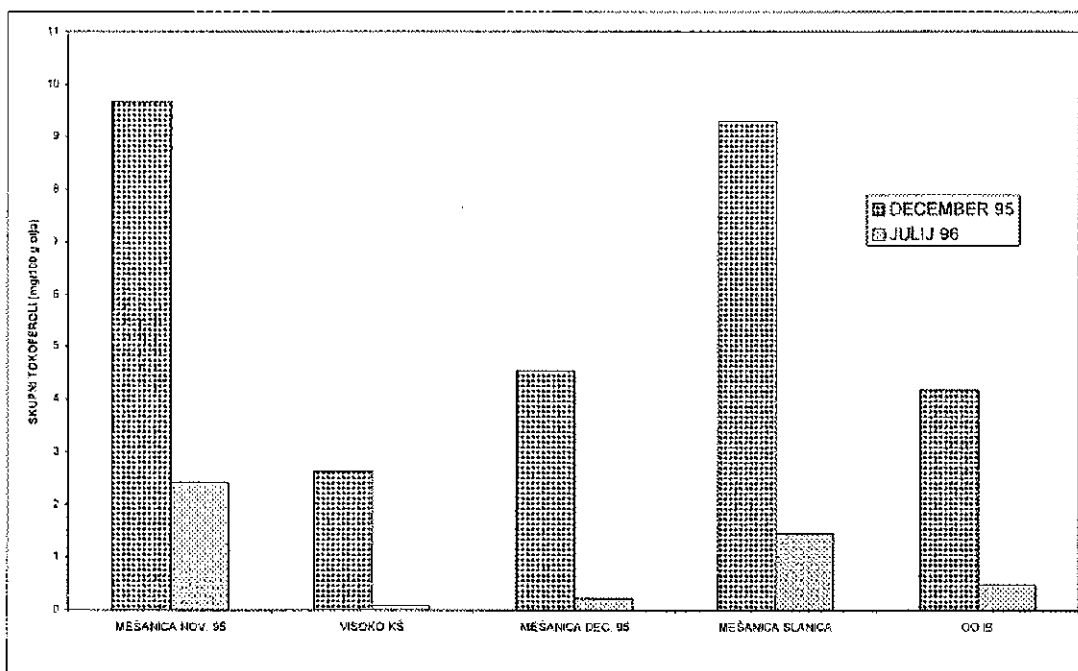


Sl. 12: Grafična ponazoritev vsebnosti skupnih tokoferolov za OO letnika 1996, določitev maj 97.
 Fig. 12: Graphical representation for the total tocopherols content in OO from the 1996 crop, analyzed in May 97.



Sl. 13: Grafična ponazoritev vsebnosti skupnih tokoferolov za OO letnika 1997, določitev maj/junij 98.
 Fig. 13: Graphical representation for the total tocopherols content in OO from the 1997 crop, analyzed in May/June 98.

in na sl. 14:



Sl. 14: Primerjalni graf vsebnosti skupnih tokoferolov v vzorcih oljčnih olj, analiziranih decembra 95 in julija 96 (po 6 mesecih namerno izbranega neustreznega skladiščenja).
 Fig. 14: Comparative graph showing the content of the total tocopherols of OO samples, analyzed in December 95 and June 96 (after 6 months of deliberately chosen inadequate storage).

Tab. 3: Vsebnosti ST v vzorcih OO pred začetkom in po 6 mesecih neustreznega skladiščenja (rezultati so v mg skupnih tokoferolov na 100 g OO).

Tab. 3: The total tocopherols content in OO before and after 6 months of inadequate storage (results are in mg total tocopherols per 100 g of OO).

VZOREC	DOLOČITEV DEC. 95	DOLOČITEV JUL. 96
MEŠANICA NOV. 95	9.66	2.41
VISOKO KŠ	2.64	0.09
MEŠANICA DEC. 95	4.54	0.23
MEŠANICA SLANICA	9.30	1.44
OO IB	4.20	0.50

ZAKLJUČEK

Vsebnost skupnih tokoferolov v OO letnikov 1995, 1996 in 1997:

Primerjalni rezultati analiz vsebnosti skupnih tokoferolov v OO vseh treh letnikov kažejo na precejšnjo usklajenost vsebnosti tokoferolov. Povprečne vrednosti za letnike 1995, 1996 in 1997 so $3,18 \pm 2,11$ mg/100 g OO; $6,73 \pm 2,26$ mg/100 g OO in $4,09 \pm 2,67$ mg/100 g OO. Standardni odkloni so za vse tri letnike izenačeni, kar kaže na precej dober izbor vzorcev OO za analizo, na primerljive klimatske in pridelovalne dejavnike znotraj posameznega letnika. V primerjavi s prejšnjimi letniki OO slovenske Istre so vsebnosti skupnih tokoferolov omenjenih letnikov 95, 96 in 97 znatno nižje, saj so bile te vrednosti pri letniku 1993 med 12 in 14 mg/100 g olja (Bučar-Miklavčič *et al.*, 1994). Ta podatek verjetno bolj kot na kemijske spremembe v času skladiščenja kaže na nizko vsebnost skupnih tokoferolov v plodovih samih oziroma v sveže predelanem olju (verjetno klimatski dejavniki med samo rastjo - količina padavin, temperatura).

Staranje izbranih OO letnika 1995 v neustreznih razmerah skladiščenja:

Omenili smo, da smo kontrolne vzorce šest mesecev skladiščili na svetlobi pri sobni temperaturi v prozorni embalaži. Takšno skladiščenje je bilo seveda namerno

izbrano, saj smo z njim hoteli ugotoviti, do katere največje mere se še zmanjša vsebnost tokoferolov. Ta vrednost je posredno merilo za rok trajanja olja. Ugotovili smo, da je v treh vzorcih od petih vsebnost skupnih tokoferolov padla pod 1 mg/100 g. Literatura navaja, da mora biti vsebnost skupnih tokoferolov, ki naj zagotovi minimalno antioksidativno stabilnost oljčnih olj, vsaj 6 mg/100 g olja (Cimato *et al.*, 1997). Seveda pa ta podatek ne upošteva morebitnih sinergizmov med vsebnostjo skupnih tokoferolov in skupnih polifenolov (Brighenti *et al.*, 1999). Iz vsebnosti skupnih tokoferolov v vzorcih po šestih mesecih neustreznega skladiščenja sledi, da neustrezno skladiščenje znatno zdesetka količino skupnih tokoferolov, kar posledično seveda pomeni, da taka olja niso več antioksidativno varna in se zato hitro pokvarijo. Še posebno nizka je bila vsebnost skupnih tokoferolov pri vzorcu z začetno visoko vsebnostjo prostih maščobnih kislin (>> 1%). Iz omenjenega sledi, da so vzorci, ki imajo že takoj ob predelavi visoko vsebnost prostih maščobnih kislin, še toliko manj stabilni.

ZAHVALA

Laboratoriju LABS smo hvaležni za moralno in materialno asistenco pri eksperimentalnem delu, društvu DOSI pa za koordinacijo pri zbiranju vzorcev.

TOCOPHEROLS IN OLIVE OILS FROM SLOVENE ISTRA IN THREE CONSECUTIVE YEARS

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

SUMMARY

Antioxidants are compounds that protect olive oils (OO) against ageing. Vitamin E is an antioxidant that occurs, particularly in the form of α -tocopherol, in extra virgin OO. The results of the analyses of the total tocopherol (ST) content in OO from Slovene Istra (crops 1995, 1996 and 1997) are the following: 3.18 mg/100 g; 6.73 mg/100 g in 4.09 mg/100 g. In the OO samples crop 1995, in which the impact of inadequate storage on the ST content was studied, their content fell below 1 mg/100 g.

Key words: antioxidants, hydroxytyrosol, olive oil, polyphenols, tyrosol

VIRI IN LITERATURA

- A.O.C.S. Official Method Ce 8-89, 1990.** Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Vegetable Oils and Fats by HPLC.
- Balz, M., Schulte, E., Thier, H-P. 1996.** A new parameter for checking the suitability of α -tocopherol standards. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 202, 80-81.
- Boskou, D. 1996.** Olive Oil - Chemistry and Technology. Champaign, Illinois. AOCS Press.
- Brighenti, F., Cammarata, T., Pellegrini, N. 1999.** Direct evaluation of antioxidant activity of extra-virgin olive oil. *Proceedings of the Euro Food Chem X, Volume 2,* 464-470.
- Bučar-Miklavčič, M., Butinar, B., Čalija, D. 1994.** Tokoferoli oljčnih olj Slovenske Istre letnika 1993, neobjavljen tipkopolis.
- Bučar-Miklavčič, M., Butinar, B., Čalija, D., Koren, F., Jančar, M., Joksić, M. 1995a.** Nekateri značilnosti izbranih oljčnih olj slovenske Istre letnik 94. Koper. Znanstveno raziskovalno središče republike Slovenije.
- Bučar-Miklavčič, M., Butinar, B., Čalija, D. 1995b.** Tokoferoli oljčnih olj slovenske Istre letnikov 1992-1994, neobjavljen tipkopolis.
- Cimato, A., Modi, G., Alessandri, S., Mattei, A. 1992.** Caratteristiche e peculiarità dell'olio extra vergine di oliva prodotto in Toscana. *L'Informatore Agrario*, XLVIII, 18, 55-75.
- Cimato, A., Baldini, A., Moretti, R. 1997.** L'olio do oliva. Firenze. Arsia.
- Cuppett, S., Schnepf, M., Hall, C.H. 1997.** V: Shahidi, F. (ed.): Natural antioxidants. Champaign, Illinois. AOCS Press.
- Deshpande, S. S., Deshpande, U. S., Salunkhe, D. K. 1996.** V: Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K. (Eds.): Food antioxidants. New York, New York. Marcel Dekker, Inc.
- Gunstone, F. D. 1984.** Reaction of oxygen and unsaturated fatty acids. *JAOCs*, 61, 2, 441-453.
- Kiritsakis, K. A. 1998.** Olive Oil - From the tree to the table. Trumbull, Connecticut. Food & Nutrition Press, Inc.
- Madhavi, D. L., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R. 1996.** V: Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K. (Eds.): Food antioxidants. New York, New York. Marcel Dekker, Inc.
- Shukla, V.K.S., Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F. 1997.** V: Shahidi, F. (ed.): Natural antioxidants. Champaign, Illinois. AOCS Press.
- White, P. J., Xing, Y. 1997.** V: Shahidi, F. (ed.): Natural antioxidants. Champaign, Illinois. AOCS Press.