

KAROTENOIDI V OLJČNEM OLJU

*Erika BEŠTER*LABS d.o.o., Inštitut za ekologijo, oljčno olje in kontrolo, SI-6310 Izola, Zelena ulica 8
E-mail: erika.bester@zrs.upr.si*Milena BUČAR-MIKLAVČIČ*LABS d.o.o., Inštitut za ekologijo, oljčno olje in kontrolo, SI-6310 Izola, Zelena ulica 8
in

Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper, SI-6000 Koper, Garibaldijeva 1

Bojan BUTINAR

Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper, SI-6000 Koper, Garibaldijeva 1

*Vasilij VALENČIČ*LABS d.o.o., Inštitut za ekologijo, oljčno olje in kontrolo, SI-6310 Izola, Zelena ulica 8
in

Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper, SI-6000 Koper, Garibaldijeva 1

IZVLEČEK

Pigmenti v deviškem oljčnem olju izvirajo izključno iz oljk ali pa nastanejo med ekstrakcijo in shranjevanjem olja. Na podlagi sestave pigmentov lahko sklepamo na morebitne potvorbe olja in razlikujemo med olji različnih sort. Karotenoide v oljčnih oljih lahko določamo s spektroskopskimi in kromatografskimi metodami. Karotenoidi so učinkoviti antioksidanti, ki pa lahko v določenih razmerah delujejo tudi kot prooksidanti. So učinkoviti dušilci singletnega kisika, delujejo kot svetlobni filter in odstranjujejo proste radikale. Nekateri karotenoidi so provitamini A, morda pa imajo tudi preventivni učinek pri kardiovaskularnih in rakastih obolenjih.

Ključne besede: oljčno olje, karotenoidi, antioksidanti

CAROTENOIDI NELL'OLIO D'OLIVA

SINTESI

I pigmenti nell'olio vergine d'oliva originano esclusivamente dalle olive o vengono a formarsi durante l'estrazione e la conservazione dell'olio. In base alla composizione dei pigmenti si può risalire ad eventuali contraffazioni dell'olio e distinguere fra olii di diversi cultivar. I carotenoidi nell'olio d'oliva vengono determinati con metodi spettroscopici e cromatografici. I carotenoidi sono efficaci antiossidanti, che in condizioni particolari fungono anche da proossidanti. Sono efficaci soffocatori di ossigeno singoletto, fungono da filtro luminoso ed eliminano i radicali liberi. Alcuni carotenoidi sono provitamine A e si suppone abbiano anche un'azione preventiva su malattie cardiovascolari e tumorali.

Parole chiave: olio d'oliva, carotenoidi, antiossidanti

UVOD

Karotenoidi so intenzivno obarvane v lipidih topne spojine. Doslej je bilo izoliranih že prek 600 različnih karotenoidov (Afzal *et al.*, 2004; El-Agamey *et al.*, 2004). Naravne karotenoide so našli v fotosintetskih in nefotosintetskih organizmih: v rastlinah, algah, glivah, bakterijah in živalih (Su *et al.*, 2002). V človeku so jih doslej našli le nekaj (približno 19). To so predvsem karotenoidi, ki jih zaužijemo s hrano, in njihovi metaboliti (ogljikovodiki: likopen, α -karoten in β -karoten ter ksantofili: lutein, astaksantin, kantaksantin, zeaksantin, kriptoksantin) (Su *et al.*, 2002; El-Agamey *et al.*, 2004). Živalska tkiva ne morejo sintetizirati klorofilov in karotenoidov, lahko pa jih živalske celice modificirajo in asimilirajo (Giuffrida *et al.*, 2007).

Karotenoide delimo na karotene, ki so ogljikovodiki, in ksantofile, ki imajo na enem ali obeh koncih molekule hidroksilno in/ali karbonilno skupino. Polienska struktura in druge strukturne lastnosti definirajo lastnosti spojin (npr. redoks potencial) pa tudi lokacijo in orientacijo karotenoidov v lipidnem dvosloju v bioloških okoljih. Karotenoidi v dvosloju lahko spremenijo fluidnost in prepustnost membrane (El-Agamey *et al.*, 2004; Scotter & Castle, 2004).

Eden najpomembnejših karotenoidov v prehrani je β -karoten. Dokazano je bilo, da sodeluje pri imunskem delovanju in varuje celice pred mutacijami in nenormalno rastjo (Afzal, 2004). V naravi se β -karoten lahko pojavlja kot zmes različnih izomerov (*trans*, *7-cis*, *9-cis*, *11-cis*, *13-cis*, *15-cis*, *di-cis*). *Cis*-izomeri β -karotena imajo precej nižjo aktivnost provitamina A kot *trans*-izomer, ne vemo pa še, kako izomerizacija vpliva na antioksidacijsko sposobnost in sposobnost za dušenje singletnega kisika. S stališča prehrane je torej pomembno določiti količino *trans*-izomera β -karotena (Luterotti *et al.*, 2002).

Lutein je derivat α -karotena z dvema različnima iononskima obročema: β - in ϵ -obroč (Subagio & Morita, 2003).

Biološki pomen karotenoidov

V telesu se nekateri karotenoidi – provitaminski A lahko pretvorijo v vitamin A. Najbolj aktiven provitamin A je β -karoten. Približno polovico vitamina A zaužijemo s hrano živalskega izvora, drugo polovico pa s sadjem in zelenjavo pretežno v obliki provitamina A, zlasti β -karotena (Insel *et al.*, 2004).

Splošno znano je, da je vitamin A pomemben za zdrav vid, povprečnemu človeku pa so manj znane njegove druge funkcije: ima pomemben vpliv na rast, imunski sistem, medcelično komunikacijo in celično diferenciacijo, ohranja zdrave kosti, kožo in membrane sluznic (Su *et al.*, 2002; Insel *et al.*, 2004).

Številne študije o vplivu karotenoidov na potek raz-

ličnih bolezni dajejo nasprotujoče si rezultate (Su *et al.*, 2002; Giuffrida *et al.*, 2007). Tako še vedno ni jasno, ali in v katerih okoliščinah karotenoidi ščitijo pred kardiovaskularnimi boleznimi in nekaterimi vrstami raka. Poročajo celo, da lahko uživanje β -karotena pri kadilcih poveča tveganje za pljučnega raka (Su *et al.*, 2002; El-Agamey *et al.*, 2004).

Karotenoidi so lahko močni antioksidanti ali prooksidanti. Njihov antioksidacijski potencial *in vivo* je še precejšnja neznanka.

METODE DOLOČEVANJA

Spektroskopske metode

Spektroskopske metode so hitre, preproste in poceni metode za določevanje pigmentov v oljčnem olju. Spektektr ektrakta karotenoidnih pigmentov iz oljčnega olja ima obliko prevladujočega karotenoida luteina, z dvema absorpcijskima maksimumoma med 400 in 500 nm. Za določevanje karotenoidov so izbrali valovno dolžino drugega luteinovega maksimuma (472 nm), saj pri tej valovni dolžini ni interferenc prevladujočega klorofilnega pigmenta feofitina a. Količino karotenoidov izračunamo s pomočjo ekstinkcijskega koeficienta (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1991). Lahko pa absorbanco merimo pri 449 nm in karotenoide kvantificiramo s pomočjo umeritvene krivulje, pripravljene z β -karotenom (Caponio *et al.*, 2005; Giuffrida *et al.*, 2007).

Kromatografske metode

Starejše kromatografske metode temeljijo na kolonski ali tankoplastni kromatografiji. Te metode imajo več pomanjkljivosti. Potrebujemo veliko vzorca, metode so dolgotrajne, ločljivost je slaba, karotenoide pa je težko kvantitativno odstraniti s kromatografske plošče. Pigmente je treba pred kromatografijo ekstrahirati iz olja. Karotenoide lahko identificiramo na podlagi adsorpcijskih lastnosti pri tankoplastni kromatografiji pred umiljenjem in po njem, absorpcijskih spektrov v vidnem območju, absorpcijskih trakov v IR, obstoj funkcionalnih skupin pa potrdimo s fizikalno-kemijskimi metodami. Kvantifikacijo opravimo spektroskopsko (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1990).

Uvedba HPLC-metod je prinesla številne prednosti. Metode so preproste, hitre, poceni (to je sicer odvisno od detekcije), občutljivost, specifičnost in preciznost so dobre (Su *et al.*, 2002). Uporaba HPLC-metod omogoča istočasno določitev klorofilov in karotenoidov, metode so uporabne za vse tipe rastlinskih olj (Gandul-Rojas *et al.*, 2000). Nekatero HPLC-metode omogočajo istočasno določanje pigmentov in tokoferolov (Psomiadou & Tsimudou, 1998).

V uporabi so nekatere HPLC-metode z normalno fazo (Psomiadou & Tsimudou, 1998). Uporaba reverzne

faze pa prinaša določene prednosti, kot je boljša stabilnost kolone, ponovljivost retencijskih časov in hitrejšo uravnoteženje sistema (Gimeno *et al.*, 2000). Večinoma se uporabljajo C18-kolone (Roca *et al.*, 2003; Luaces *et al.*, 2005). Uporaba bolj hidrofobne C30-stacionarne faze namesto običajne C18-faze omogoča boljše ločevanje hidrofobnih spojin, kot so karotenoidi in klorofili, saj omogoča tudi ločevanje izomerov (Su *et al.*, 2002; Giuffrida *et al.*, 2007).

Detektor UV-VIS za mnoge rutinske namene zagotavlja dovolj dobro občutljivost. Z uporabo detektorja z nizom diod (DAD) lahko istočasno spremljamo tudi spektroskopske podatke, ki so nam v pomoč pri določevanju čistosti pika, včasih pa tudi pri identifikaciji neznanih spojin. Detekcija s spektrometrijo s termičnimi lečami je zelo občutljiva laserska fototermična detekcijska metoda, ki doseže mejo detekcije reda velikosti 100 pg/mL (Su *et al.*, 2002) in omogoča tudi ločevanje *trans*- in *cis*- β -karotenov (Luterotti *et al.*, 2002).

Pred analizo karotenoidov in tokoferolov pogosto opravimo umiljenje vzorca, da odstranimo triacilglicerole in klorofile. Po umiljenju naj bi imele HPLC-metode boljše specifičnost kot kolorimetrične in fluorimetrične metode (Gimeno *et al.*, 2000).

Zaradi dolge verige konjugiranih dvojnih vezi so karotenoidi zelo reaktivni – nestabilni. Da bi se izognili nezaželenim reakcijam karotenoidov, analize opravljamo v temi ali pri zeleni svetlobi (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1990; Gandul-Rojas *et al.*, 2000), s temno steklovinjo (Gimeno *et al.*, 2000), za zaščito karotenoidov dodamo antioksidante (Gimeno *et al.*, 2000). Čeprav bi bilo zaradi reaktivnosti karotenoidov bolje delati pri nižji temperaturi (Su *et al.*, 2002), pa včasih kromatografijo opravimo pri povišani temperaturi: 30 °C (Luaces *et al.*, 2005) ali celo 45 °C (Gimeno *et al.*, 2000).

KAROTENOIDI V OLJKAH

Deviško oljčno olje vsebuje le pigmente, ki obstajajo v oljkah, in njihove derivate, ki nastanejo med predelavo oljk in kasneje med skladiščenjem olja. Zato je za sestavo pigmentov v olju odločilna sestava pigmentov v oljkah.

Karotenoidi so v vseh fotosintetskih tkivih povezani s klorofilnimi pigmenti (Psomiadou & Tsimidou, 2001). Kloroplaste s klorofilnimi in karotenoidnimi pigmenti najdemo pretežno v epikarpu, v manjši količini pa tudi v mezokarpu (Roca & Mínguez-Mosquera, 2001). V oljkah ne najdemo tistih derivatov pigmentov, ki so povezani s kislim medijem med pridobivanjem olja (feoforbidi, feofitini, 5,8-furanoid karotenoida mutatoksanin in luteoksanin) (Gandul-Rojas *et al.*, 1999).

Vpliv zrelosti plodov

Sestava pigmentov v oljkah se med dozorevanjem

precej spreminja, zato na pigmente v oljčnem olju močno vpliva stopnja zrelosti plodov, iz katerih je bilo olje pridobljeno.

Količina klorofilnih pigmentov se med dozorevanjem zmanjšuje, nekoliko počasneje pa se razgrajujejo tudi karotenoidi. Kasneje se začnejo tvoriti fenolni pigmenti antocianini, ki plodove postopno temno obarvajo (Gutiérrez *et al.*, 1999; Gandul-Rojas *et al.*, 2000). Tudi zreli plodovi, ki jim barvo dajejo antocianini, še vedno vsebujejo karotenoide in klorofile. Hitrost razpadanja karotenoidov ni konstantna (Roca & Mínguez-Mosquera, 2001).

Vpliv sorte

Med posameznimi sortami obstajajo statistično značilne razlike v vsebnosti posameznih pigmentov (Roca & Mínguez-Mosquera, 2001). Nekatere sorte imajo veliko pigmentov (Hojiblanca, Picual), druge pa malo (Arbequina, Blanqueta, Cornicabra) (Gandul-Rojas *et al.*, 2000; Roca & Mínguez-Mosquera, 2001).

V oljkah se kljub visoki vsebnosti maščob v plodovih ksantofili ne zaestrijo, kar kaže na to, da se kloroplasti med dozorevanjem plodov ne pretvarjajo v kromoplaste. Izjema so oljke sorte Arbequina, saj so v njih v nasprotju z drugimi sortami našli fitofluen, zaestrene ksantofile ter α -karoten in ξ -karoten (Gandul-Rojas *et al.*, 1999).

Španska sorta oljk Arbequina je izjemna glede sestave in dinamike pigmentov. V zgodnji fazi dozorevanja v njej poteka sinteza estrov ksantofilov, ki jih v drugih španskih sortah niso identificirali. Da gre res za sintezo karotenoidov, potrjuje tudi obstoj prekursorjev karotenoidov, kot sta fitofluen in ξ -karoten (Gandul-Rojas *et al.*, 1999). Tudi Roca in Mínguez-Mosquera (2001) sta identificirala estra violaksantina in neoksanina v oljkah Arbequina, v štirih drugih španskih sortah pa ne.

Spremembe sestave pigmentov v oljkah med skladiščenjem

V regijah, ki so velike pridelovalke oljk, so kapacitete oljarn premajhne, da bi lahko sproti predelali vse oljke, zato obrani plodovi včasih v velikih kupih čakajo na predelavo več tednov. Pod vplivom delovanja lipoksinogenaz se razgradijo predvsem klorofilni pigmenti, v manjši meri pa tudi karotenoidi. Omenjeni procesi prvi teden potekajo hitro, kasneje pa se upočasnijo (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1990).

Posamezni karotenoidi

V španskih sortah oljk v karotenoidni frakciji pigmentov prevladuje lutein, ki vedno sestavlja več kot 50% vseh karotenoidov. Med dozorevanjem se koncentracija luteina zmanjšuje, njegov delež pa se povečuje (Roca in Mínguez-Mosquera, 2001).

Drugi najpomembnejši karotenoid je β -karoten, ki je edini izmed oljčnih karotenoidov provitamin A. Med dozorevanjem sta se zmanjševala tako njegova koncentracija kot delež v karotenoidni frakciji pigmentov (Roca & Mínguez-Mosquera, 2001).

Skupna količina vseh minornih ksantofilov je v močno obarvanih sortah oljk enaka ali celo večja kot količina β -karotena (Roca & Mínguez-Mosquera, 2001). Doslej so v španskih sortah oljk identificirali anteraksantin, neoksantin, violaksantin, β -kriptoksantin in lutein epoksid. V Arbequini so našli tudi α -karoten in ξ -karoten, fitofluen ter estre ksantofilov anteraksantina, neoksantina in violaksantina (Gandul-Rojas *et al.*, 1999; Roca in Mínguez-Mosquera, 2001).

KAROTENOIDI V OLJU

Barva olja izvira izključno iz barvil, ki izhajajo iz oljk. Olje je rumeno zelene barve, pri čemer je zeleni odtonek odvisen od sorte in zrelosti plodov (Gandul-Rojas *et al.*, 2000). Spekter olja UV-VIS ima širok pas v območju 375–525 nm (maksimumi pri 410, 450 in 470 nm). Pri 670 nm ima olje še en ožji maksimum (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1991).

Deviška oljna olja vsebujejo le pigmente, ki so obstajali že v plodovih, in njihove derivate, ki nastanejo med predelavo oljk v olje (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2005; Giuffrida *et al.*, 2007). Obstoj drugih karotenoidov ali drugačne vsebnosti derivatov klorofilov, kot izhajajo iz ekstrakcijskega procesa, kažejo bodisi na potvorbo oljčnega olja bodisi na neustrezen ekstrakcijski proces (Gandul-Rojas *et al.*, 2000; Roca *et al.*, 2003).

Količina vseh karotenoidov v oljčnem olju je od nič do nekaj mg/kg (Psomiadou & Tsimidou, 2001) ali celo do 100 mg/kg (Cichelli & Pertesana, 2004). Ker plod vsebuje 20–30% maščobe, pigmenti pa so topni v njej, bi pričakovali, da bodo koncentracije pigmentov v olju 3- do 5-krat višje kot v oljkah, vendar ni tako, saj med ekstrakcijo olja izgubimo ~80 % klorofilnih pigmentov in ~40 % karotenoidov. Izguba pigmentov je povezana s kooksidacijo z lipoksigenazno oksidacijo nenasičenih maščobnih kislin. Produkti oksidacije so brezbarvni (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1990).

Grška olja so v primerjavi s španskimi in italijanskimi bolj zelene barve, kar se kaže tudi v razmerju med skupnimi klorofilnimi pigmenti in skupnimi karotenoidi (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1991), ki je v grških oljih 2 do 11 (Psomiadou & Tsimidou, 2001), v sicilskih (Giuffrida *et al.*, 2007) in španskih (Gandul-Rojas *et al.*, 2000; Roca *et al.*, 2003) oljčnih oljih pa je približno ena.

V karotenoidni frakciji pigmentov v oljčnem olju prevladujeta β -karoten in lutein, našli pa so tudi manjše količine drugih karotenov in ksantofilov (Psomiadou & Tsimidou, 2001). Količina luteina v španskih oljčnih oljih je približno dvakrat večja kot skupna količina minornih karotenoidov (Gandul-Rojas *et al.*, 2000; Roca *et*

al., 2003). Količina luteina in β -karotena v grških oljih je manjša kot v španskih. To lahko pojasnimo s sortnimi razlikami, delno pa tudi s povsem drugačnim analitskim postopkom (Psomiadou & Tsimidou, 2001).

Med ekstrakcijo olja se sprostijo endogene kisline, ki katalizirajo izomerizacijo ksantofilov s 5,6-epoksidnimi skupinami v ksantofile s 5,8-epoksidnimi (furanoidnimi) skupinami. Violaksantin se izomerizira v luteoksantin in auroksantin, anteraksantin v mutatoxantin, neoksantin pa v neokrom (Mínguez-Mosquera & Gandul-Rojas, 1994; Psomiadou & Tsimidou, 2001; Roca *et al.*, 2003; Gallardo-Guerrero *et al.*, 2005; Giuffrida *et al.*, 2007).

Pri ekstrakciji olja nastanejo tudi *cis*-izomeri (*cis*- β -karoten, *cis*-lutein, *cis*-violaksantin), ki nimajo enake vitaminske aktivnosti kot *trans*-izomeri. To dejstvo je pomembno za določitev vnosa teh mikrohranil s hrano (Luterotti *et al.*, 2002; Giuffrida *et al.*, 2007).

V oljih španske sorte Arbequina in v sicilskih oljih so identificirali tudi estre ksantofilov (ester luteina, β -kriptoksantin in njegov ester, ester neoksantina) (Roca *et al.*, 2003; Giuffrida *et al.*, 2007).

Vpliv sorte

Različna sestava pigmentov v oljkah različnih sort se seveda zrcali tudi v sestavi pigmentov v oljčnem olju. Na podlagi podatkov o vsebnosti pigmentov lahko razlikujemo med sortami oljk (Cichelli & Pertesana, 2004). Med posameznimi sortami lahko ločujemo na podlagi podatkov o skupni vsebnosti pigmentov ter količinah luteina, violaksantina, luteoksantina in auroksantina (Gandul-Rojas *et al.*, 2000; Roca *et al.*, 2003). Med španskimi sortami oljk se po mnogih parametrih, predvsem po obstoju ksantofilnih estrov, razlikuje Arbequina (Gandul-Rojas *et al.*, 2000; Gallardo-Guerrero *et al.*, 2005).

Vpliv zrelosti

Zmanjševanje količine pigmentov v oljkah med dozorevanjem se seveda kaže tudi v sestavi pigmentov v olju (Gutiérrez *et al.*, 1999; Gandul-Rojas *et al.*, 2000). Pri nekaterih sortah (Leccino) se količina pigmentov med dozorevanjem oljk bistveno ne spreminja, medtem ko se pri večini sort zmanjšuje. Karotenoidi se razgrajujejo počasneje kot klorofilni pigmenti (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1991; Gandul-Rojas *et al.*, 2000).

Vpliv tehnologije

Olja, pridelana v laboratorijskih oljarnah, lahko vsebujejo več pigmentov kot olja iz industrijskih obratov (Salvador *et al.*, 2001). Vsebnost pigmentov je večja v oljih, pridelanih v kontinuirnih oljarnah, kot v oljih iz klasičnih oljarn s stiskalnicami (Cichelli & Pertesana, 2004; Giuffrida *et al.*, 2007). V oljih, pridelanih v

dvofaznem in v trofaznem sistemu, je količina β -karotena enaka, imajo pa olja iz dvofaznega sistema več biofenolov in so zato prehransko bogatejša (Gimeno *et al.*, 2002).

Nenehno stremenje k izboljšanju kakovosti oljčnega olja spodbuja iskanje novih tehnologij. Ena novejših tehnologij je segrevanje oljk po obiranju (García *et al.*, 2001; Luaces *et al.*, 2005). Olje iz termično obdelanih oljk je manj grenko, segrevanje pa lahko vpliva tudi na količino pigmentov v olju. Količina karotenoidov in klorofilnih pigmentov se pri 24-urnem segrevanju na 40 °C približno podvoji in z nadaljnjim dvigovanjem temperature še narašča. Pri daljših časih segrevanja se količina pigmentov v olju zmanjša; po 72 urah je že manjša kot v olju iz oljk, ki niso bile termično obdelane (García *et al.*, 2001). Nasprotno pa kratkotrajno segrevanje oljk v vodni kopeli pred stiskanjem ne vpliva na vsebnost pigmentov (Luaces *et al.*, 2005).

Na vsebnost pigmentov vpliva tudi temperatura med ekstrakcijskim postopkom. Pri višji temperaturi predelave je aktivnost lipoksigenez manjša, zato je vsebnost pigmentov v olju večja (Luaces *et al.*, 2005).

Spremembe pigmentov med shranjevanjem olja

Več avtorjev poroča, da se količina karotenoidov v olju, hranjenem v temi, ne spreminja (Gutiérrez & Fernández, 2002; Psomiadou & Tsimidou, 2002a; Caponio *et al.*, 2005; Gallardo-Guerrero *et al.*, 2005). V nekaterih primerih pa lahko pride do izomerizacije minornih ksantofilov neoksantina, violaksantina in anteraksantina. Čeprav poteka izomerizacija ksantofilov v kislem mediju, niso opazili korelacije med vsebnostjo izomeriziranih ksantofilov ter prostimi kislinami v olju (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2005). Delno pa se karotenoidi razgradijo tudi v temi, če je v steklenici zrak. Tudi Pagliarini *et al.* (2000) so poročali, da se je absorbanca pri 475 in 448 nm, povezana s karotenoidi, v oljih, hranjenih v zaprtih steklenicah v temi pri 20 °C, zmanjševala v skladu s kinetiko psevdoprvega reda. Spremenila se je tudi barva olja.

Gutiérrez *et al.* (2002) poročajo, da je v oljih, hranjenih pri 30 °C na svetlobi, količina karotenoidov padala. Tudi Caponio *et al.* (2005) poročajo o rahlem zmanjšanju količine karotenoidov na svetlobi že pri temperaturi 15–25 °C. Psomiadou in Tsimidou (1998) po treh mesecih na 22 °C nista zaznali spremembe količine β -karotena, kar sta pripisali zaščitnemu delovanju α -tokoferola.

Razgradnja pigmentov je med poskusom pospešene staranja olja pri 60 °C vidna tudi s prostim očesom. Sprva so spremembe komaj zaznavne – barva olja postane malo manj živa. Te spremembe povezujejo z razgradnjo karotenoidov. Malo pred koncem indukcijske periode pa se olje nenadoma precej razbarva, ta pojav pa se časovno ujema s spremembo – povečanjem hi-

trosti razpadanja klorofilnih pigmentov (Hrncirik & Fritsche, 2005).

ANTIOKSIDACIJSKE LASTNOSTI

Močni antioksidanti lahko delujejo tudi kot prooksidanti, ker pri njihovi avtooksidaciji lahko nastanejo reaktivne spojine. Pomembno je, da ocenimo njihovo delovanje v bioloških sistemih. Prooksidacijski učinek lahko sproži pojav klorofila ali težkih kovin. Splošno pravilo je, da spojine pri nizkih koncentracijah delujejo kot prooksidanti, pri koncentracijah nad neko kritično vrednostjo pa kot antioksidanti. Znani pa so tudi obratni primeri (Moure *et al.*, 2001).

Karotenoidi lahko delujejo kot antioksidanti (Fakourelis *et al.*, 1987) ali prooksidanti. Na delovanje vplivajo eksperimentalne razmere in prisotnost tokoferolov. Delovanje karotenoidov v procesih oksidacije je zelo kompleksno, saj se tudi sami lahko oksidirajo (Psomiadou & Tsimidou, 2002a). Različne oksidacije, v katere so večinoma vpleteni singletni kisik $^1(O_2)$, hidroperoksidi in peroksidiradikali, so glavni vzrok za razpad karotenoidov v hrani. Pri termični razgradnji karotenoidov nastanejo hlapni aromatski ogljikovodiki in prek 70 nehlapnih snovi (Scotter & Castle, 2004). Spojine, ki nastanejo pri termični razgradnji β -karotena in likopena, ne vplivajo na fotooksidacijo olja – na svetlobi ne delujejo niti kot antioksidanti niti kot prooksidanti. Očitno njihove molekule nimajo dovolj konjugiranih dvojnih vezi za dušenje singletnega kisika (Steenenson & Min, 2000). Polienska struktura omogoča antioksidacijsko delovanje, pa tudi degradacijo spojin pod vplivom svetlobe in/ali toplote (Steenenson & Min, 2000).

V literaturi poročajo o različnih mehanizmih, s katerimi karotenoidi ščitijo oljno olje pred oksidacijo. Karotenoidi so zelo učinkoviti dušilci singletnega kisika. V določenih okoliščinah morda lahko tudi odstranjujejo proste radikale, lahko pa delujejo zgolj enostavno kot svetlobni filter. Podrobneje so posamezni mehanizmi pojasnjeni v nadaljevanju.

Dušenje singletnega kisika

Klorofili, ki se pojavljajo v oljčnem olju, so fotosenzitivne snovi in se pod vplivom svetlobe lahko vzbudijo v tripletno stanje. S prenosom energije elektrona z vzbujenega tripletnega stanja klorofila na kisik iz osnovnega tripletnega stanja kisika nastane vzbujeni singletni kisik. Tako se lahko sprožijo poškodbe DNK in peroksidacija lipidov (Edge *et al.*, 1997). Singletni kisik je 1000- do 1500-krat bolj reaktiven kot tripletni kisik, ki je vpleten v avtooksidacijske procese, zato v oljih na svetlobi fotooksidacija poteka hitreje kot avtooksidacija. V takšnih razmerah olje ščitijo predvsem antioksidanti, ki delujejo kot dušilci singletnega kisika (tokoferoli in karotenoidi), vloga antioksidantov, ki odstranjujejo pro-

ste radikale (biofenoli), pa je manj pomembna (Caponio *et al.*, 2005).

S prenosom energije elektrona s singletnega kisika na molekulo karotenoida nastane tripletno stanje karotenoida, ki odda prejeto energijo v obliki toplote in se hitro vrne nazaj v osnovno stanje. Molekule z večjim številom konjugiranih dvojnih vezi imajo nižje energije vzbujenih stanj (S_2 , S_1 , T_1) in bolj učinkovito dušijo singletni kisik (Edge *et al.*, 1997; Steenson & Min, 2000; Psomiadou & Tsimidou, 2002a).

Vsebnost β -karotena in luteina se med fotooksidacijo skoraj ne spremeni, kar potrjuje hipotezo, da antioksidacijsko delovanje karotenoidov temelji na fizikalnem procesu – hipotezo o dušenju singletnega kisika (Psomiadou & Tsimidou, 2002b).

Izmed naravnih karotenoidov singletni kisik najučinkoviteje duši likopen (Woodall *et al.*, 1997). To pa še ne pomeni, da je likopen tudi boljši antioksidant kot β -karoten, saj se likopen lažje oksidira in se tako hitreje porabi (Edge *et al.*, 1997). Dušilec singletnega kisika je tudi β -kriptoksantin (Su *et al.*, 2002).

Na učinkovitost dušenja vpliva tudi topilo. Dušenje je manj učinkovito v bolj viskoznih topilih in v topilih, v katerih pride do agregacije; bolj polarni karotenoidi v nepolarnih topilih agregirajo (Edge *et al.*, 1997). Do agregacije lahko pride, ko je dosežena kritična lokalna koncentracija. O kemiji agregatov ne vemo dosti, na podlagi spektralnih sprememb pa lahko sklepamo, da agregacija vpliva na sistem konjugiranih dvojnih vezi. Agregacija ne poteka pri vseh karotenoidih enako lahko, struktura karotenoida pa vpliva tudi na tip nastalega agregata (El-Agamey *et al.*, 2004).

Glavni mehanizem dušenja je prenos energije elektrona. Možno pa je tudi kemijsko dušenje singletnega kisika, pri katerem pa se karotenoid uniči. Seveda je zato bolje, da fizikalno dušenje poteka v večji meri kot kemijsko (Edge *et al.*, 1997).

Čeprav so karotenoidi zelo dobri dušilci singletnega kisika *in vitro*, pa v bioloških sistemih ni nujno tako.

Radikalni mehanizem

Radikalni mehanizem antioksidacijskega delovanja karotenoidov še ni dovolj raziskan (Steenson & Min, 2000; Hrnčirik & Fritsche, 2005). Zdi se, da imajo karotenoidi pri avtooksidaciji nevtralen (Aparicio *et al.*, 1999) ali pa celo negativno vlogo zaradi oksidiranih produktov, ki lahko reagirajo z lipidnim substratom in tako pospešujejo oksidacijo (Steenson & Min, 2000; Subagio & Morita, 2001).

Karotenoidi lahko odstranjujejo proste radikale na enega ali več izmed naštetih načinov (El-Agamey *et al.*, 2004): s prenosom elektrona, z odcepitvijo alilnega vodika ali z adicijo. Pri prenosu elektrona z molekule karotenoida na peroksilni radikal nastane iz karotenoida kation-radikal (Edge *et al.*, 1997; El-Agamey *et al.*, 2004).

Z odcepitvijo alilnega vodika nastane iz karotenoida nevtralen radikal, peroksilni radikal pa se pretvori v hidroperoksid (El-Agamey *et al.*, 2004). Lahko pa poteče tudi adicija karotenoida in peroksilnega radikala (Miller *et al.*, 1996; Edge *et al.*, 1997; El-Agamey *et al.*, 2004). Poudariti pa moramo, da se pri nobenem mehanizmu 'lihi' elektron, značilen za proste radikale, ne izgubi (Edge *et al.*, 1997).

Na sposobnost za odstranjevanje radikalov vpliva obstoj funkcionalnih skupin na končnih obročih. Obstoj karbnilne skupine na obroču precej zmanjša učinkovitost za odstranjevanje radikalov ABTS⁺ (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonska kislina). Karbnilna skupina privlači elektrone in zmanjša gostoto neparne elektrona v skeletu z 11 dvojnimi vezmi. Nasprotno pa obstoj hidroksilne skupine na vsakem obroču v β -kriptoksantinu skoraj nima vpliva na sposobnost za odstranjevanje radikalov ABTS⁺. Čim večji je kromofor in čim boljše je prekrivanje orbital v njem, tem učinkoviteje karotenoid odstranjuje radikale ABTS⁺ (Miller *et al.*, 1996).

Na antioksidacijske lastnosti karotenoidov pa ne vpliva le sposobnost za odstranjevanje prostih radikalov, temveč tudi reaktivnost nastalih karotenoidnih radikalov (Miller *et al.*, 1996; El-Agamey *et al.*, 2004). Karotenoidni kation-radikali in adukt-radikali so močno resonančno stabilizirani in naj bi bili dokaj nereaktivni. Vstopajo lahko v bimolekularne reakcije, pri katerih nastanejo neradikalni produkti. Lahko pa reagirajo z radikali, ki "napadajo", in tako končajo radikalske reakcije (Miller *et al.*, 1996). Potencialno koristni oziroma škodljivi produkti, ki nastanejo iz karotenoidov, so številni *cis*-izomeri, produkti oksidacije, predvsem epoksidi, in spojine, nastale z razcepom molekule, predvsem apo-karotenali in apo-karotenoli (El-Agamey *et al.*, 2004).

Na hitrost in mehanizem odstranjevanja prostih radikalov vpliva tudi medij oziroma topilo. Karotenoidi so hidrofobne molekule in jih torej najdemo predvsem v lipofilnih območjih. Če karotenoidna molekula leži v notranjosti membrane, je prvi tip reakcije (prenos elektrona) verjetno termodinamsko neugoden zaradi nepolarnega okolja, ki ne podpira ločitve naboja. Tak primer sta β -karoten in likopen v človeških tkivih. Bolj verjetna pa je taka reakcija pri polarnih karotenoidih, npr. pri karotenoidnih diolih, kot je zeaksantin (El-Agamey *et al.*, 2004).

Na antioksidacijsko aktivnost karotenoidov nedvomno vpliva koncentracija kisika (Edge *et al.*, 1997). Pri visoki koncentraciji kisika se karotenoidni radikali, nastali v reakciji s peroksil radikali, lahko avtooksidirajo ali pa nadaljujejo verižno peroksidacijo lipidov. Pri nizki koncentraciji kisika pa je propagacija oksidacije manj verjetna. Ker je koncentracija kisika v različnih tkivih različna (v pljučih je parcialni tlak kisika ~150 mm Hg, v drugih tkivih pa vsaj 10× manjši), delovanje karote-

noidov v različnih tkivih ni nujno enako. (El-Agamey *et al.*, 2004)

Lipoksigenaze razbarvajo pigmente, vendar je njihovo delovanje posredno – pigmente razbarvajo radikali, ki nastanejo pri lipoksigenazni oksidaciji lipidov. Čeprav v oljkah obstajajo lipoksigenaze, pa druge snovi v plodovih ščitijo pigmente pred oksidacijo. Te snovi bodisi močno zmanjšajo aktivnost lipoksigenaz bodisi hitro porabijo hidroperokside, ki nastanejo pri delovanju lipoksigenaz (Jarén-Galán *et al.*, 1999).

Filtracija svetlobe

Tretja hipoteza o mehanizmu antioksidacijskega delovanja karotenoidov pravi, da β -karoten v olju deluje kot svetlobni filter in tako ščiti olje pred oksidacijo (Fakourelis *et al.*, 1987).

Karotenoidi so tudi prooksidanti

V določenih razmerah lahko karotenoidi delujejo tudi kot prooksidanti (Psomiadou & Tsimidou, 2002b), kar so pokazali tudi poskusi s celičnimi kulturami. Te lastnosti so morda povezane z agregacijo karotenoidov. Poleg tega bi morali preučiti tudi interakcije karotenoidov z radikali karotenoidov, ki pri višjih koncentracijah niso zanemarljive (El-Agamey *et al.*, 2004).

β -karoten deluje kot prooksidant pri visokih koncentracijah karotenoida in v 100 % kisiku. β -karoten reagira s peroksil radikali, pri čemer nastane karotenil radikal. Ta lahko v odsotnosti kisika reagira z novim peroksilradikalom in tako konča verižno reakcijo. V prisotnosti kisika pa se lahko verižna reakcija nadaljuje z nastankom β -karoten peroksilnega radikala. Tudi β -karoten se lahko avtooksidira, avtooksidacija je intenzivnejša pri višjem parcialnem tlaku kisika (Edge *et al.*, 1997).

Tako β -karoten kot lutein lahko v temi in na svetlobi delujeta kot prooksidanta. Obstoj tokoferolov lahko zmanjša prooksidacijski učinek karotenoidov. Karotenoidi so na svetlobi in pri povišani temperaturi neobstojni, njihovi razgradni produkti pa lahko pospešujejo oksidacijo lipidov. Zaestrenje hidroksilne skupine pa lahko stabilizira karotenoid pri povišani temperaturi. Zaestren karotenoid zato ni tako močan prooksidant kot prosta oblika karotenoida (Subagio & Morita, 2003).

Sinergija z drugimi antioksidanti in prooksidanti

Poročajo o sinergijskem delovanju β -karotena in α -tokoferola (Edge *et al.*, 1997; Psomiadou & Tsimidou, 2002b). Učinek sinergije verjetno lahko pojasnimo s tem, da α -tokoferol ščiti β -karoten pred avtooksidacijo (Psomiadou & Tsimidou, 2002b), možna pa je tudi obratna razlaga (Edge *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 2006). Sinergijski učinek tokoferolov in β -karotena oziroma likopena upada z naraščajočo koncentracijo karotenoida, pri koncentraciji karotenoida 1000 ppm pa je učinek celo antagonističen (Schroeder *et al.*, 2006). Karotenoidni kation radikali se lahko regenerirajo tudi z vitaminom C (El-Agamey *et al.*, 2004), karoteni pa lahko regenerirajo izrabljene fenolne antioksidante (Schroeder *et al.*, 2006). Karotenoidi in klorofilni pigmenti vplivajo na obstojnost olja, saj lahko delujejo kot prooksidanti, zlasti ob morebitni prisotnosti kovin, s katerimi delujejo sinergistično (Cichelli & Pertesana, 2004).

V bioloških tkivih karotenoidi niso v homogenem stanju, ampak imamo opravka z interakcijami različnih karotenoidov v membranah. Tako lahko predvidevamo sinergistično delovanje β -karotena, ki ga najdemo znotraj membrane, in zeaksantina, ki z delom molekule sega izven membrane (El-Agamey *et al.*, 2004).

Delovanje karotenoidov *in vivo*

Vloga karotenoidov v oksidacijskih reakcijah je predmet mnogih raziskav, zavedati pa se moramo, da so rezultati vsake raziskave odsev eksperimentalnih razmer in jih torej ne moremo brez ustreznega premisleka posplošiti na drugačne razmere, še manj pa na delovanje v bioloških sistemih.

Mesto nahajanja karotenov v heterogenih sistemih ima pomemben vpliv na antioksidacijski učinek. β -karoten in likopen v liposomu najdemo v hidrofobni notranjosti lipidne dvojne plasti. Tu jih lahko napadejo lipidni peroksilni radikali, manj pa so dostopni v vodotopnim radikalom. Pomemben faktor za delovanje karotenoidov bi lahko bil tudi parcialni tlak kisika (Schroeder *et al.*, 2006).

Študije *in vitro* so pokazale, da obstaja optimalna koncentracija karotenoidov, ki zagotavlja maksimalno antioksidacijsko delovanje v človeških celicah. Seveda pa rezultatov študij *in vitro* ne smemo posplošiti na razmere *in vivo* (El-Agamey *et al.*, 2004).

CAROTENOIDS IN OLIVE OILS

*Erika BEŠTER*LABS LLC, Institute for Ecology, Olive oil and Control, SI-6310 Izola, Zelena ulica 8
E-mail: erika.bester@zrs.upr.si*Milena BUČAR-MIKLAVČIČ*LABS LLC, Institute for Ecology, Olive oil and Control, SI-6310 Izola, Zelena ulica 8
and
University of Primorska, Science and Research Centre of Koper, SI-6000 Koper, Garibaldijeva 1*Bojan BUTINAR*

University of Primorska, Science and Research Centre of Koper, SI-6000 Koper, Garibaldijeva 1

*Vasilij VALENCIČ*LABS LLC, Institute for Ecology, Olive oil and Control, SI-6310 Izola, Zelena ulica 8
and
University of Primorska, Science and Research Centre of Koper, SI-6000 Koper, Garibaldijeva 1

SUMMARY

The pigments profile of virgin olive oil is determined by the pigments initially present in the fruits and their derivatives formed during the extraction process. The presence of other carotenoids or chlorophyll pigments at levels other than that associated with the extraction process indicate that oil has been adulterated or the extraction process was incorrect. The yellow pigments in olive oil are carotenoids and the green pigments are chlorophyll pigments. The amount of carotenoids in oil depends on variety, maturation index, treating of olive fruits before extraction, extraction process, and oil treating. Carotenes as well as xantophylls were identified in virgin olive oils. Lutein is usually the predominating compound in the carotenoid fraction of pigments, followed by β -carotene. The rest of carotenoid fraction are minor xantophylls, such as 5,6-epoxides, 5,8-epoxides or furanoids, and xantophyll esters. Cis-isomeres are also formed during the extraction process. The vitamin activity of cis-isomeres is lower as the activity of trans-isomeres. Pigment profile of olive oil is a useful tool for variety classification and authenticity determination. Carotenoids can act as antioxidants or prooxidants. Their antioxidant/prooxidant activity depends on concentration, solvent, free radicals structure, presence of other antioxidants, metals and oxygen. The antioxidant activity of carotenoids has not been satisfactorily explained as yet. There are three possible mechanisms of carotenoids antioxidant activity. Carotenoids are singlet oxygen quenchers and free radical scavengers and they act as light filters. Findings about carotenoids activity in vitro should not be translated to activity in biological systems. Carotenoids are an important part of human diet because of their antioxidant activity and some of them are also provitamins A. Carotenoids probably prevent some diseases, such as cardiovascular diseases and certain cancers, but can in certain circumstances increase the risk of disease.

Key words: olive oil, carotenoids, antioxidants

LITERATURA

Afzal, M., C. Obuekwe, N. Shuaib & H. Barakat (2004): Photosynthetic pigment profile of *Cordia myxa* L. and its potential in folklore medicinal application. *Food Agric. Environ.*, 2, 2, 114–120.

Aparicio, R., L. Roda, M. A. Albi & F. Gutiérrez (1999): Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by rancimat. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4150–4155.

Caponio, F., M. T. Bilancia, A. Pasqualone, E. Sikorska & T. Gomes (2005): Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *Eur. Food Res. Technol.*, 221, 92–98.

Cichelli, A. & G. P. Pertesana (2004): High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification. *J. Chromatogr. A*, 1046(1–2), 141–146.

- Edge, R., D. J. McGarvey & T. G. Truscott (1997):** The carotenoids as anti-oxidants – a review. *J. Photochem. Photobiol. B*, 41(3), 189–200.
- El-Agamey, A., G. M. Lowe, D. J. McGarvey, A. Mortensen, D. M. Phillip, T. G. Truscott & A. J. Young (2004):** Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 430(1), 37–48.
- Fakourelis, N., E. C. Lee & D. B. Min (1987):** Effects of chlorophyll and b-carotene on oxidation stability of olive oil. *J. Food Sci.*, 52, 234–235.
- Gallardo-Guerrero, L., B. Gandul-Rojas, M. Roca & M. I. Mínguez-Mosquera (2005):** Effect of storage on the original pigment profile of Spanish virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 82(1), 33–39.
- Gandul-Rojas, B., L. Roca, M. G. Cepero & M. I. Mínguez-Mosquera (1999):** Chlorophylls and carotenoids pattern in olive fruits: *Olea europaea* cv. Arbequina. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2207–2212.
- Gandul-Rojas, B., L. Roca, M. Cepero, M. I. Mínguez-Mosquera (2000):** Use of chlorophyll and carotenoid pigment composition to determine authenticity of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77(8), 853–858.
- Garcia, J. M., K. Yousfi, R. Mateos, M. Olmo & A. Cert (2001):** Reduction of oil bitterness by heating of olive (*Olea europaea*). *J. Agric. Food Chem.*, 49(9), 4231–4235.
- Jimeno, E., E. Calero, A. Castellote, R. M. Lamuela-Raventós, M. C. de la Torre & M. C. López-Sabater (2000):** Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 881(1–2), 155–259.
- Jimeno, E., A. I. Castellote, R. M. Lamuela-Raventós, M. C. de la Torre & M. C. López-Sabater (2002):** The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, alpha-tocopherol, and beta-carotene) in virgin olive oil. *Food Chem.*, 78(2), 207–211.
- Giuffrida, D., F. Salvo, A. Salvo, L. La Pera & G. Dugo (2007):** Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various Sicilian olive varieties. *Food Chem.*, 101(2), 833–837.
- Gutiérrez, F. & J. L. Fernández (2002):** Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of "extra" quality. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 571–577.
- Gutiérrez, F., B. Jimenez, A. Ruiz & M. A. Albi (1999):** Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. *J. Agric. Food Chem.*, 47(1), 121–127.
- Gutiérrez, F., M. J. Villafranca & J. M. Castellano (2002):** Changes in the main components and quality indices of virgin olive oil during oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 669–676.
- Hrcirik, K. & S. Fritsche (2005):** Relation between the Endogenous Antioxidant System and the Quality of Extra Virgin Olive Oil under Accelerated Storage Conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 2103–2110.
- Insel, P., E. Turner & D. Ross (2004):** Nutrition. 2nd Ed. Jones and Bartlett Publ., Sudbury, Massachusetts, p. 361–374.
- Jarén-Galán, M., C. Carmona-Ramon & M. I. Mínguez-Mosquera (1999):** Interaction between chloroplast pigments and lipoxigenase enzymatic extract of olives. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2671–2677.
- Luaces, P., A. G. Perez, J. M. Garcia & C. Sanz (2005):** Effects of heat-treatments of olive fruit on pigment composition of virgin olive oil. *Food Chem.*, 90(1–2), 169–174.
- Luterotti, S., M. Franko, M. Šikovec & D. Bicanic (2002):** Ultrasensitive assays of trans- and cis- β -carotenes in vegetable oils by high-performance liquid chromatography-thermal lens detection. *Analyt. Chim. Acta*, 460(2), 193–200.
- Miller, N. J., J. Sampson, L. P. Candeias, P. M. Bramley & C. A. Rice-Evans (1996):** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.*, 384(3), 240–242.
- Mínguez-Mosquera, M. I. & B. Gandul-Rojas (1994):** Mechanism and kinetics of carotenoid degradation during the processing of green table olives. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1551–1554.
- Mínguez-Mosquera, M. I., B. Gandul-Rojas, J. Garrido-Fernández & L. Gallardo-Guerrero (1990):** Pigments present in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67, 192–196.
- Mínguez-Mosquera, M. I., L. Rejano-Navarro, B. Gándul-Rojas, A. H. Sánchez-Gómez & J. Garrido-Fernández (1991):** Color pigment correlation in virgin olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 332–336.
- Moure, A., J. M. Cruz, D. Franco, J. M. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez, M. J. Núñez & J. C. Parajó (2001):** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, 72, 145–171.
- Paglierini, E., B. Zanoni & G. Giovanelli (2000):** Predictive study on Tuscan extra virgin olive oil stability under several commercial conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 48(4), 1345–1351.
- Psomiadou, E. & M. Tsimidou (1998):** Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5132–5138.
- Psomiadou, E. & M. Tsimidou (2001):** Pigments in Greek olive oils: Occurrence and levels. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 640–647.
- Psomiadou, E. & M. Tsimidou (2002a):** Stability of virgin olive oil. 1. Autooxidation studies. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 716–721.
- Psomiadou, E. & M. Tsimidou (2002b):** Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxidation studies. *J. Agric. Food Chem.*, 50(4), 722–727.

- Roca, M., B. Gandul-Rojas, L. Gallardo-Guerrero & M. I. Mínguez-Mosquera (2003):** Pigment parameters determining Spanish virgin olive oil authenticity: Stability during storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80(12), 1237–1240.
- Roca, M. & M. I. Mínguez-Mosquera (2001):** Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *J. Agric. Food Chem.*, 49(2), 832–839.
- Salvador, M. D., F. Aranda, S. Gómez-Alonso & G. Fregapane (2001):** Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chem.*, 74, 267–274.
- Schroeder, M. T., E. M. Becke & L. H. Skibsted (2006):** Molecular mechanism of antioxidant synergism of tocotrienols and carotenoids in palm oil. *J. Agric. Food Chem.*, 54(9), 3445–3453.
- Scotter, M. J. & L. Castle (2004):** Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. *Food Additives and Contaminants*, 2(2), 93–124.
- Stenson, D. F. & D. B. Min (2000):** Effects of beta-carotene and lycopene thermal degradation products on the oxidative stability of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77(11), 1153–1160.
- Su, Q., K. G. Rowley & N. D. H. Balasz (2002):** Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *J. Chromatogr. B*, 781, 393–418.
- Subagio, A. & N. Morita (2001):** Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. *Food Res. Int.*, 34(2–3), 183–188.
- Subagio, A. & N. Morita (2003):** Prooxidant activity of lutein and dimyristate esters in corn triacylglyceride. *Food Chem.*, 81(1), 97–102.
- Woodall, A. A., S. W.-M. Lee, R. J. Weesie, M. J. Jackson & G. Britton (1997):** Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1336, 33–42.