COMPETiTiVE
Claims for Olive oil
to iMProvE iTs markeT ValuE

PROGETTO Ager AGROALIMENTARE E RICERCA

FONDAZIONI IN RETE PER LA RICERCA AGROALIMENTARE

Un nuovo strumento analitico per l'applicazione dell'Health Claim

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE
NEUROFARBA Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino

CeRA
Centro Interdipartimentale di Ricerca e valorizzazione degli Alimenti

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE

European Commission Regulation EC No. 1924/2006 on nutrition and health claims made on foods. O. J. Eur. Union 2012, L310, 36

I *claims* devono essere comprensibili per il consumatore e devono dimostrare, sulla base di prove scientifiche, il valore nutrizionale o benefico dell'alimento.

Regolamento UE n. 432/2012 della Commissione europea del 16 maggio 2012 ha definito un elenco di *health claims* consentiti.

Substance	Claim
Olive oil polyphenols	Olive oil polyphenols contribute to the protection of blood lipids from oxidative stress
Oleic acid	Replacing saturated fats in the diet with unsaturated fats contributes to the maintenance of normal blood cholesterol levels. Oleic acid is an unsaturated fat.
Vitamin E	Vitamin E contributes to the protection of cells from oxidative stress
Monounsaturated and/or polyunsaturated fatty acids	Replacing saturated fats with unsaturated fats in the diet has been shown to lower/reduce blood cholesterol. High cholesterol is a risk factor in the development of coronary heart disease

OLIVE OIL POLYPHENOLS HEALTH CLAIM

Substance	Claim	Conditions of use of the claim
Olive oil polyphenols	Olive oil polyphenols contribute to the protection of blood lipids from oxidative stress	The claim may be used only for olive oil which contains at least 5 mg of hydroxytyrosol and its derivatives (e.g. oleuropein complex and tyrosol) per 20 g of olive oil. In order to bear the claim information shall be given to the consumer that the beneficial effect is obtained with a daily intake of 20 g of olive oil.

> 5 mg OH-tirosolo e suoi derivati per 20 g di olio

L'health claim approvato dall'**EFSA** (**Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare**) rappresenta un utile strumento legislativo per la differenziazione della categoria degli oli extra vergini di oliva. Consente al consumatore di riconoscere dall'etichetta della bottiglia un olio di maggior qualità.

efsa
European Food Safety Authority

OLIVE OIL POLYPHENOLS HEALTH CLAIM

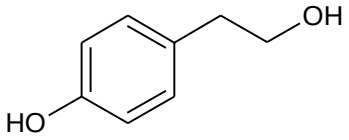
Pochi produttori utilizzano sistematicamente questo strumento nell'ambito del settore agroalimentare

Strengths	Weaknesses
- Strong ability to add value to products - Use of already authorized health claims - Strong ability to differentiate products - Strong ability to resolve the gap of the of "asymmetry information" - To communicate and to influence the eating culture - Strong credibility of the claim deriving from the evaluation of EFSA panel of expert	- Lack of skilled employees with specialized knowledge (e.g. about legal requirements) - Focus on just authorized health claims - A tool to predict the permanence of the claim validity during the shelf life of the product lacks - Knowledge about health claims on EVOO and their impact on purchase attitude and consumption behaviour of consumers is still limited. - **Regard to the claim of polyphenols, an official method of analysis lacks** - **Regard to the claim of polyphenols, the analytical description by EFSA of the molecules to be quantified is unclear.** - Regard to the claim of polyphenols, it is difficult to understand for the average consumer.

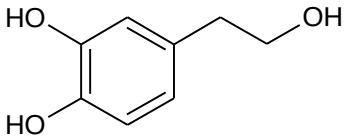
- Nel Regolamento non è stato suggerito né adottato un metodo specifico per la misura dei 5 mg di OH-tirosolo e derivati per 20 g di olio
- Disaccordo sul metodo analitico più idoneo per la misura di questi composti (a causa della copresenza del OH-tirosolo nella forma libera e in quelle legate)

COMPONENTE FENOLICA DELL'OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA

ALCOLI FENOLICI

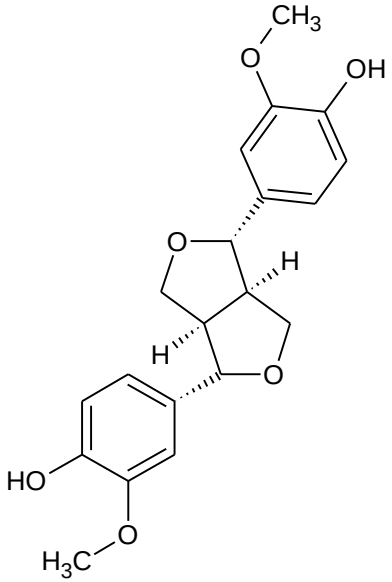


Tirosolo

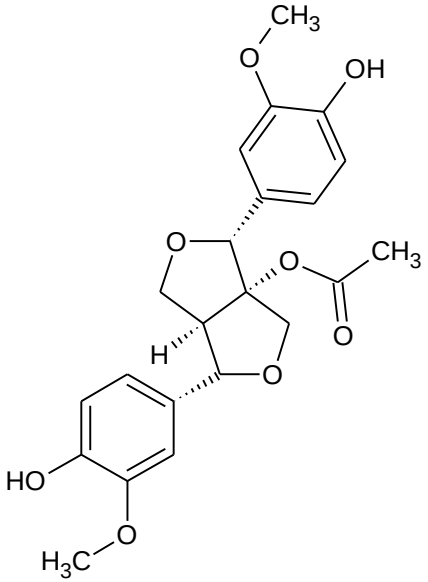


Idrossitirosolo

LIGNANI

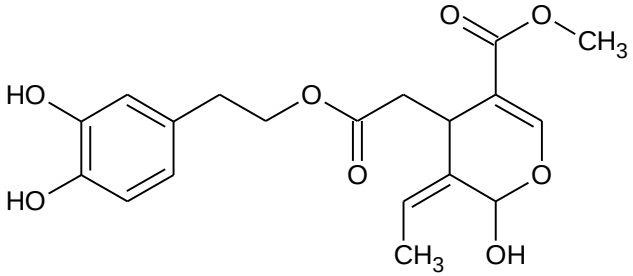


(+)-pinoresinolo

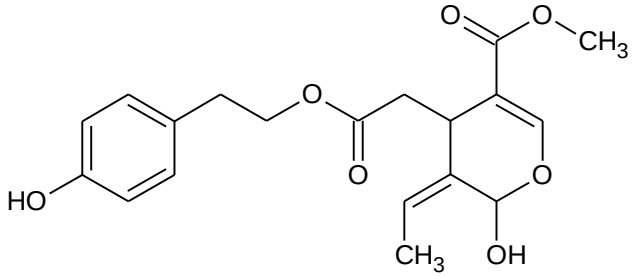


(+)-1-acetossipinoresinolo

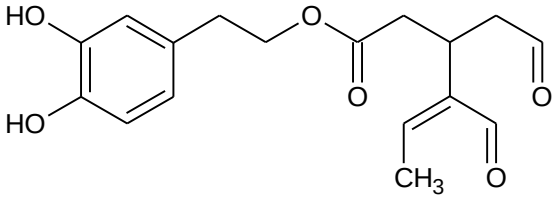
SECOIRIDOIDI



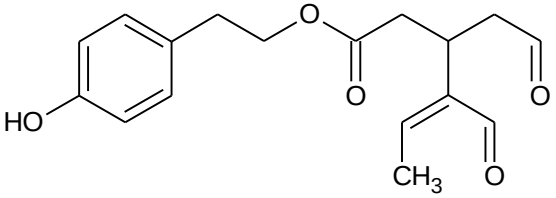
Oleuropeina aglicone



Ligstroside aglicone

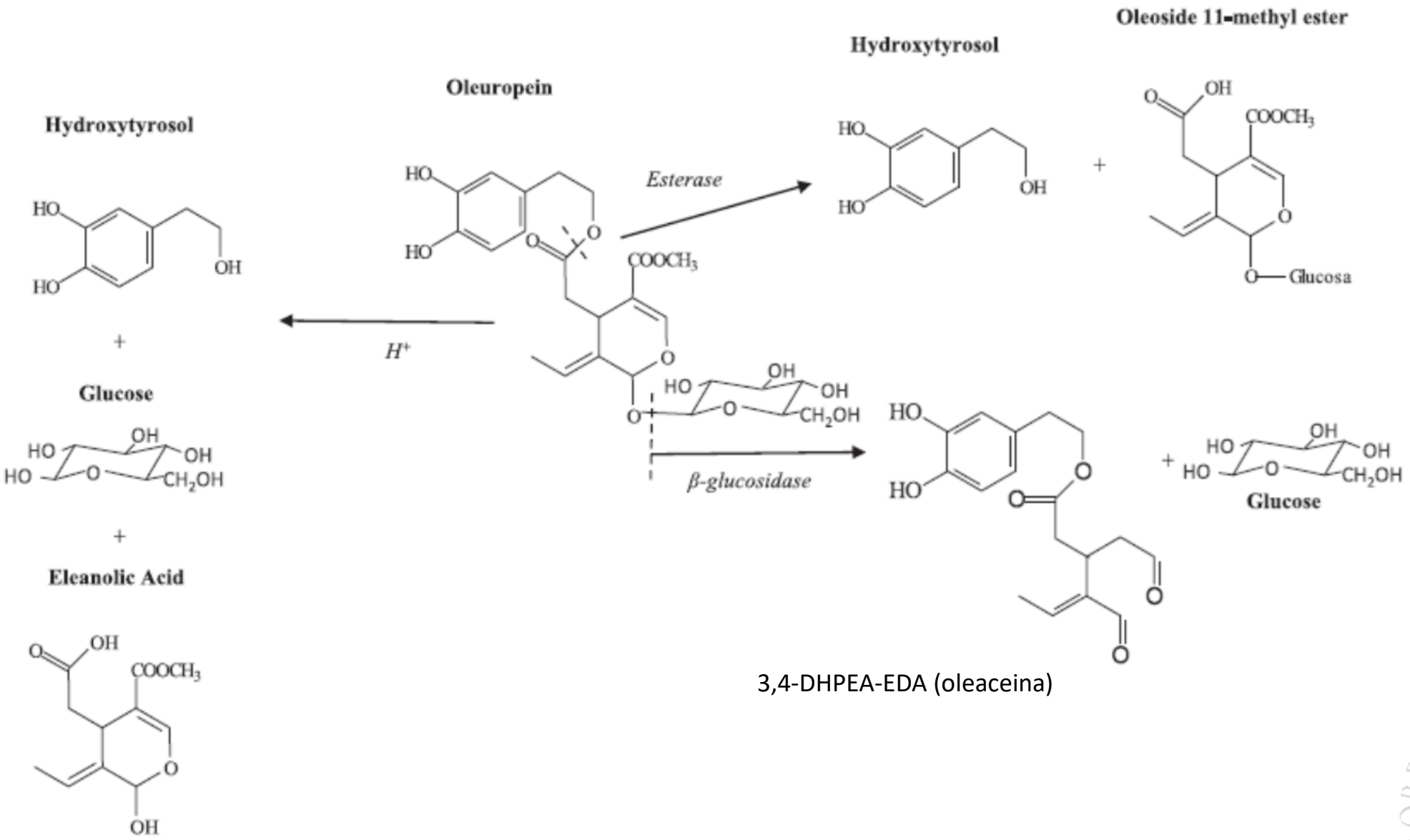


3,4-DHPEA-EDA (oleaceina)



p-HPEA-EDA (oleocantale)

TRASFORMAZIONI DELLA COMPONENTE FENOLICA

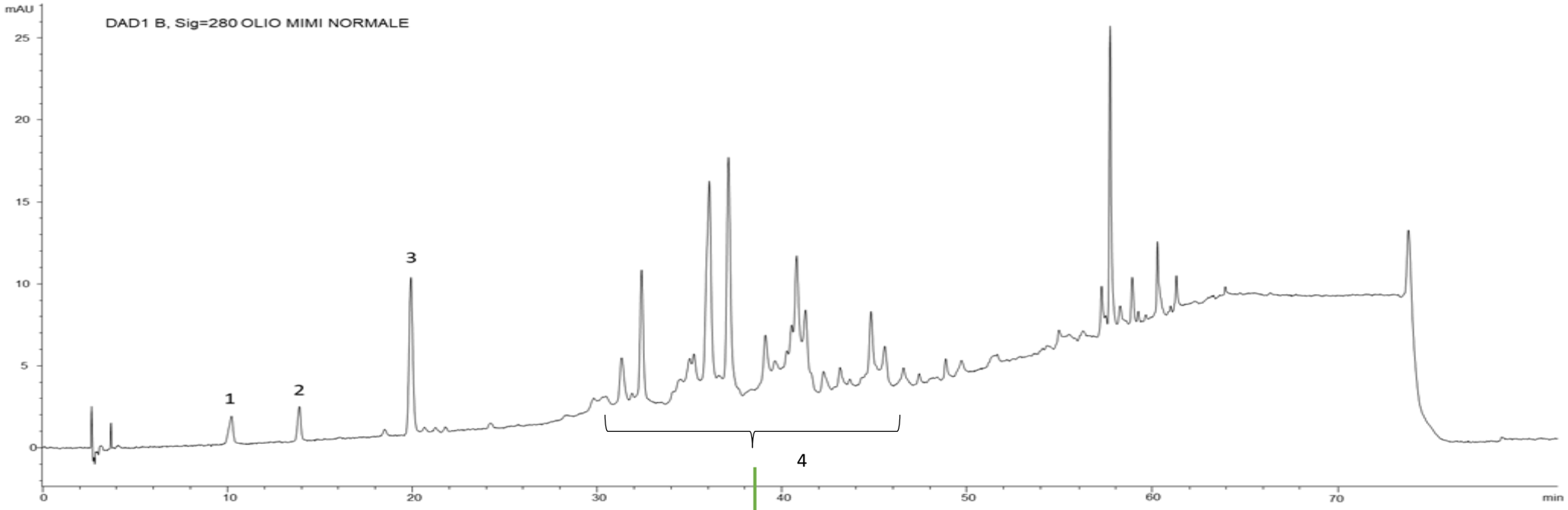


3,4-DHPEA-EDA (oleaceina)

Source: Ramirez et al. 2016 Food Chemistry

COMPONENTE FENOLICA: PROFILO HPLC/DAD

1 idrossitirosolo; **2** tirosolo; **3** acido siringico; **4** secoiridoidi e lignani



Non si ottiene una soddisfacente risoluzione cromatografica

SEMPLIFICAZIONE DELLO STUDIO DELLA FRAZIONE SECOIRIDOIDICA

THE PROPOSED METHODS

Journal of the Science of Food and Agriculture *J Sci Food Agric* 86:757–764 (2006)
DOI: 10.1002/jsfa.2411

Evaluation of lignans and free and linked hydroxy-tyrosol and tyrosol in extra virgin olive oil after hydrolysis processes

Nadia Mulinacci,* Catia Giaccherini, Francesca Ieri, Marzia Innocenti, Annalisa Romani and Franco F Vincieri
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Firenze, Via Ugo Schiff 6, Polo Scientifico Sesto Fiorentino-50019 Firenze, Italy

Idrolisi acida con H_2SO_4 sull'estratto fenolico per valutare la quantità totale di TIROSOLO e IDROSSITIROSOLO come forme libere e legate

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY
Article
pubs.acs.org/JAFC

Analysis of Total Contents of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Olive Oils

Published: August 27, 2012

Concepción Romero and Manuel Brenes*

Idrolisi acida con HCl sull'olio di oliva tal quale

Idrolisi con cloruro di acetile + derivatizzazione e analisi GC

Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2014, *116*, 805–811

Research Article

Evaluation of total hydroxytyrosol and tyrosol in extra virgin olive oils

Giorgia Purcaro[1], Rafael Codony[2], Lorena Pizzale[1], Carlo Mariani[3] and Lanfranco Conte[1]

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Letter

pubs.acs.org/JAFC

Addressing Analytical Requirements To Support Health Claims on "Olive Oil Polyphenols" (EC Regulation 432/2012)

Published: February 27, 2014

Aspasia Mastralexi
Nikolaos Nenadis
Maria Z. Tsimidou*
Laboratory of Food Chemistry and Technology, School of Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki, 541 24 Thessaloniki, Greece

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Correspondence/Rebuttal

pubs.acs.org/JAFC

Comment on Addressing Analytical Requirements To Support Health Claims on "Olive Oil Polyphenols" (EC Regulation 432/212)

Published: September 24, 2014

Concepción Romero
Manuel Brenes*
Food Biotecnology Department, Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Avenida Padre García Tejero 4, 41012 Seville, Spain

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Correspondence/Rebuttal

pubs.acs.org/JAFC

Rebuttal to the Comment on Addressing Analytical Requirements To Support Health Claims on "Olive Oil Polyphenols" (EC Regulation 432/212)

Published: September 24, 2014

Aspasia Mastralexi
Nikolaos Nenadis
Maria Z. Tsimidou*

- Entrambe le procedure sono efficaci ed adeguate allo scopo
- Presentate prove sulla superiorità del metodo Mulinacci et al. (2006) che includeva la possibilità di valutare i fenoli totali prima dell'idrolisi secondo il metodo ufficiale IOC (International Olive Council) validato nel 2009.

SCOPO DELLO STUDIO

Studiare la frazione fenolica negli EVOO al fine dell'applicazione dell'EFSA Health Claim, utilizzando l'idrolisi acida seguita da una determinazione HPLC-DAD

(i) Estrazione di composti fenolici totali con il metodo COI;

(ii) Confronto tra diverse procedure idrolitiche e selezione di quella più idonea per la determinazione dell'idrossitirosolo e del tirosolo totali;

(iii) Validazione e applicazione della procedura selezionata su più di 100 oli.

GLI OLI EXTRAVERGINI DI OLIVA

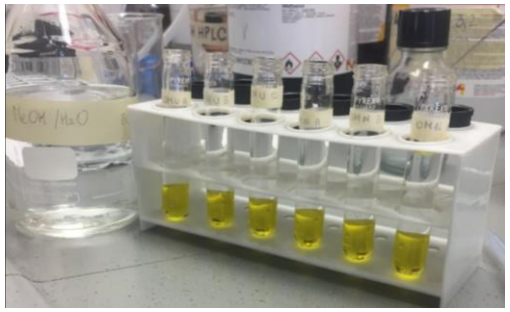
Apulia 2017	Cultivar	Tuscany 2017	Cultivar	Tuscany 2018	Cultivar
A17-C1	Coratina	T17-F1	Frantoio	T18-F1	Frantoio
A17-C2	Coratina	T17-B1	Blend	T18-L1	Leccino
A17-P1	Peranzana	T17-B2	Blend	T18-M1	Moraiolo
A17-P2	Peranzana	T17-B3	Blend	T18-B1	Blend
A17-P3	Peranzana	T17-N1	Nocellara	T18-B2	Blend
A17-P4	Peranzana	T17-C1	Coratina	T18-M2	Moraiolo
A17-P5	Peranzana	T17-B4	Blend	T18-F2	Frantoio
A17-P6	Peranzana	T17-B5	Blend	T18-L2	Leccino
A17-P7	Peranzana	T17-B6	Blend	T18-F3	Frantoio
A17-P8	Peranzana	T17-C2	Coratina	T18-L+M	Leccino + Moraiolo
A17-P9	Peranzana	T17-TI1	Tonda Iblea	T18-L+F	Leccino + Frantoio
A17-P10	Peranzana	T17-L1	Leccino	T18-B3	Blend
A17-P11	Peranzana	T17-F2	Frantoio	T18-B4	Blend
A17-P12	Peranzana	T17-F3	Frantoio	T18-L3	Leccino
A17-B1	Blend	T17-M1	Moraiolo	T18-PE	Pendolino
A17-B2	Blend	T17-B7	Blend	T18-L4	Leccino
A17-B3	Blend	T17-B8	Blend	T18-MdI	Madonna dell'Impruneta
A17-C/O1	Coratina/Ogliarola	T17-B9	Blend	T18-M3	Moraiolo
A17-C/O2	Coratina/Ogliarola	T17-B10	Blend	T18-F4	Frantoio
A17-Cn1	Cellina di nardò			T18-M4	Moraiolo
A17-Cn2	Cellina di nardò			T18-B5	Blend
A17-Cn3	Cellina di nardò			T18-MA	Maurino
A17-Cn4	Cellina di nardò			T18-LdC	Leccio del Corno

Apulia 2017	Cultivar	Tuscany 2017	Cultivar	Tuscany 2018	Cultivar
A17-C1	Coratina			T18-B6	Blend
A17-C2	Coratina			T18-B7	Blend
A17-C3	Coratina			T18-B8	Blend
A17-P1	Peranzana			T18-B9	Blend
A17-P2	Peranzana			T18-B10	Blend
A17-B1	Blend			T18-B11	Blend
A17-B2	Blend			T18-B12	Blend
A17-B3	Blend			T18-B13	Blend
A17-P3	Peranzana			T18-B14	Blend
A17-P4	Peranzana			T18-B15	Blend
A17-C/O1	Coratina/Ogliarola			T18-B16	Blend
A17-C4	Coratina			T18-B17	Blend
A17-C/O2	Coratina/Ogliarola			T18-B18	Blend
A17-C/O3	Coratina/Ogliarola			T18-B19	Blend
A17-B4	Blend			T18-B20	Blend
A17-C5	Coratina			T18-B21	Blend
A17-B5	Blend			T18-B22	Blend
A17-C6	Coratina			T18-B23	Blend
A17-C7	Coratina			T18-B24	Blend
A17-O1	Ogliarola			T18-B25	Blend
A17-C8	Coratina			T18-B26	Blend
A17-B6	Blend				

I campioni di olio extra vergine di oliva sono stati raccolti da diversi frantoi toscani (63 campioni) e pugliesi (45 campioni) dalle campagne del 2017 e 2018.

ESTRAZIONE FENOLICA

Metodo COI (COI/T.20/Doc. n. 29, 2009)



2 g di olio + 6 mL MeOH/$H_2$0 8:2 in presenza di acido siringico (IS)

→ Agitazione con vortex

→ Estrazione in bagno a ultrasuoni (15min)

↓ Centrifuga 5000 giri/min (25 min)

↓ Surnatante trasferito in vial

↓ Analisi HPLC-DAD

Tenore in composti fenolici: mg di tirosolo/Kg di olio

TEMPO min	FLUSSO ml/min	H_2O^+ %	CH_3CN %	CH_3OH %
0	1.00	96	2	2
40	1.00	50	25	25
45	1.00	40	30	30
60	1.00	0	50	50
70	1.00	0	50	50
72	1.00	96	2	2
82	1.00	96	2	2

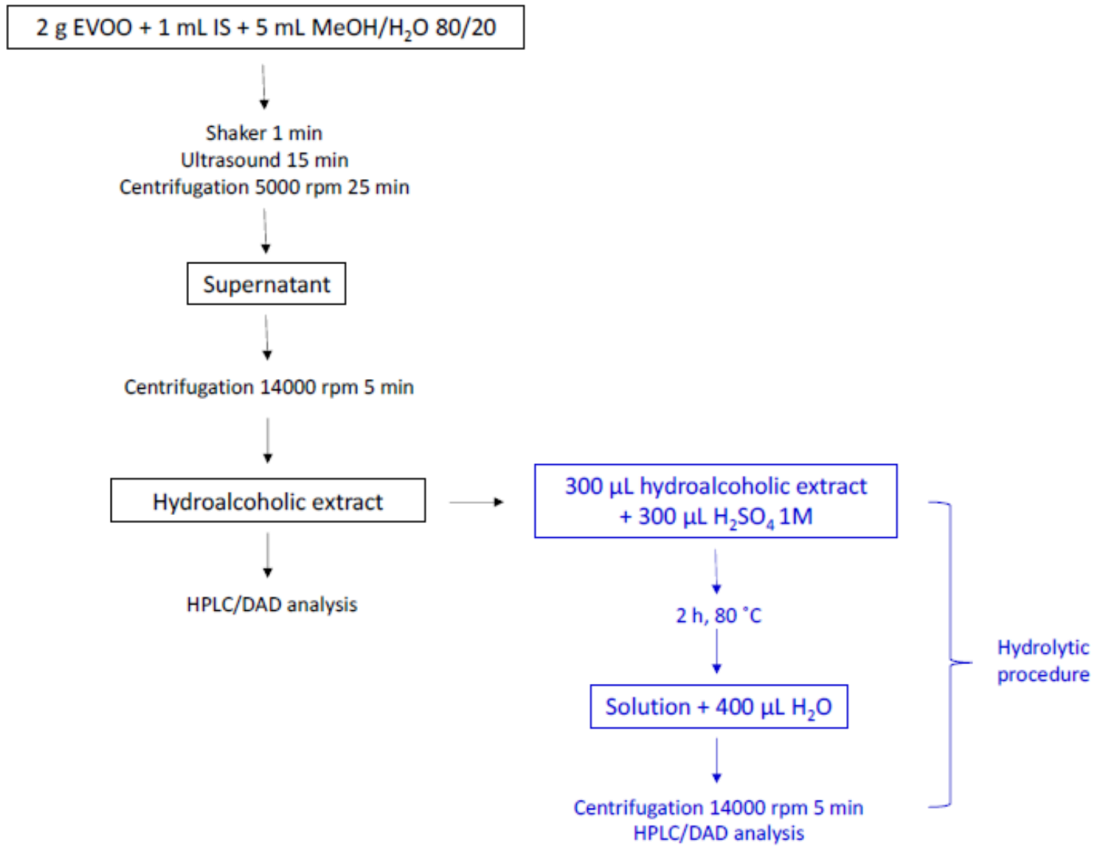
Colonna cromatografica: SphereClone 250 x 4.6 mm, 5µm (Phenomenex)

IDROLISI ACIDA
OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE

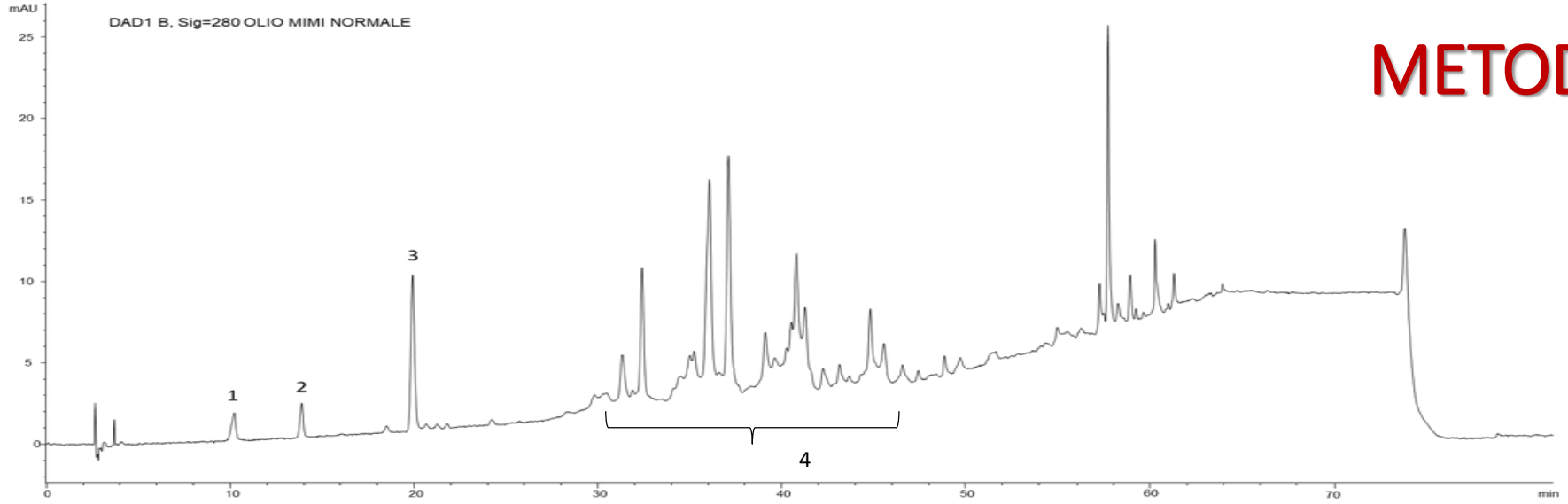
n°	Conditions	Hydroxytyrosol	Tyrosol
1	EtOH HCl 25 °C-2h	135.3 ± 6.1 c	120.1 ± 6.1 c
2	EtOH HCl 25 °C-4h	176.6 ± 3.5 g	163.0 ± 3.4 fg
3	EtOH HCl 25 °C-6h	198.8 ± 0.6 i	187.7 ± 0.8 ij
4	EtOH HCl 25 °C-24h	206.2 ± 1.9 jk	197.5 ± 1.8 kl
5	EtOH HCl 80 °C-2h	158.5 ± 1.0 d	203.1 ± 0.2 lm
6	EtOH H_2SO_4 25 °C-2h	119.0 ± 6.8 b	103.3 ± 5.9 b
7	EtOH H_2SO_4 25 °C-4h	167.6 ± 1.8 ef	147.8 ± 2.4 e
8	EtOH H_2SO_4 25 °C-6h	188.3 ± 0.4 h	166.5 ± 3.0 g
9	EtOH H_2SO_4 25 °C-24h	203.8 ± 0.4 ijk	183.9 ± 0.9 hi
10	EtOH H_2SO_4 80 °C-2h	216.2 ± 1.5 l	205.1 ± 0.4 m
11	MeOH HCl 25 °C-2h	110.2 ± 8.8 a	92.3 ± 7.4 a
12	MeOH HCl 25 °C-4h	178.5 ± 2.7 g	159.8 ± 2.4 f
13	MeOH HCl 25 °C-6h	200.3 ± 0.4 ij	180.9 ± 1.1 h
14	MeOH HCl 25 °C-24h	205.7 ± 2.1 jk	192.0 ± 1.9 jk
15	MeOH HCl 80 °C-2h	172.6 ± 0.7 fg	201.5 ± 1.0 lm
16	MeOH H_2SO_4 25 °C-2h	120.0 ± 9.5 b	99.5 ± 7.7 b
17	MeOH H_2SO_4 25 °C-4h	165.3 ± 2.3 e	140.9 ± 2.7 d
18	MeOH H_2SO_4 25 °C-6h	190.4 ± 4.0 h	166.0 ± 6.8 g
19	MeOH H_2SO_4 25 °C-24h	205.9 ± 1.0 jk	179.1 ± 1.3 h
20	MeOH H_2SO_4 80 °C-2h	209.4 ± 1.9 k	197.6 ± 3.4 kl

I dati sono una media dei triplicati espressi in mg/kg.

EtOH = EtOH:H_2O 80:20; MeOH = MeOH:H_2O 80:20
HCl = HCl 2 M; H_2SO_4 = H_2SO_4 1M

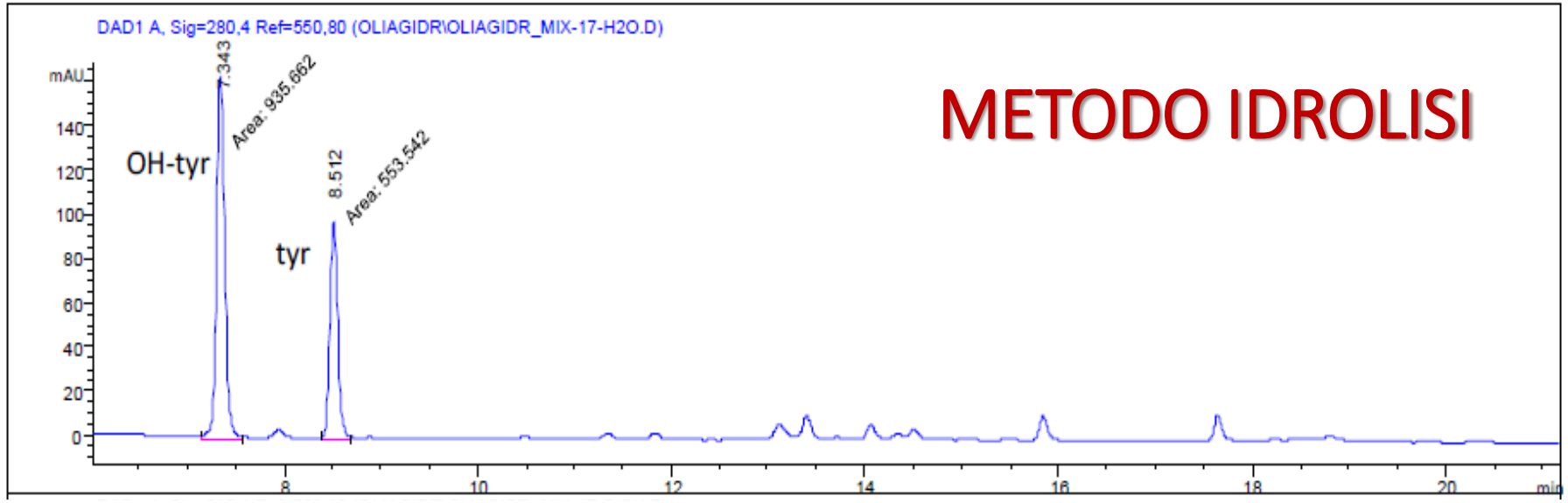


Si ottengono due risultati con una sola estrazione: contenuto totale di fenoli secondo il metodo ufficiale COI e tenore in tirosolo e idrossitirosolo dopo idrolisi acida.



METODO COI

1 idrossitirosolo; 2 tirosolo; 3 acido siringico; 4 secoiridoidi e lignani



METODO IDROLISI

IDROLISI ACIDA: CONDIZIONI ANALITICHE

Tempo (min)	H_2O %	CH_3CN %	Flusso (mL/min)
0	95	5	0,4
5	70	30	0,4
10	50	50	0,4
15	2	98	0,4
20	2	98	0,4
22	95	5	0,4

- Metodo HPLC più breve per ridurre il tempo di analisi e il flusso con risparmio di solvente
- Evitato l'uso di MeOH

Colonna cromatografica: Gemini RP18 150 x 3 mm, 5µm (Phenomenex)

QUANTIFICAZIONE DEI COMPOSTI FENOLICI

- Il contenuto fenolico totale (oleuropeina e ligstroside e derivati, lignani, flavonoidi e acidi fenolici) prima dell'idrolisi acida è stato valutato in accordo col Metodo ufficiale COI. Il contenuto totale di tirosolo e idrossitirosolo dopo idrolisi è stato valutato utilizzando la curva di calibrazione del tirosolo a 280 nm.
- Idrossitirosolo totale: $mg_{OH\text{-}tyr} = mg_{tyr} \times 0,65$
- Tutti i dati sono stati espressi in mg/kg_{oil}

VALIDAZIONE

International Organization for Standardization (Rif- ISO3534-1, 1993)

Table 2. Quality parameters for method validation regarding the external standards used for the quantitative evaluation.

Phenolic Compound	rt (min)	Range of Linear Calibration (μg/mL)	Slope	Intercept	R^2_{adj}	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)	Low Concentration Trueness (R%)	Low Concentration Precision (CV%)	High Concentration Trueness (R%)	High Concentration Precision (CV%)
Tyrosol	8.5	1.0–150.0	1601.6 ± 13.9	5.3 ± 4.2	1.0000	0.33	1.0	89.7	2.4	98.0	1.0
Hydroxytyrosol	7.3	1.0–150.0	-	-	0.9998	0.33	1.0	121.5*	1.6	115.7	1.9

rt, retention time; R^2, squared regression coefficient; * values of accuracy out of the range 80%–120%.

Range di calibrazione lineare

Sensibilità

Linearità

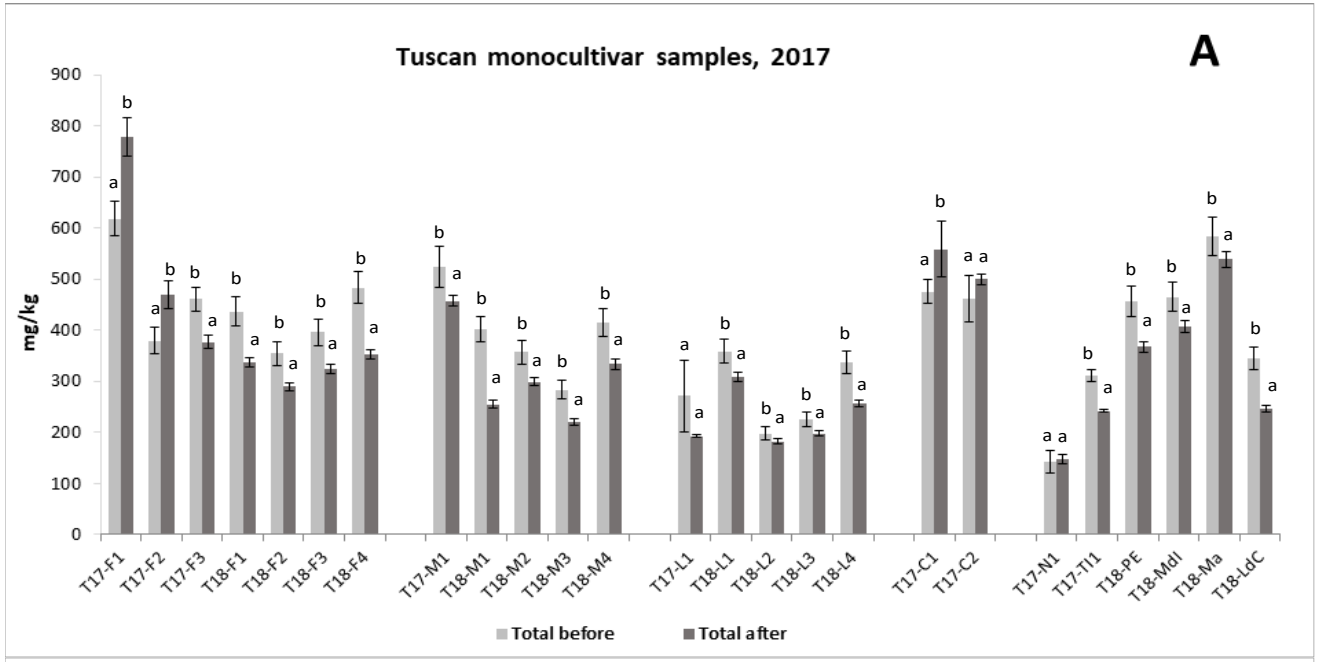
Limite di rilevabilità

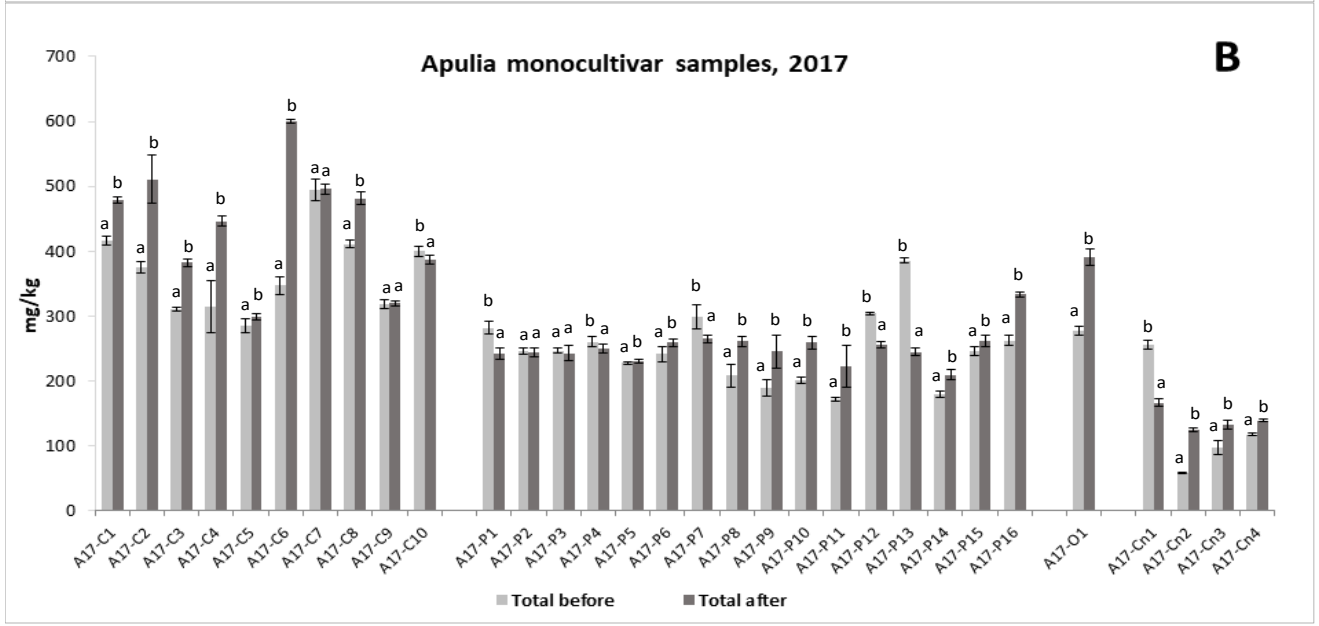
Limite di quantificazione

Accuratezza (Esattezza e Precisione)

- Buona linearità (R^2) di calibrazione per i due analiti nello stesso intervallo (1,0–150,0 mg/kg)
- Tirosolo: esattezza confermata nel range previsto di 80-120% e precisione con CV% <5% sia a basse che alte conc
- Idrossitirosolo: bassa stabilità della soluzione madre standard. Precisione con CV% <5% sia a basse che alte conc, ed esattezza del 115,7% e 121,5% rispettivamente ad alte e a basse concentrazioni.

APPLICAZIONE DEL METODO





OLI TOSCANI monocultivar

OLI PUGLIESI monocultivar

- Fenoli totali calcolati con Metodo COI (prima dell'idrolisi) e come somma di idrossitirosolo e tirosolo (dopo idrolisi)
- Non è stata evidenziata una tendenza specifica nel tenore fenolico prima e dopo idrolisi

DATI ESPRESSI COME mg/20 g DI OLIO

Toscana

A	After Hydrolysis (mg/20goil)			Before Hydrolysis (mg/20goil)
	Hydroxytyrosol	Tyrosol	Tyrosol + Hydroxytyrosol	Total phenols
max	8.90 ± 0.67	7.24 ± 0.59	15.56 ± 1.09	12.36 ± 1.39
min	0.29 ± 0.01	1.38 ± 0.01	2.48 ± 0.01	1.17 ± 0.02
mean	2.93 ± 0.11	4.08 ± 0.12	7.00 ± 0.22	6.34 ± 0.29

Puglia

B	After Hydrolysis (mg/20goil)			Before Hydrolysis (mg/20goil))
	Hydroxytyrosol	Tyrosol	Tyrosol + Hydroxytyrosol	Total phenols
max	6.92 ± 0.20	4.06 ± 0.12	10.78 ± 0.31	11.69 ± 0.75
min	0.63 ± 0.02	1.11± 0.03	1.76 ± 0.05	3.36 ± 0.22
mean	3.23 ± 0.09	2.45 ± 0.07	5.68 ± 0.16	6.89 ± 0.44

- Si conferma l'assenza di un’unica tendenza nei risultati
- La gran parte degli oli studiati contiene la quantità minima di 5 mg di OH-tyr e derivati/20 g di olio richiesta dall'EFSA per l'applicazione dell’Health Claim. In particolare, considerando i dati dopo l'idrolisi, 7 campioni toscani e 6 campioni pugliesi hanno mostrato valori al di sotto di questa soglia.

CONCLUSIONS

L’Health Claim EFSA per i polifenoli dell'olio di oliva rappresenta un utile strumento legislativo che può consentire al consumatore di riconoscere gli oli di qualità superiore. Tuttavia, ad oggi, solo una bassa percentuale di produttori applica il claim sull'etichetta.

Questo lavoro ha proposto l’utilizzo di un'idrolisi acida su estratti fenolici al fine di promuovere e facilitare l’utilizzo del claim:

- Il metodo proposto permette di determinare il contenuto totale di tirosolo e idrossitirosolo, a partire dall'estratto ottenuto secondo il protocollo ufficiale COI
- Il metodo è stato applicato a più di 100 EVOO prodotti in due regioni italiane in due anni successivi. Prima e dopo idrolisi sono stati ottenuti valori simili di fenoli totali per la gran parte dei campioni
- I dati dopo l'idrolisi hanno indicato che circa il 75% dei campioni ha raggiunto la quantità minima di fenoli richiesta dall'EFSA per l'applicazione del claim

Questo approccio ha consentito una misura semplice e accurata dell'idrossitirosolo e del tirosolo totali, che è un requisito fondamentale per applicare correttamente il claim EFSA.

ACKNOWLEDGEMENTS

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE
NEUROFARBA Trova
Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino

Prof. Nadia Mulinacci
Prof. Marzia Innocenti
PhD Lorenzo Cecchi
PhD student Diletta Balli

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI ALDO MORO

Prof. Filomena Corbo
Prof. Maria Lisa Clodoveo

CeRA
Centro Interdipartimentale di Ricerca e valorizzazione degli Alimenti