University of Udine
Department of Agri-Food, Environmental and Animal Sciences

The UNIUD PhD Project on monitoring of MOSH and MOAH in the production chain of olive oils: "Optimization of rapid analytical protocols for monitoring the contamination with hydrocarbons of petrogenic origin in the olive oil supply chain"

Dott. Luca Menegoz Ursol

Bologna, 12-13 November 2019

SISSG
SOCIETÀ ITALIANA PER LO STUDIO DELLE SOSTANZE GRASSE

FINANCIERS:

FEDEROLIO
Federazione Nazionale del Commercio Oleario

FOI FILIERA OLIVICOLA OLEARIA ITALIANA

- Italia Olivicola
- Unapol
- Assitol
- Aifo
- Assofrantoi

ALS

MERIEUX NutriSciences

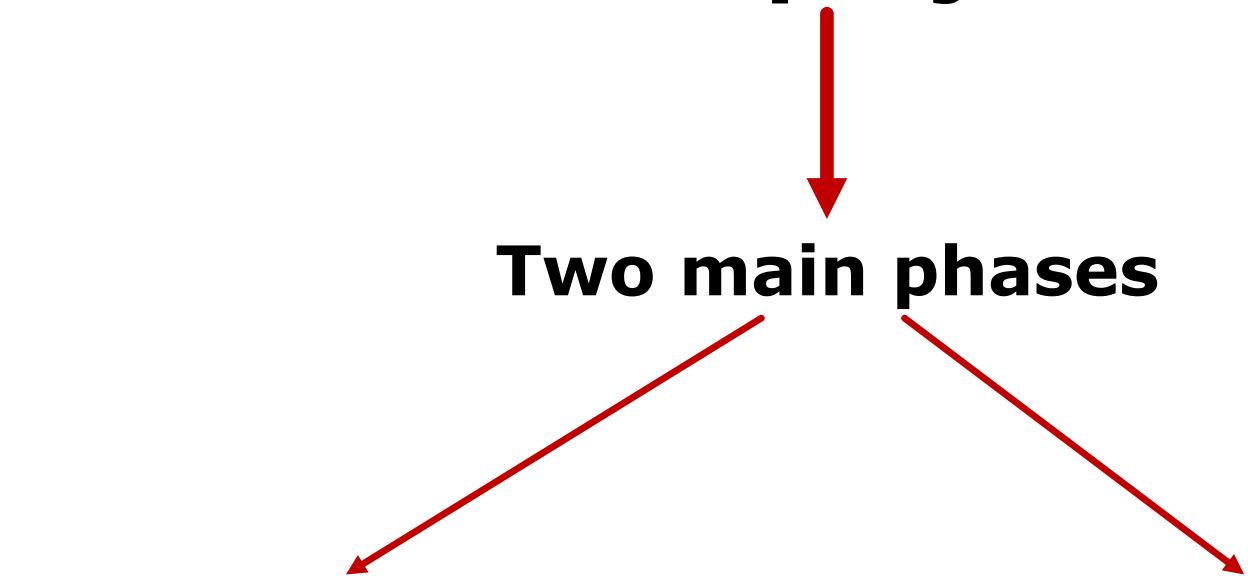
SRA INSTRUMENTS
ANALYTICAL SOLUTIONS

Food Chemistry laboratory
University of Udine

JRC
Ispra (VA)

EURL
European Union Reference Laboratory
for Food Contact Materials

PhD project


Two main phases
Methods optimization for high sensitivity analysis of MOH in olive oil
Monitoring of MOH contamination in olive oil supply chain

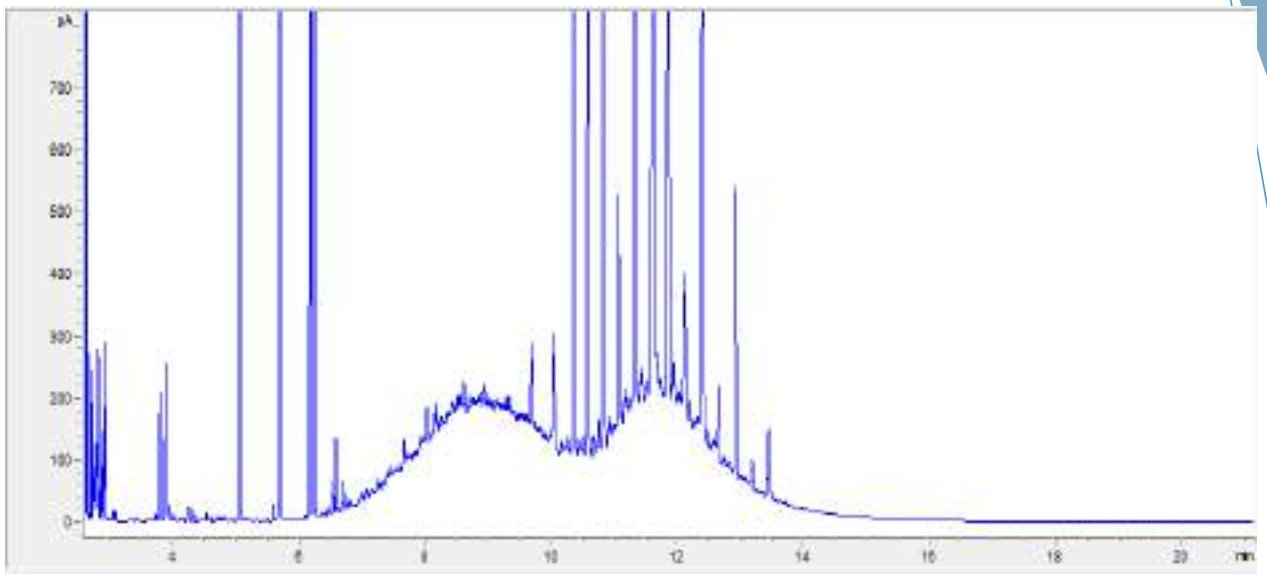
SAMPLE PREPARATION and METHOD OF ANALYSIS

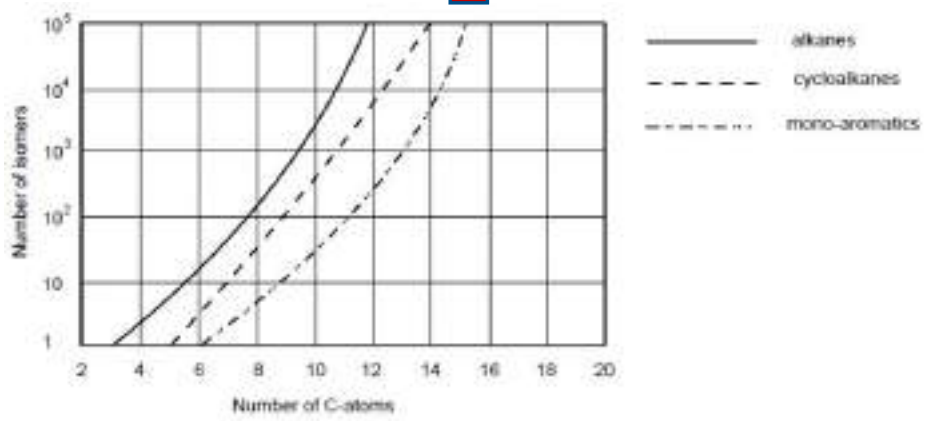
LC-GC-FID

MOH

MOSH

MOAH

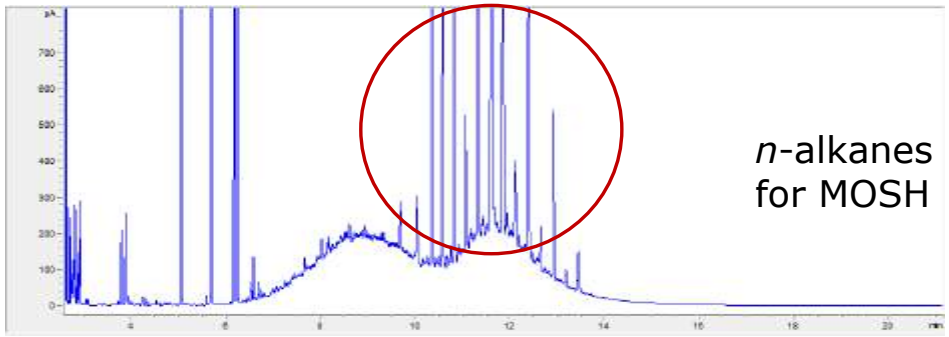

pA
700
600
500
400
300
200
100
0
4
6
8
10
12
14
16
18
20
min


Number of isomers
10^5
10^4
10^3
10^2
10
1
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Number of C-atoms
alkanes
cycloalkanes
mono-aromatics

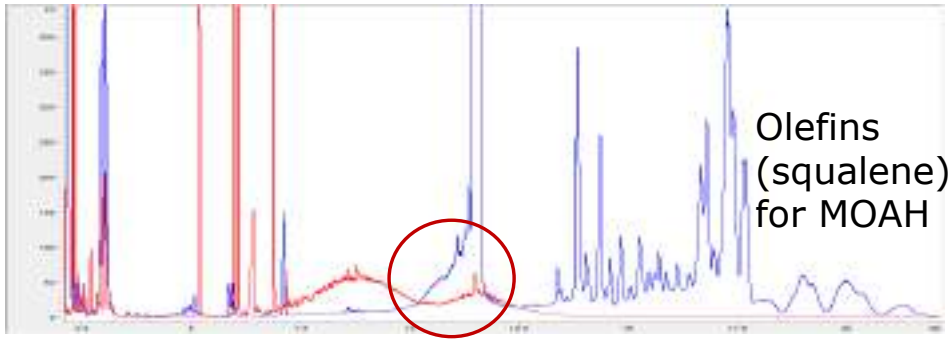
PROBLEM:
Sensitivity

Low quantification limits required by JRC guidelines

Interference

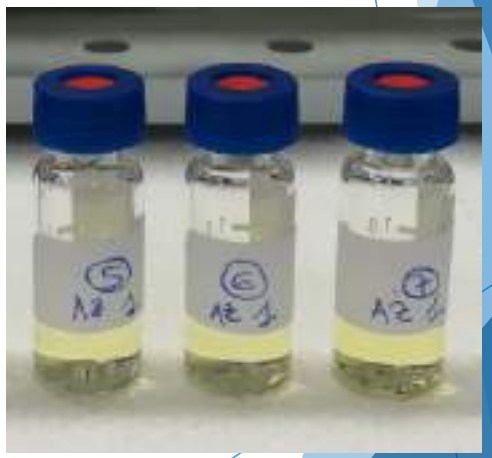


n-alkanes for MOSH



Olefins (squalene) for MOAH

Injectable quantity

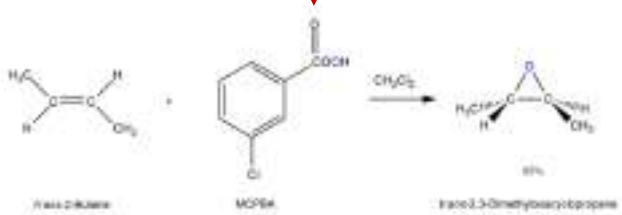


LC column maximum oil loading capacity

SOLUTIONS

Interference

Olefins



Epoxidation

Biedermann *et al.*

Nestola & Schmidt

BS EN 16995:2017

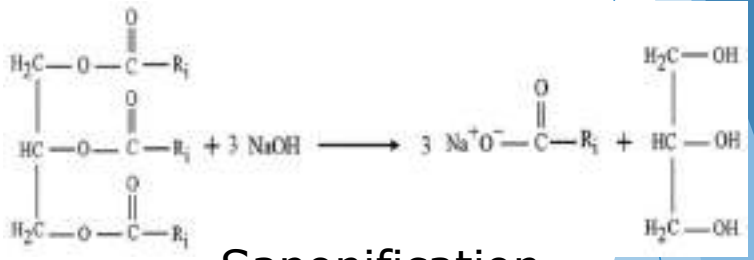
Others

JRC

n-alkanes

Aluminium oxide SPE

Injectable quantity



Saponification

Rapid?
Solvent sparing?
Sensible?
Reproducible?
Validated?

Need for optimization

JRC method

Overnight saponification of 2 g of oil

Addition of 150 mL of *n*-hexane

Washing of the organic phase in separatory funnel two times with 100 mL of H_2O each

Dehydration of the organic phase by passage through a bed of sodium sulphate

Concentration till 10 mL with Rotavapor

Addition of 1 mL of mCPBA in CH_2Cl_2 to the sample, stopping of the reaction with L-ascorbic acid

Loading into a column
filled with 3 g of a homogeneous mixture of activated silica and silver nitrate on silica gel and conditioned with 10 mL of *n*-hexane
Elution with 10 mL of hexane/DCM 70:30 mixture

Concentration to 2 mL under nitrogen flow

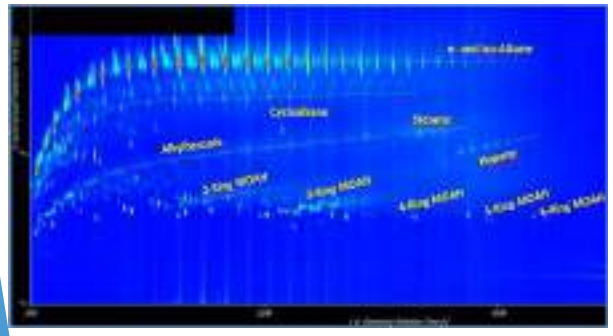
Injection into the LC-GC-FID

MOAH CONCERN

Recent toxycological data seem to highlight that the number of aromatic rings affects the carcinogenicity of MOAH

Characterization of MOAH contamination

Comprehensive GC (GCxGC-MS/FID)



VUV detector

LC-GC-FID to separate MOAH based on the number of aromatic rings

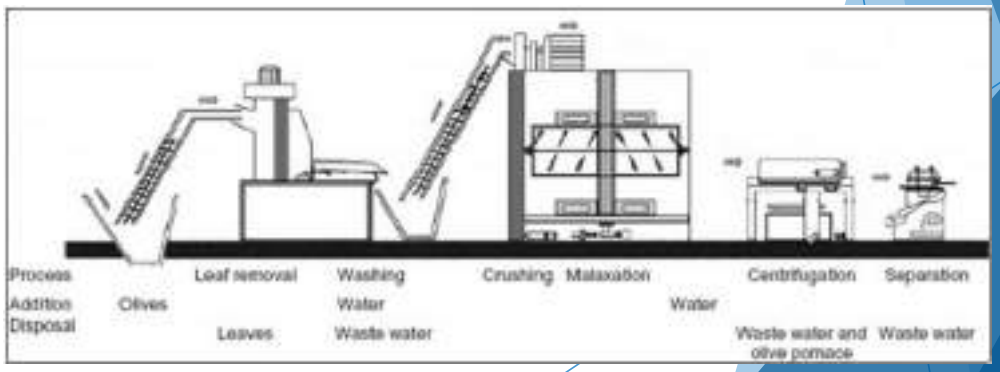
MINERAL OIL IN VEGETABLE OILS

MINERAL OIL (MOH)

SOURCES?

No systematic study

OLIVE OIL SUPPLY CHAIN



Possible sources are known, the incidence of each one is not

SAMPLING ALONG THE SUPPLY CHAIN

OLIVE GROVES

Olive groves selection → possible situations of different exposure to mineral oil

- olives sampling one month before maturation
- olives sampling at the end of maturation
- selection of one olive grove with 4 different varieties. Olives sampling of 3 trees per variety at different maturation stage

In addition:

- environmental monitoring with passive traps (to evaluate)
- analysis of used pesticides

HARVESTING AND TRANSPORT

- olives sampling from the trees just before the harvesting
- olives sampling before the transport
- olives sampling after the transport

In addition:

- analysis of materials that come into contact with olives or other possible sources during the harvesting

OIL MILL

- olives sampling before processing
- olives sampling after washing
- olive paste sampling after crushing
- olive pomace sampling from the decanter
- olive oil sampling from the decanter

In addition:

- analysis of lubricants used in the oil mill

EXTRA VIRGIN OLIVE OIL BOTTLING

- olive oil sampling before filtration
- olive oil sampling after filtration
- sampling of bottled olive oil

In addition:

- analysis of contact materials
- analysis of filters and filtration coadiuvants

POMACE OIL EXTRACTORS

- fresh olive pomace sampling upon arrival at the pomace oil extractor
- olive pomace sampling after different storage times
- olive pomace sampling before drying
- olive pomace sampling after drying
- crude pomace oil sampling after extraction
- refined pomace oil sampling at different refining stages

LAMPANTE OIL REFINING PLANT

- lampante oil sampling in the oil mill
- lampante oil sampling after transport to the refining plant
- lampante oil sampling at different refining stages
- lampante oil sampling after refining

THE MARKET

- extra virgin olive oil sampling
- olive oil sampling
- pomace oil sampling

ANY SUGGESTIONS?

UNTIL NOW…

SAMPLING FORM

Sperimentazione MOSH - MOAH

PRELIEVO DELLE OLIVE

AZIENDA/PAESE …………………………	Codice campione …………………………
Data di campionamento (DD/MM/YY) Luogo del campionamento Quantità di olive da prelevare: intorno a 2 Kg. **ATTENZIONE! IL CAMPIONE DI OLIVE DEVE ESSERE POSTO IN RECIPIENTI DI VETRO (TIPO BORMIOLI) INTERPONENDO TRA IL TAPPO ED IL CAMPIONE UN PEZZO DI CARTA DI ALLUMINIO (TIPO DOMOPAK)** Nota 1. Al fine di ridurre possibili fonti di variazione, potrebbe convenire fare estrarre l'olio da un unico laboratorio che abbia un [illegible], se non ne abbiamo in Italia, io sono in contatto con il laboratorio di [illegible]/Capodistria dove le hanno e si può chiedere se (pagando) possono farlo.	
Tipologia di oliva (varietà di olive/varietà prevalente)	
Tipologia di olive (stato sanitario delle olive, condizioni di conservazione delle olive prima della trasformazione in olio)	
Trattamenti: Indicare l'elenco dei fitofarmaci se impiegati. L'oliveto è impiegato alla coltivazione biologica, oppure non ha questa peculiarità, specificare. Se l'oliveto è a coltivazione biologica quali prodotti per la lotta biologica sono utilizzati nel corso della campagna olivicola ?	
Trattamenti: per ogni fitofarmaco / prodotto per la lotta biologica e non, indicare il numero e possibilmente le date dei trattamenti Inoltre, riportare il "veicolo" nel quale sono diluiti i fitofarmaci. L'ideale sarebbe riportare le istruzioni per l'uso che corredano il prodotto.	

Raccolta Indicare l'elenco degli strumenti utilizzati per la raccolta: scuotitori, agevolatori, etc. … Indicare marca e tipologia degli eventuali lubrificanti utilizzati dagli agevolatori		
Raccolta: Indicare il tipo di contenitore utilizzato per conferire le olive da portare al frantoio		
Informazioni Oliveto: località/regione/nazione (coordinate GPS se possibile, altitudine)		
Informazioni Oliveto: l'oliveto (o parte di esso) è in prossimità di strade pubbliche asfaltate di medio-intenso traffico: prelievo dei 2 kg di olive. Se si, a che distanza? SE si, possibilmente effettuare 2 campionature di olive: sia dai lati antistante la strada che dal centro dell'oliveto - Stessa cultivar e se possibile stesso oliveto, dove il campionamento è eseguito il più lontano possibile da strade con traffico veicolare (indicare possibilmente la lontananza): prelievo 2 kg olive	SI	NO
Informazioni Oliveto: In zona esistono insediamenti industriali? Se si, descrivere la tipologia produttiva e la distanza dall'oliveto	SI	NO
Informazioni Oliveto: Eventuale vicinanza di linea ferroviaria (indicare la distanza)	SI	NO
Informazioni oliveto: Se disponibili informazioni sui principali venti: direzione (es: da Nord a Est ecc.) ed eventualmente periodo di massima presenza		

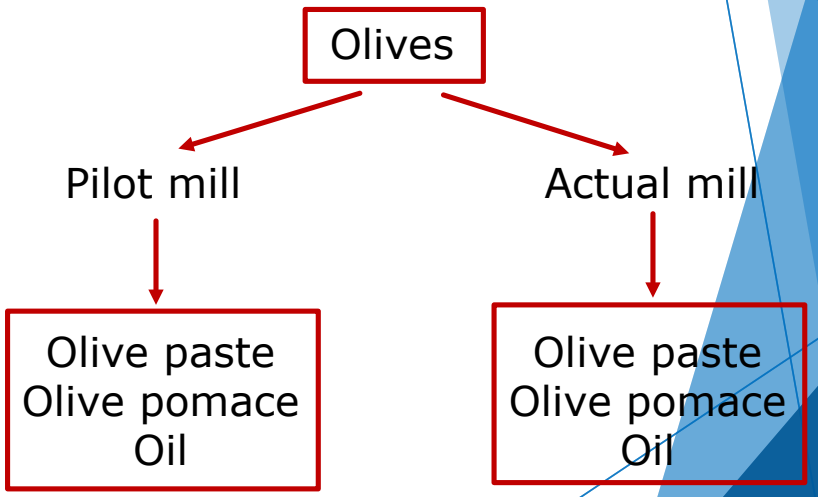
CAMPIONAMENTO DELL' OLIO VERGINE

Sede del frantoio (luogo dove le olive vengono processate)	

Parametri tecnologici *(frangitore/gramola/pressione/2 fasi/3 fasi, capacità della linea di produzione)*	
Parametri tecnologici Possibilmente indicare marca e modello dei diversi componenti dell'impianto	
Quantità di olio extra vergine/vergine da prelevare: 1 litro. Possibilmente riportare la correlazione se l'olio deriva dallo stesso oliveto da cui sono prelevate le olive **L'OLIO DEVE ESSERE CONFEZIONATO IN BOTTIGLIE DI VETRO CON TAPPO A VITE, EVITANDO PERO' SIA LA CAPSULA SALVAGOCCIA CHE TAPPI DI PLASTICA** **NOTA 2. E' MOLTO IMPORTANTE AVERE L'OLIO CHE DERIVI DALLA PARTITA DI OLIVE SOPRA PRELEVATE, ALTRIMENTI SI ATTENUA LA RAPPRESENTATIVITA' DEL CAMPIONE.** **AL SOLO FINE DI EVENTUALI CONTROLLI EX POST, POTREBBE ESSERE UTILE PRELEVARE UN CAMPIONE DI OLIO OTTENUTO PRIMA DELLA LAVORAZIONE DI QUELLO PER LA SPERIMENTAZIONE, QUESTO SAREBBE ANALIZZATO (ANCHE DA UN SOLO LABORATORIO) IN CASO DI REFERTO POSITIVO DEL CAMPIONE SPERIMENTALE.**	
Data di conferimento delle olive al frantoio (DD/MM/YY)	
Data di produzione dell'olio (DD/MM/YY)	
Parametri tecnologici: *(filtrazione a sì, se sì tecnologia di filtrazione)* Volume e materiale del tank di stoccaggio/ massa di olio	
Volume del tank / massa di olio	
Categoria merceologica di appartenenza (extra vergine, vergine, lampante o da definire)	

SAMPLES FURNISHED

Olives coming from different countries and processed both by the actual mill and by a pilot mill

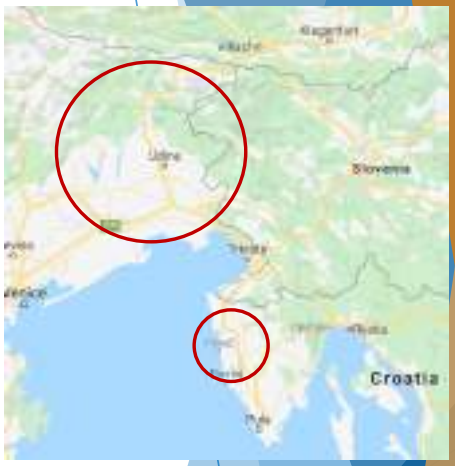


Luogo	*Azienda*	*Cultivar*	*n° campioni*	*GPS*	*Nota*	*Periodo di raccolta*
Trieste	Fior Rosso	Bianchera	1	45°36'17.4"N 13°48'52.7"E	oliveto vicino alla petroliera	Inizio raccolta (11/10/2019)
			2	45°36'16.4"N 13°48'58.1"E		
			3	45°36'21.5"N 13°49'01.0"E		
Trieste	Fior Rosso	Bianchera	1	45°36'19.5"N 13°48'55.2"E	oliveto vicino alla petroliera	Fine raccolta (30/10/2019)
			2	45°36'19.2"N 13°48'55.5"E		
			3	45°36'18.5"N 13°48'55.4"E		
Castions di strada	Tomasin	Arbequina	1	45°54'01.1"N 13°10'57.5"E		16/10/2019
			2	45°54'00.3"N 13°10'57.5"E		
			3	45°53'59.0"N 13°10'57.4"E		
		Bianchera	1	45°54'03.7"N 13°10'57.4"E		
			2	45°54'05.1"N 13°10'57.4"E		
			3	45°54'05.5"N 13°10'58.1"E		
Moruzzo di Udine	Candusso	Grignan	1	46°07'29.2"N 13°07'31.5"E		16/10/2019
			2	46°07'29.2"N 13°07'32.4"E		
			3	46°07'29.5"N 13°07'32.2"E		
Pozzuolo del Friuli	Niero	Frantoio	1	46°00'05.1"N 13°13'57.6"E	oliveto vicino ad accaieria	16/10/2019
			2	46°00'02.4"N 13°13'59.0"E		
			3	46°00'00.4"N 13°14'02.2"E		
		Bianchera	1	46°00'04.8"N 13°13'57.8"E		
			2	46°00'02.3"N 13°13'59.5"E		
			3	46°00'00.8"N 13°14'01.5"E		
Cividale del Friuli	Pasolini	Bianchera	1	46°04'27.3"N 13°26'02.3"E		17/10/2019
			2	46°04'27.4"N 13°25'59.2"E		
			3	46°04'29.3"N 13°26'00.7"E		
		Frantoio	1	46°04'26.7"N 13°26'01.4"E		
			2	46°04'27.9"N 13°25'58.5"E		
			3	46°04'28.7"N 13°26'04.0"E		
Gemona	Facchin F.	Bianchera	1	46°15'57.4"N 13°06'58.7"E		30/10/2019
		Bianchera	2	46°15'58.3"N 13°06'58.2"E		
Buje, Croazia		Leccino		/	oliveto tra i campi	13/10/2019
		Pendolino		/		
		Bianchera istriana		/		
Vosteni, Croazia		Leccino	2a	45°09'55.6"N 13°46'28.6"E	oliveto tra i campi	13/10/2019
		Pendolino	2a	45°09'55.6"N 13°46'29.2"E		
		Bianchera istriana	2a	45°09'56.8"N 13°46'26.8"E		
			2b	45°09'56.4"N 13°46'27.0"E		
			2c	45°09'56.1"N 13°46'27.2"E		
		Rosignola	2a	45°09'55.9"N 13°46'26.2"E		
			2b			
			2c	45°09'55.4"N 13°46'26.4"E		
Parenzo, Croazia		Leccino		/	oliveto dell'Istituto di Porec	14/10/2019
		Pendolino		/		
		Bianchera istriana		/		
		Rosignola		/		

OTHER SAMPLES

Friuli Venezia Giulia, Italy

Olives



Olives

Pilot mill

Olive paste
Olive pomace
Oil

Croatia

SAMPLES FURNISHED BY PORE̊, INSTITUTE OF AGRICULTURE AND TOURISM

Code on the bottle	Code of the sample	Sample description	Scale of olive oil production
1	L-CONT-a	Leccino, control-without leaf, harvest 2019	Industrial scale
2	L-CONT-b	Leccino, control-without leaf, harvest 2019	
3	L-CONT-c	Leccino, control-without leaf, harvest 2019	
4	L-LEAF-a	Leccino, with 2.5% leaf addition, harvest 2019	
5	L-LEAF-b	Leccino, with 2.5% leaf addition, harvest 2019	
6	L-LEAF-c	Leccino, with 2.5% leaf addition, harvest 2019	
1-2018	IB-0-a	Istarska bjelica, control-without leaf, harvest 2018	Laboratory scale
2-2018	IB-0-b	Istarska bjelica, control-without leaf, harvest 2018	
3-2018	IB-0-c	Istarska bjelica, control-without leaf, harvest 2018	
4-2018	IB1-2.5-a	Istarska bjelica, with 2.5% leaf addition, harvest 2018	
5-2018	IB1-2.5-b	Istarska bjelica, with 2.5% leaf addition, harvest 2018	
6-2018	IB1-2.5-c	Istarska bjelica, with 2.5% leaf addition, harvest 2018	
7-2018	IB1-5-a	Istarska bjelica, with 5% leaf addition, harvest 2018	
8-2018	IB1-5-b	Istarska bjelica, with 5% leaf addition, harvest 2018	
9-2018	IB1-5-c	Istarska bjelica, with 5% leaf addition, harvest 2018	

INFORMATION ABOUT FIELDS AND SAMPLES - harvested 2018

LOCATION	Poreč, Institute of Agriculture and Tourism
VARIETY	Istarska bjelica
GPS Coordinates of trees	45.220544 45°13´ N 13.602126 13°60´ E
Indicate if organic farming is concerned	NO
Use of protective equipment in olive cultivation, inclusion of those permitted in organic farming (if applicable, names of agents used, number of treatments and dates of treatment)	COMMERCIAL PROTECTION AGAINST DISEASES AND PESTS: 1. Cuprablau Z 0,3 % (copper), 06.04.2018.; 16.11.2018. 2. Stroby 0,02 % 09.05.2018. 3. Herbicide Glyphogan 5 l/ha 15.03.2018.; 14.11.2018. (in inter-row space) 4. Neoram 0,25 % 31.1.2018.; 28.8.2018. 5. Imidan 0,15 % 11.06.2018.; 17.9.2018. 6. Chromogor 0,15 % 28.08.2018.
The proximity to the village (indicate distance from settlement and size of settlement)	100 m, local city thoroughfares
The proximity to industrial plants (specify drive distance and drive type)	NO
The proximity to roads (indicate distance from road and traffic intensity)	500 m, local city thoroughfares
The proximity to gas stations and fuel tanks (specify the distance and dimensions of the container)	Distance of 1,5 km
The proximity of a railway with wooden railway sleepers or a bunch of discarded wooden railway sleepers (specify distance and other possible information)	NO
Other	Vineyards at 150 m, next to the forest. Foliar fertilization: Olivo Plus 9.5.2018.; 11.6.2018.; Folibor 9.5.2018.

SAMPLES PROCESSING

- extraction of the olive oil from the different matrices (olives, olive paste, olive pomace) with MAE
- drying of the matrices to report the data to the dry weight

Then, having optimized methods:

- microwave assisted saponification of the olive oils
- epoxidation of the saponified samples
- samples analysis

SUMMARIZING

- Optimization and validation of rapid and solvent sparing analytical protocols → adeguate concentration factors and good repeatability (requested by JRC guidelines)

- Investigation on the possible application of VUV detector

- Development of an on-line LC-GC-FID method to separate MOAH based on the number of aromatic rings

- Verification analysis (GCxGC) on MOAH contaminated samples

- Monitoring of the contamination level along the olive oil production chain → data collection about background levels, identification of the major sources of contamination and finding strategies to minimize the risk of contamination


THANKS FOR
YOUR ATTENTION
250 ml
HEX
1
2
3
4
UNIVERSITAS • STUDIORUM • UTINENSIS