

DGF-Einheitsmethoden	Abteilung C – Fette
Ersetze C-VI 15 (08)	C-VI 15 (18)

Pyropheophytin a

Bestimmung des relativen Anteils von Pyropheophytin a an den Chlorophyll-Abbauprodukten in nativen Ölen mittels HPLC

1 Zweck und Anwendungsbereich

Diese DGF-Einheitsmethode dient zur Bestimmung der Abbauprodukte des Chlorophyll a (Pheophytin a und a' sowie Pyropheophytin a) in nativen Speiseölen.

Abhängig vom anfänglichen Chlorophyll a-Gehalt und den Lagerbedingungen bildet sich das Abbauprodukt Pyropheophytin a vor allem durch Hitze- und Lichteinwirkung erst bei der Lagerung des Öls. Dabei wird Chlorophyll a kontinuierlich zu Pheophytin a und a' und schließlich zu Pyropheophytin a abgebaut. Frisches natives Pflanzenöl ist nahezu frei von Pyropheophytin a.

2 Definition

Der Pyropheophytin a-Gehalt wird berechnet über den Peakflächenanteil des Pyropheophytin a an der Summe der Peakflächen von Pheophytin a und a' und Pyropheophytin a (s. 12.1-12.3).

Der Gehalt an Pyropheophytin a in den Chlorophyll a-Abbauprodukten wird angegeben in Flächenprozenten.

Anm.: Hinweise zur Bestimmung von Pyropheophytin a s. auch Anhang 11.

3 Prinzip der Methode

Die neutralen Lipide werden säulenchromatographisch abgetrennt. Anschließend werden die Chlorophyll-Abbauprodukte eluiert und mittels RP18-HPLC aufgetrennt. Bei 410 nm (VIS) werden die Peakflächen von Pyropheophytin a und der Pheophytine bestimmt.

Abteilung C – Fette	DGF-Einheitsmethoden
C-VI 15 (18)	Seite 2/11

Die Quantifizierung erfolgt über den Anteil der Peakfläche von Pyropheophytin a an der Summe der Peakflächen der Pheophytine a und a' und des Pyropheophytins a.

Anmerkung: Es existiert auch eine Schnellmethode, die im Anhang der ISO-Methode 29841 beschrieben ist. Das Öl wird dabei ohne Probenaufarbeitung direkt eingespritzt, die Detektion erfolgt mittels eines Fluoreszenzdetektors. Ein Beispielchromatogramm hierzu siehe unter 10, Abb. 2b.

4 Reagenzien

Warnung: Auf die Bestimmungen, die den Umgang mit gefährlichen Stoffen regeln, wird hingewiesen. Technische, organisatorische und persönliche Schutzmaßnahmen sind zu beachten.

Soweit nicht anders angegeben

- sind analysenreine Reagenzien zu verwenden,
- muss Wasser entweder destilliert oder von entsprechender Reinheit sein,

ist unter *Lösung* eine wässrige Lösung zu verstehen.

- 4.1 Chlorophyll a, Referenzsubstanz, bei -18 °C lagern;
- 4.2 Aceton, HPLC-Qualität;
- 4.3 Methanol, HPLC-Qualität;
- 4.4 Diethylether;
- 4.5 Petrolether, Siedebereich 40 °C bis 60 °C;
- 4.6 n-Hexan;
- 4.7 Diol-Kartusche 3 mL (z.B. SupelClean TM LC-Diol SPE Tubes 3 mL) oder SPE-Kartuschen, z.B. Phenomenex Strata SI-1 Silica (55 µm, 70Å) 1000 mg/6 mL;
- 4.8 Mobile Phase für die HPLC: Wasser/Methanol/Aceton-Gemisch (Volumenanteile $\varphi = 4 \text{ mL}/100 \text{ mL}$ für Wasser, $\varphi = 36 \text{ mL}/100 \text{ mL}$ für Methanol und $\varphi = 60 \text{ mL}/100 \text{ mL}$ für Aceton);

DGF-Einheitsmethoden	Abteilung C – Fette
Seite 3/11	C-VI 15 (18)

4.9 Petrolether/Diethylether-Gemisch, mit einem Volumenanteil Petrolether $\varphi = 90$ mL/100 mL, Volumenanteil Diethylether $\varphi = 10$ mL/100 mL;

4.10 Reinstwasser für die HPLC.

5 Geräte

5.1 HPLC-Anlage, bestehend aus einer Pumpe, Injektionsventil mit 20 μ L Probenschleife oder Autosampler, thermostatisierbarem Säulenofen, einem thermostatisierbaren UV/VIS-Detektor für die Messung bei 410 nm oder einem Fluoreszenz-Detektor (Anregungswellenlänge 430 nm – Emissionswellenlänge 670 nm) sowie einem Integrationssystem;

5.2 HPLC-Säule: 250 mm lang, 4,0 mm bis 4,6 mm innerer Durchmesser, gefüllt mit RP18-Material (endcapped), Teilchengröße 5 μ m, z.B. Merck LiChrospher 100 RP-18e (5 μ m) sowie entsprechender Vorsäule;

5.3 Spitzkolben, Inhalt 10 mL und 20 mL;

5.4 Bechergläser, unterschiedliche Größen;

5.5 Messkolben, 10 und 50 mL Inhalt;

5.6 Rotationsverdampfer mit thermostatisierbarem Wasserbad und Vakuumpumpe;

5.7 Geeignete Autosampler-Fläschchen;

5.8 Analysenwaage;

5.9 Kolbenhubpipetten für Volumina von 0,2 mL, 1,0 mL und 2,0 mL.

6 Probe

6.1 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Bestandteil dieser Methode. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in den DGF-Einheitsmethoden C-I 1 bis 5 angegeben.

Abteilung C – Fette	DGF-Einheitsmethoden
C-VI 15 (18)	Seite 4/11

6.2 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Proben sind dunkel und lichtgeschützt in Glas zu lagern. Nach der Aufarbeitung sind die Proben **umgehend** zu analysieren. Der Kontakt mit Kunststoff ist zu vermeiden bzw. auf die Kartuschen zu beschränken.

7 Verfahren

- 7.1 Etwa 300 mg Analysenprobe in ein 20 mL Becherglas einwiegen, 1 mL Hexan (4.6) zugeben und die Lösung auf die mit 2 bis 3 mL Hexan vorkonditionierte Kartusche (4.7) aufgeben. Becherglas noch zweimal mit 1 mL Hexan spülen und die Lösung auf die Kartusche geben.
- 7.2 Dann die Kartusche zur Elution der unpolaren Verbindungen zweimal mit jeweils 5 mL Petrolether/Diethylether-Gemisch (4.9) waschen.
- 7.3 Anschließend die Pigmente in zwei Portionen mit jeweils 5 mL Aceton (4.2) eluieren.
- 7.4 Die vereinigten Aceton-Eluate am Rotationsverdampfer bei max. 20°C abrotieren, in 200 µL Aceton aufnehmen und sofort für die HPLC einsetzen.
Wichtige Anm.: Die Probe ist äußerst licht- und oxidationsempfindlich.
- 7.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC): Die nachfolgenden Bedingungen haben sich in der Praxis bewährt und ergeben die in Abb. 1 dargestellten Chromatogramme (s. 10):
HPLC-Säule (5.2), Eluent (4.8), Fluss: 1,0 mL/min.

DGF-Einheitsmethoden	Abteilung C – Fette
Seite 5/11	C-VI 15 (18)

8 Ergebnis der Bestimmung

8.1 Identifizierung der Peaks

Die Chromatogramme der Pigmente zeigen manchmal neben den entsprechenden Pheophytinen a, a' und Pyropheophytin a zusätzliche Peaks von Pheophytin b und b', Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b*. Die Zuordnung erfolgt anhand der Elutionsfolge in den Beispielchromatogrammen (s. 10), da aufgrund der Instabilität keine entsprechenden Referenzstandards verfügbar sind.

8.2 Quantitative Bestimmung

Anhand der Peakflächen den relativen Anteil von Pyropheophytin a (*w*) an den Chlorophyllabbauprodukten errechnen. Dabei wird angenommen, dass die Responsefaktoren aller Pigmente gleich sind.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$w = \frac{(PPP_A \cdot 100)}{(PPP_A + \sum (PP))}$$

Hierin bedeuten:

PPP_A Peakfläche von Pyropheophytin a

$\sum(PP)$ Summe der Peakflächen der Pheophytin a und a'

Das Ergebnis mit 1 Dezimalstelle angeben.

8.3 Genauigkeit (Präzision) der Methode

Die Angaben zur Wiederholgrenze und Vergleichsgrenze* bei dieser Methode sind das Ergebnis eines im Jahr 2005 auf internationaler Basis von der DGF mit nativen Olivenölen durchgeführten Ringversuches (Tab. 1) mit folgenden Daten:

* Die Auswertung des Ringversuches erfolgte nach der DGF-Einheitsmethode A-II 1: *Durchführung und Auswertung von Ringversuchen und nach ISO 5725:1994: Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren – Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens.*

Abteilung C – Fette	DGF-Einheitsmethoden
C-VI 15 (18)	Seite 6/11

Tab. 1: Ergebnisse der statistischen Auswertung des Ringversuchs

Art der Probe	A	B	C	D	E
Anzahl der teilnehmenden Laboratorien	16	16	16	16	16
Anzahl der nicht eliminierten Laboratorien	12	12	14	15	15
Anzahl der Einzelergebnisse aller Laboratorien je Probe (z)	24	24	28	30	30
Mittelwert (m), %	28,86	34,01	5,63	6,26	84,75
Wiederholstandardabweichung (s_r), %	0,53	0,61	0,59	0,36	1,09
Variationskoeffizient der Wiederholstandardabweichung VK (s_r), %	1,8	1,8	10,5	5,8	1,3
Wiederholgrenze r ($s_r \times 2,8$), %	1,48	1,7	1,65	1,01	3,05
Vergleichstandardabweichung (s_R), %	1,78	2,08	0,79	1,29	3,06
Variationskoeffizient der Vergleichstandardabweichung VK (s_R), %	6,2	6,1	14,1	20,7	3,6
Vergleichgrenze R ($s_R \times 2,8$), %	4,98	5,82	2,21	3,61	8,56

8.4 Wiederholgrenze (r)

Die Wiederholgrenze (r) ist derjenige Wert, kleiner oder gleich dem die absolute Differenz zwischen zwei Prüfergebnissen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % unter Wiederholbedingungen erwartet werden kann.

Die Wiederholbedingungen beinhalten, dass die voneinander unabhängigen Prüfergebnisse mit demselben Verfahren an identischem Prüfmaterial im selben Laboratorium (derselbe Bearbeiter, dieselben Geräte, innerhalb kurzer Zeitabstände) ermittelt werden.

DGF-Einheitsmethoden	Abteilung C – Fette
Seite 7/11	C-VI 15 (18)

8.5 Vergleichsgrenze (R)

Die Vergleichsgrenze (R) ist derjenige Wert, kleiner oder gleich dem die absolute Differenz zwischen zwei Analysenergebnissen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % unter Vergleichsbedingungen erwartet werden kann.

Die Vergleichsbedingungen beinhalten, dass die voneinander unabhängigen Prüfergebnisse mit demselben Verfahren an identischem Prüfmaterial in verschiedenen Laboratorien (verschiedene Bearbeiter, verschiedene Geräte, innerhalb kurzer Zeitabstände) ermittelt werden.

9 Analysenbericht

Das Ergebnis der Bestimmung ist unter Hinweis auf diese Methode (und das benutzte Verfahren, falls mehrere in der Methode beschrieben sind) anzugeben. Ferner sind alle Angaben zur Identifizierung der Probe, gegebenenfalls alle Sonderbehandlungen, alle Arbeitsschritte, die nicht in der Methode erwähnt sind, und gegebenenfalls die ausgewählte Auswertemethode im Protokoll aufzuführen.

10 Chromatogramme

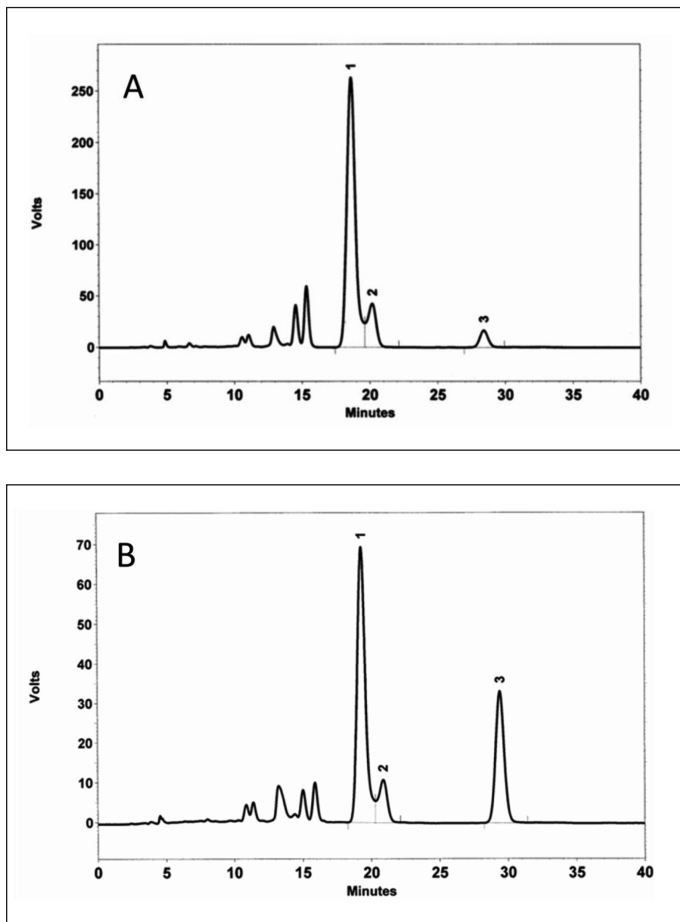


Abb. 1: HPLC Chromatogramme mit Fluoreszenz-Detektion – Öl mit 5 % (A) und 30 % (B) Pyropheophytin. Peakzuordnung: 1 Pheophytin a, 2 Pheophytin a', 3 Pyropheophytin

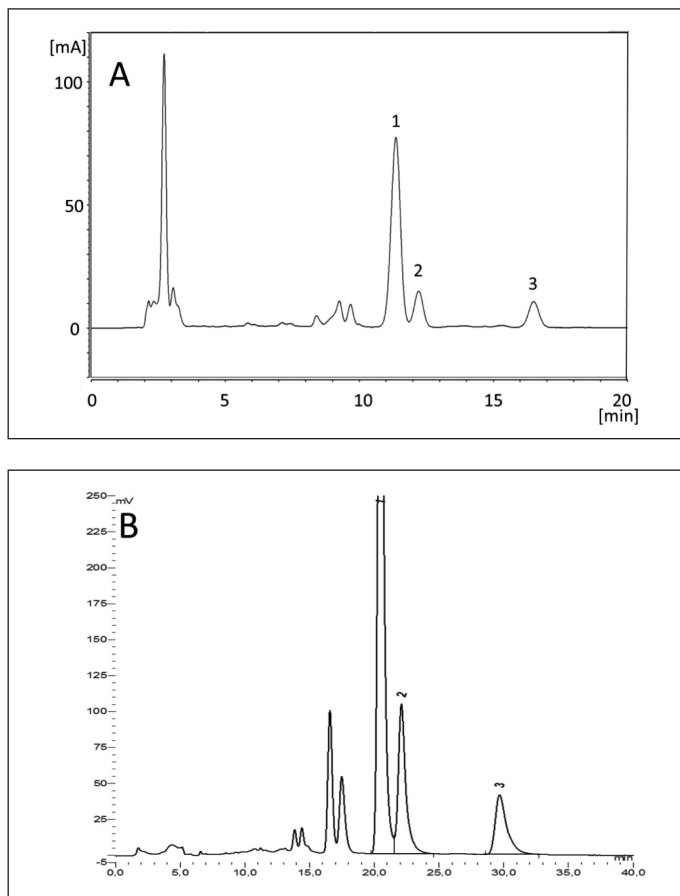


Abb. 2: HPLC-Chromatogramme – Olivenöl mit 11 % Pyropheophytin. A) nach DGF-Einheitsmethode C-VI 15 aufgearbeitet, UV/VIS-Detektion bei 410 nm und B) nach der in der Anmerkung unter 3) angegebenen und im Anhang zur ISO-Methode aufgeführten Schnellmethode aufgearbeitet (Fluoreszenz-Detektion). Peakzuordnung: 1 Pheophytin a, 2 Pheophytin a', 3 Pyropheophytin a

Abteilung C – Fette	DGF-Einheitsmethoden
C-VI 15 (18)	Seite 10/11

11 Anhang

Die DGF-Einheitsmethode C-VI 15 (18) beschreibt eine Methode zur Bestimmung der Abbauprodukte des Chlorophyll a bzw. der Pheophytine in nativen pflanzlichen Ölen und Fetten. Bei der Lagerung von Ölen wird Chlorophyll a kontinuierlich zu Pheophytin a und a' und schließlich zu Pyropheophytin abgebaut. Dieser Abbau wird durch Wärme beschleunigt, aber auch durch andere Einflüsse (z.B. endogene Enzyme während der Verarbeitung, Sauerstoff und Licht während der Lagerung).

Die genannten Farbstoffe werden zu Hydroxy-Pheophytin a, Hydroxy-Lacton-Pheophytin a und schließlich zu farblosen Reaktionsprodukten abgebaut. Frische Pflanzenöle und auch frisches natives Olivenöl sind nahezu frei von Pyropheophytin a, Hydroxy-Pheophytin a und Hydroxy-Lacton-Pheophytin a.

Für die Bestimmung werden die neutralen Lipide säulenchromatographisch abgetrennt und im Eluat die Peakflächen von Pyropheophytin a und der Pheophytine mittel RP18-HPLC bei 410 nm (VIS) oder mit einem Fluoreszenzdetektor bestimmt. Der Pyropheophytin a-Gehalt wird berechnet über den Peakflächenanteil des Pyropheophytin a an der Summe der Peakflächen der Pheophytine a und a' und des Pyropheophytins a. Der Anteil des Öles an Pyropheophytin a an den Chlorophyll a-Abbauprodukten wird in (Flächen-)Prozent angegeben.

Beurteilung: Der Gehalt an Pyropheophytin a kann zur Beurteilung der Qualität und des Alters von Olivenölen hilfreich sein. Er gibt auch einen Hinweis auf eine erfolgte Wärmebehandlung. Zusammen mit anderen Parametern, z.B. den isomeren Diacylglycerinen und der Sensorik, kann er Herstellern, Vertreibern und der Lebensmittelüberwachung ein Bild über die Beschaffenheit des Produkts verschaffen. Die Australian Olive Association hat die DGF-Methode übernommen und folgenden Richtwert für verkehrsfähige Öle festgelegt: Pyropheophytine ≤ 17 % bezogen auf die Chlorophyll a-Abbauprodukte Pheophytine und Pyropheophytine. Inzwischen wurden die Methode und der australische Wert auch in den USA als

DGF-Einheitsmethoden	Abteilung C – Fette
Seite 11/11	C-VI 15 (18)

Qualitätsparameter zur Beurteilung nativer Olivenöle übernommen (CDFA Standard for Olive Oil, Refined Olive Oil and Olive Pomace Oil, 2015). In der Verordnung der Europäischen Union und dem Standard des IOC für Olivenöl sind derzeit weder die Methode noch ein Grenzwert zu diesem Methodenparameter aufgeführt. Untersuchungen an europäischen bzw. in Europa vertriebenen Olivenölen haben gezeigt, dass eine Orientierung an den australischen Werten auch in Europa möglich ist. Die DGF-Methode wurde 2009 auch vom ISO/TC 34/SC 11 (Animal and vegetable fats and oils) übernommen und ist als ISO 29841:2009 verfügbar.

12 Literatur

- 12.1 A. Serani, D. Piacenti: Sistema analitico per l'identificazione di oli deodorati in oli vergini di oliva Nota 1 – Analisi di pigmenti clorofilliani in oli vergini di oliva. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **78** (2001) 459-463.
- 12.2 K. Aitzetmüller: Chlorophyll-Abbauprodukte in pflanzlichen Ölen. *Fat Sci. Technol.* **91** (1989) 99-105.
- 12.3 L. Gallardo-Guerrero, B. Gandul-Rojas, M. Roca and M.I. Mínguez-Mosquera: Effect of Storage on the Original Profile of Spanish Virgin Olive Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **82** (2005) 33-39.
- 12.4 R. Aparicio-Ruiz, M.I. Mínguez-Mosquera and B. Gandul-Rojas: Thermal degradation kinetics of chlorophyll pigments in virgin olive oils. 1. Compounds of series a. *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 6200–6208.
- 12.5 F. Caponio, M.T. Bilancia, A. Pasqualone, E. Sikorska and T. Gomes: Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *Eur. Food Res. Technol.* **221** (2005) 92–98.

DGF Standard Methods	Section C – Fats
Replaces C-VI 15 (08)	C-VI-15 (18)

Pyropheophytin a

Determination of the relative amount of pyropheophytin a in chlorophyll degradation products of virgin oils by HPLC

1 Scope and field of application

This method describes a procedure for the determination of the degradation products of chlorophyll a (pheophytin a, a' and pyropheophytin a) in virgin edible oils.

The formation of the degradation product pyropheophytin a depends on the initial chlorophyll a content and the storage conditions and is mostly affected by heat and light during storage. Chlorophyll a is degraded continuously to pheophytin a and a' and finally to pyropheophytin a. Fresh vegetable oil is virtually free of pyropheophytin a.

2 Definition

The *pyropheophytin a content* is calculated from the peak area of pyropheophytin a relative to the sum of the peak areas of all individual pheophytins and pyropheophytins (see 12.1 – 12.3).

The content of pyropheophytin a in all chlorophyll a degradation products is expressed as area percentage.

Note: References about the determination of pyropheophytin a see also appendix II.

3 Principle of the method

Neutral lipids are removed by column chromatography. The chlorophyll degradation products are subsequently eluted and separated using RP-18-HPLC. Peak-areas of pyropheophytin a and of pheophytins are detected at 410 nm (VIS).

Section C – Fats	DGF Standard Methods
C–VI 15 (18)	Page 2/11

The ratio of the peak area of pyropheophytin a to the sum of all peak areas of pheophytin a and a' and pyropheophytin a serves for quantification.

Note: There is also a rapid method, which is described in ISO method 29841. According to this method, the oil is injected directly without sample preparation and detection is achieved by a fluorescence detector. See section 10 for an example chromatogram.

4 Reagents

WARNING: Attention is drawn to the regulations which specify the handling of hazardous substances. Technical, organizational and personal safety measures must be followed.

Unless otherwise stated

- analytically pure reagents are to be used;
- water must be either distilled or of corresponding purity;
- a solution is understood to be an aqueous solution.

- 4.1 Chlorophyll *a*, reference substance, store at -18 °C;
- 4.2 Acetone, HPLC grade;
- 4.3 Methanol, HPLC grade;
- 4.4 Diethyl ether;
- 4.5 Petroleum ether, boiling range 40 °C to 60 °C;
- 4.6 n-Hexane;
- 4.7 Diol cartridge 3 mL (e.g. SupelClean LC-Diol TM SPE tubes 3 mL) or for example Phenomenex Strata SI-1 silica (55 µm, 70 Å) 1000 mg/6 mL SPE cartridges;
- 4.8 Mobile phase for the HPLC: Water/methanol/acetone-mixture (volume fraction φ = 4 mL/100 mL for water, φ = 36 mL/100 mL for methanol, φ = 60 mL/100 mL for acetone).

DGF Standard Methods	Section C – Fats
Page 3/11	C–VI 15 (18)

- 4.9 Petroleum ether/diethyl ether solvent mixture, with a volume fraction $\varphi = 90$ mL/100 mL for petroleum ether and $\varphi = 10$ mL/100 mL for diethyl ether;
- 4.10 Ultrapure water for HPLC.

5 Apparatus

- 5.1 HPLC-system, consisting of a pump, a sample-injecting device with a 20 μ L loop or autosampler, a temperature controlled column oven and VIS-detector for measurements at 410 nm or a fluorescence detector (excitation wavelength 430 nm – emission wavelength 670 nm) and an integration system;
- 5.2 HPLC column: 250 mm length, 4,0 mm or 4,6 mm internal diameter, with reversed-phase type RP 18 endcapped filling of particle size 5 μ m, for example Merck LiChrospher 100 RP-18e (5 μ m) with a pre-column;
- 5.3 Taper-shaped flask, of capacity 10 or 20 mL;
- 5.4 Beakers, in several sizes;
- 5.5 Volumetric flasks, of capacities 10 mL and 50 mL;
- 5.6 Rotary evaporator, with temperature controlled water bath and vacuum pump;
- 5.7 Autosampler vials, of suitable capacity;
- 5.8 Analysis balance;
- 5.9 Piston pipettes for volumes of 0,2 mL, 1,0 mL and 2,0 mL.

6 Sample

6.1 Sampling

Sampling is not part of this method. A recommended sampling method is given in DGF standard methods C-I 1 to 5.

Section C – Fats	DGF Standard Methods
C–VI 15 (18)	Page 4/11

6.2 Preparation of the test sample

Test samples should be stored cold and protected from light in glass vessels. After clean-up, the test solutions must be analysed ***immediately***. Contact with plastics must be avoided or limited to cartridges, only.

7 Procedure

- 7.1 Weigh about 300 mg of the test sample into a 20 mL beaker, dissolve in 1 mL of hexane (4.6) and pour the solution onto the diol cartridge (4.7) with additional 2 to 3 mL of hexane. Rinse the beaker twice with 1 mL portions of hexane and pour the combined solutions onto the diol cartridge.
- 7.2 Wash the cartridge twice with 5 mL mixture of petroleum ether/diethyl ether (4.9) each time to elute the non polar substances.
- 7.3 Elute the pigment fraction in two portions each with 5 mL acetone.
- 7.4 Evaporate the combined acetone eluates to dryness in a rotary evaporator at max 20 °C. Dissolve the residue in 200 µL of acetone. Use this solution immediately for the HPLC.

Important note: Pheophytins are very unstable in light and oxidise easily.

- 7.5 High-pressure liquid chromatography (HPLC): The following conditions have been found to be suitable and give the chromatograms shown in the annex 10, fig. 1a and 1b:
HPLC column (5.2), eluent (4.8), flow: 1,0 mL/min.

DGF Standard Methods	Section C – Fats
Page 5/11	C–VI 15 (18)

8 Results of the determination

8.1 Peak identification

Sometimes the chromatograms of the pigments show besides the corresponding pheophytins and pyropheophytins additional peaks of pheophytin b and b', chlorophyll a and chlorophyll b. The identification of the peaks is done according to elution order in the chromatograms of test samples (see 10) as there are no reference standard substances available due to their instability.

8.2 Quantitative determination

Calculate the relative amount of pyropheophytin a (*w*) in the chlorophyll degradation products using area percentage. For this purpose it is assumed that the response factors of all pigments are equal.

Calculate using the formula:

$$w = \frac{(PPP_A \cdot 100)}{(PPP_A + \sum (PP))}$$

where

PPP_A is the peak area of pyropheophytin a;

$\sum(PP)$ is the sum of peak areas of pheophytin a and a'.

Report the result to one decimal place.

8.3 Precision of the method

The data for repeatability limit and precision limit for this method are the result of an interlaboratory study organized by DGF on an international basis*. The study was carried out in 2005 on five samples of virgin olive oils. The results are given in table 1.

* Evaluated according to DGF Standard Method A-II 1 "Execution and evaluation of ring tests" and "ISO 5725:1994, Precision of test methods Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by interlaboratory tests".

Section C – Fats	DGF Standard Methods
C–VI 15 (18)	Page 6/11

Tab. 1: Summary of statistical results

Sample	A	B	C	D	E
Number of participating laboratories (N)	16	16	16	16	16
Number of laboratories retained after eliminating outliers (n)	12	12	14	15	15
Number of individual test results of all laboratories on each sample (z)	24	24	28	30	30
Mean value (m), %	28,86	34,01	5,63	6,26	84,75
Repeatability standard deviation (s_r), %	0,53	0,61	0,59	0,36	1,09
Repeatability coefficient of variation (RCV_r), %	1,8	1,8	10,4	5,8	1,3
Repeatability limit r ($s_r \times 2,8$), %	1,48	1,71	1,65	1,01	3,05
Reproducibility standard deviation (s_R), %	1,78	2,08	0,79	1,29	3,06
Reproducibility coefficient of variation (RCV_R), %	6,2	6,1	14,1	20,7	3,6
Reproducibility limit R ($s_R \times 2,8$), %	4,98	5,82	2,21	3,61	8,56

8.4 Repeatability limit (r)

The repeatability limit (r) is the value less than or equal to the absolute difference between two test results which can be expected with a probability of 95 %, under repeatability conditions.

Repeatability conditions are defined as conditions under which test results are obtained with the same method, on identical test material, in the same laboratory, by the same operator, using the same equipment and reagents, within a short interval of time.

DGF Standard Methods	Section C – Fats
Page 7/11	C–VI 15 (18)

8.5 Reproducibility limit (R)

The reproducibility limit (R) is the value less than or equal to the absolute difference between two test results which can be expected with a probability of 95 %, under reproducibility conditions.

Reproducibility conditions are defined as conditions under which test results are obtained with the same method, on identical test material, in different laboratories, by different operators, using different equipment and reagents, within a short interval of time.

9 Test report

The result of the determination must be stated in the report together with a reference to this method (and the used procedure, in case that there are different procedures described). Furthermore, the report must include all details required to identify the sample, and, if necessary, all special treatments and operations not specified within the method and possibly, the selected evaluation method.

10 Chromatograms

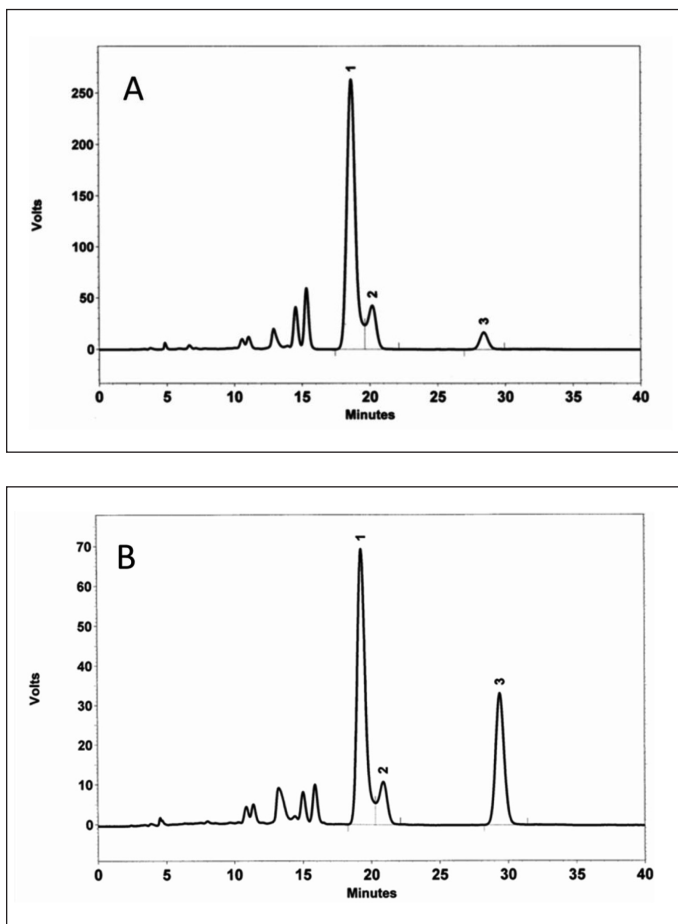


Fig. 1: HPLC chromatogram with fluorescence detection - oil with 5 % (A) and 30 % (B) pyropheophytin. Peak identification: 1 pheophytin a, 2 pheophytin a', 3 pyropheophytin

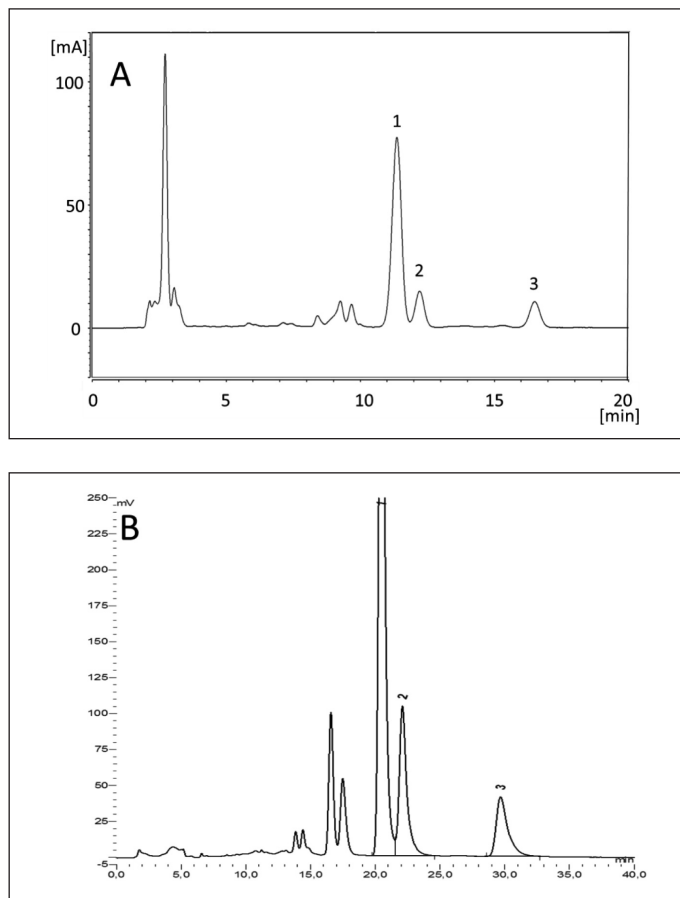


Fig. 2: HPLC chromatograms – olive oil with 11 % pyropheophytin. A) prepared according to DGF standard method C-VI 15 with UV/VIS detection at 410 nm and B) carried out according to the the ISO rapid method referred to in the note in section 3 and in annex of the referred ISO method (fluorescence detection). Peak identification: 1 pheophytin a, 2 pheophytin a', 3 pyropheophytin a

Section C – Fats	DGF Standard Methods
C–VI 15 (18)	Page 10/11

11 Apendix

DGF standard method C-VI 15 (08) describes a procedure for the determination of the degradation products of chlorophyll a and pheophytins in virgin vegetable fats and oils. During the storage of oils chlorophyll a is continuously degraded to pheophytin a and a' and finally to pyropheophytin. This degradation is promoted by heat and moreover due to other influences (e.g. endogenic enzymes during processing, oxygen and light during storage).

These pigments are decomposed to hydroxy-pheophytin a, hydroxy-lacton-pheophytin a und finally to colourless reaction products. Fresh virgin olive oil does not contain pyropheophytin a, hydroxy-pheophytin and hydroxy-lacton-pheophytin a.

For the determination the neutral lipids are separated by column chromatography, the peak areas of pyropheophytin a and of pheophytine are determined in the eluate by means of RP18-HPLC with detection at 410 nm (VIS) or by fluorescence detector. The pyropheophytin a content is calculated from the peak area of pyropheophytin a relative to the sum of all peak areas of pheophytins a and a' and pyropheophytin a. The content of pyropheophytin a is expressed as a percentage by area of all chlorophyll a degradation products.

Assessment: The content of pyropheophytin a can be used for the assessment of the quality and the age of virgin olive oils. It gives also indications about any heat treatment. Together with other parameters, e.g. isomerised diacylglycerols and organoleptic assessment, these values are helpful parameters about the product for the producers, sellers, buyers and the official food control laboratories. The Australian Olive Association has adopted this DGF standard method and set up the following limit for virgin olive oils, fit for human consumption: Pyropheophytine $\leq 17\%$ related to all chlorophyll a degradation products (pheophytins and pyropheophytins). In the meantime, the method and the Australian limit has been adopted in the USA as quality parameters for virgin olive oils (CDFA Standard for Olive Oil, Refined Olive Oil and Olive Pomace Oil, 2015). The

DGF Standard Methods	Section C – Fats
Page 11/11	C–VI 15 (18)

regulations of the European Union and the Trade Standard for Olive oil of the IOC do not contain the method or the limit for this parameter. Analyses of European virgin olive oils and imported virgin olive oils have shown that these values can be used as orientation also in Europe. The DGF standard method has been adopted by ISO/TC 34/SC 11 (Animal and vegetable fats and oils) in 2009 and is available as ISO 29841:2009.

12 References

- 12.1 A. Serani, D. Piacenti; Sistema analitico per l'identificazione di oli deodorati in oli vergini di oliva Nota 1 Analisi di pigmenti clorofilliani in oli vergini di oliva, *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **78** (2001) 459-463.
- 11.2 K. Aitzetmüller; Chlorophyll-Abbauprodukte in pflanzlichen Ölen, *Fat Sci. Technol.* **91** (1989) 99-105.
- 11.3 L. Gallardo-Guerrero, B. Gandul-Rojas, M. Roca, M.I. Mínguez-Mosquera; Effect of Storage on the Original Profile of Spanish Virgin Olive Oil; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **82** (2005) 33-39.
- 12.4 R. Aparicio-Ruiz, M.I. Mínguez-Mosquera and B. Gandul-Rojas: Thermal degradation kinetics of chlorophyll pigments in virgin olive oils. 1. Compounds of series a. *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 6200–6208.
- 12.5 F. Caponio, M.T. Bilancia, A. Pasqualone, E. Sikorska and T. Gomes: Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *Eur. Food Res. Technol.* **221** (2005) 92–98.

