

DGF-Einheitsmethoden	Abteilung C – Fette
Ersetzt C-VI 13a (98)	C-VI 13a (22)

HPLC der Triglyceride „Fingerprint“-Methode

Qualitative Bestimmung der Zusammensetzung der Triglyceride

1 Zweck und Anwendungsbereich

Diese DGF-Einheitsmethode beschreibt ein Verfahren, das die Auftrennung der einzelnen Triglyceride (Triacylglycerine) und Triglyceridgruppen in gängigen Nahrungsfetten und -ölen mittels HPLC ermöglicht. Die verschiedenen Triglyceride werden nach der Partition number (PN), also sowohl nach der Carbon number (CN), wie auch nach der Anzahl der Doppelbindungen (DB) und bis zu einem gewissen Grad darüber hinaus, aufgetrennt und durch einen Brechungsindex-Detektor (RI-Detektor) angezeigt. Die Methode erlaubt eine schnelle Unterscheidung einer Reihe von Ölen anhand ihrer charakteristischen Zusammensetzung „Fingerprint“. Die Position der Fettsäuren innerhalb des Triglycerids kann charakteristisch für die botanische Herkunft sowie den Verarbeitungszustand (Härte, Umesterung) sein.

Diese Methode ist anwendbar auf die meisten pflanzlichen und tierischen Öle und Fette. Bei einigen komplizierter zusammengesetzten Fetten, wie Milchfett (Butter), partiell gehärteten Fetten mit *trans*-Fettsäuren oder Fetten mit besonderen Fettsäuren wie γ -Linolensäure, Petroselinensäure oder langkettigen, hochungesättigten Fettsäuren (Fischölen) sowie bei einigen Margarine-Fettkompositionen und Mischfetten, die Milchfett enthalten, ist die Methode nur bedingt anwendbar.

Abteilung C – Fette	DGF-Einheitsmethoden
C-VI 13a (22)	Seite 2/12

2 Definition

Als „Fingerprint“ eines Fettes oder Öles wird das nach dieser Methode ermittelte HPLC-Chromatogramm der Triglyceride bezeichnet.

3 Prinzip der Methode

Eine Lösung des Öles oder Fettes in Aceton wird direkt in die HPLC-Anlage injiziert. Aus den unter kontrollierten Bedingungen mittels Reversed-Phase HPLC und Brechungsindexdetektion erhaltenen Peak-Mustern («Fingerprints») können durch Vergleich mit bekannten Proben Rückschlüsse auf die Identität des Fettes gezogen werden.

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 und für die HPLC geeignete Reagenzien zu verwenden;
- sind mobile Phasen vor Einführung in die HPLC-Anlage ggf. zu filtrieren und ausreichend zu entgasen.

4.1 Aceton;

4.2 Acetonitril;

4.3 Mobile Phase: Aceton in Acetonitril in geeignetem Mischungsverhältnis, z. B. zwischen $\varphi^* = 500$ bis 750 mL/L. Das Mischungsverhältnis von Aceton zu Acetonitril so einstellen, dass sich eine Trennung gem. Abschnitt 7.2 und Abb. 1 und 2 ergibt.

* φ = Volumenanteil

DGF-Einheitmethoden	Abteilung C – Fette
Seite 3/12	C-VI 13a (22)

Anm.: Beim Entgasen oder Filtrieren auf Veränderungen durch Verdunsten achten! Propionitril als HPLC-Fließmittel führt in der Regel zu ganz anderen Ergebnissen; es ist hier weniger gut geeignet.

5 Geräte

- 5.1 HPLC-Pumpe;
- 5.2 Einspritzsystem mit Probenschleife, 20 µL Inhalt;
- 5.3 C18-Reversed-Phase-HPLC-Säule mit hoher Belegung, je nach Trennleistung 250 mm lang oder 2 Säulen in Serie (2 x 250 mm), innerer Durchmesser ca. 4 mm, gepackt mit kugelförmigen Teilchen (5 µm); evtl. mit Säulentemperiereinrichtung. Art, Alter und Vorgeschichte der Säule, die Belegung des Säulenfüllmaterials sowie die Temperatur beeinflussen die Trennung (vgl. 7.1);
- 5.4 Mikroliterspritze, 100 µL Inhalt;
- 5.5 Aufzeichnungs- bzw. Integrationssystem.

6 Probe

6.1 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Bestandteil dieser Methode. Zur Untersuchung die nach C-I 1 bis 5 entnommenen und vorbereiteten Proben heranziehen.

6.2 Vorbereitung der Endprobe

- 6.2.1 Feste und halb feste Proben etwas über die Schmelztemperatur erwärmen, gut durchmischen und in Aceton lösen.
- 6.2.2 Flüssige bzw. aufgeschmolzene Proben, die noch sichtbare Verunreinigungen enthalten, bzw. deren Lösungen, filtrieren.

Abteilung C – Fette	DGF-Einheitmethoden
C-VI 13a (22)	Seite 4/12

7 Verfahren

7.1 Vorbereitung des Analysensystems

7.1.1 Bedingungen im chromatographischen System mithilfe von Testgemischen oder Referenzproben so einstellen, dass sich einsäurige und gemischtsäurige Triglyceride mit gleicher Partition Number, für die aber $PN^1 \neq CN$ gilt, möglichst gut voneinander trennen. Bei gesättigten Triglyceriden mit $PN = CN$ erfolgt keine Trennung zwischen einsäurigen und gemischtsäurigen Triglyceriden. Eine Auflösung entsprechend Abb. 1 und 2 dient als Vorbild. Temperaturunterschiede haben einen Einfluss auf die Trennselektivität.

*Anm.: Partition Number (PN) = C-Zahl (CN) minus zweimal die Anzahl der Doppelbindungen (DB): $PN = CN - 2 * DB$;*

*Für Triolein (OOO) gilt: $PN = 54 - 2 * 3 = 48$;*

*Für Palmito-linoleo-olein (PLO) gilt: $PN = 52 - 2 * 3 = 46$;*

PN in Tab. 1 entspricht hier der ganzzahligen Partition Number und sagt nichts über die tatsächlich beobachtete Elutionsreihenfolge aus.

Verwendete Abkürzungen für die Fettsäuren:

Co	Capronsäure	C6:0	P	Palmitinsäure	C16:0
Cy	Caprylsäure	C8:0	S	Stearinsäure	C18:0
C	Caprinsäure	C10:0	O	Ölsäure	C18:1
La	Laurinsäure	C12:0	L	Linolsäure	C18:2
M	Myristinsäure	C14:0	Ln	Linolensäure	C18:3

Durch die Wahl eines geeigneten Eluenten lassen sich auch Triglyceride mit derselben PN trennen (siehe DGF Einheitmethode C-VI 13b).

7.1.2 Für die Trennung der Triglyceride ist eine lange (mehrstündige) Equilibrierungsphase des Systems erforderlich. Ansonsten kann es in der Sequenz zu Retentionszeitverschiebungen kommen.

DGF-Einheitmethoden	Abteilung C – Fette
Seite 5/12	C-VI 13a (22)

7.2 Analyse eines oder mehrerer Testgemische

Anm.: Einsäurige und gemischtsäurige Triglyceride sind einzeln und im Gemisch käuflich erhältlich. Aus einsäurigen Triglyceriden können dazu durch Umesterung (Erhitzen mit katalytischen Mengen Natrium oder Natriummethylat) gezielt gemischtsäurige Triglyceride hergestellt werden.

Das hydrierte Umesterungsprodukt aus Palmkernfett und Palmöl (vgl. Abb. 1c und 1d) eignet sich sehr gut zur Feststellung der Retentionszeiten der gesättigten Triglyceride im Kettenlängenabstand von 2 Kohlenstoffatomen und somit eignet es sich auch zur Berechnung von EPN- bzw. ECN-Werten (vgl. DGF Einheitsmethode C-VI 13b) ungesättigter Triglyceride durch Interpolation zwischen den benachbarten gesättigten Triglyceriden.

Der Vergleich der Retentionszeiten der Peaks von Abb. 1c und 1d zeigt deutlich den außerordentlich großen Einfluss des Mischungsverhältnisses der mobilen Phase.

Verwendete Abkürzungen z. B.:

MPP = Myristoyldipalmitoyl-, OOO = Trioleoyl-, POO = Palmitoyldioleoyl-, POP = Oleoyldipalmitoyl-, PPP = Tripalmitoyl-, PPS = Stearoyldipalmitoyl-, PSS = Palmitoyldistearoyl-Glycerin. Bei MPP, POO, PPS und PSS ist die Summe aller Positionsisomeren gemeint.

In der Reversed-Phase HPLC – das ist der Normalfall in der Triglycerid-HPLC – werden Stellungsisomere am Glycerin nicht getrennt. Hier hat es sich eingebürgert, Peak-Kurzbezeichnungen für Triglyceride zu verwenden, also z. B. POP oder PLO (vgl. Tab. 1). Dabei gilt die Regel, dass damit stets alle Stellungsisomeren gemeint sind bzw. deren Summe. Ausnahme: Diese Regel gilt ausdrücklich nicht für die HPLC auf Silbernitratssäulen, wo eine symmetrisch/unsymmetrisch-Trennung – d. h. POP von PPO – eintreten kann.

Als Testgemisch besonders geeignet sind neben Palmöl vor allem auch umgeesterte Gemische aus voll hydriertem Palmkernfett und

Abteilung C – Fette	DGF-Einheitsmethoden
C-VI 13a (22)	Seite 6/12

voll hydriertem Palmöl und umgeesterte Gemische aus Triolein mit gesättigten Triglyceriden. Dabei ist darauf zu achten, dass Triglyceride mit 2 Ölsäureresten nicht mit den um 2 *PN*-Einheiten niedrigeren gesättigten Triglyceriden überlappen (z. B. SOO mit PPP in Tab. 1; vgl. auch Palmöl in DGF Einheitsmethode C-VI 13c).

7.3 Messung der Probe

- 7.3.1 Vorbehandelte unbekannte Probe in Aceton in geeigneter Konzentration lösen, ggf. filtrieren und in das HPLC-System einspritzen. Konzentration je nach Löslichkeit der Probe und Empfindlichkeit des verwendeten Detektors einstellen; bei Palmöl z. B. $\rho^* = 50 \text{ mg/mL}$ in Aceton, bei schwerlöslichen Fetten weniger konzentrierte Lösungen verwenden. Auf vollständige Lösung ist zu achten!
- 7.3.2 Liegen Proben vor, deren Fettsäurezusammensetzung nicht bekannt ist, so ist es hilfreich, diese zunächst gaschromatographisch nach DGF-Einheitsmethode C-VI 10 und C-VI 11 zu ermitteln.

8 Ergebnis der Bestimmung

- 8.1 Das Ergebnis der Untersuchung ist ein „Fingerprint“ (Chromatogramme wie in Abb. 1 und 2), der mit dem entsprechenden „Fingerprint“ eines bekannten Öles verglichen wird.
- 8.2 Die Quantifizierung ist bei dieser Methode nur bedingt möglich, da der Responsefaktor der einzelnen Triglyceride auf Grund der unterschiedlichen molaren Refraktionen stark differiert. Die Flächenverhältnisse bestimmter Triglyceride können im Einzelfall charakteristisch und von Interesse sein (vgl. DGF-Einheitsmethode C-VI 13c).

* $\rho =$ Massenkonzentration

DGF-Einheitmethoden	Abteilung C – Fette
Seite 7/12	C-VI 13a (22)

Anm.: Flächenprozent-Ergebnisse bei Brechungsindex-Detektoren sind grundsätzlich fließmittelabhängig! Bei Brechungsindexdetektoren ändern sich prinzipiell die relativen Response-Faktoren bei einer Änderung der Zusammensetzung der Mobilien Phase. Bei Anwendung als reine „Fingerprint“-Methode ist dies unwichtig. Sollen semiquantitative Daten (z. B. Peakflächen-Verhältnisse, Flächenprozent) ermittelt werden, so ist dies jedoch zu berücksichtigen.

Bei der Ermittlung der Flächenprozente für die einzelnen Peaks muss ferner berücksichtigt werden, dass die Brechungsindizes der höher ungesättigten Triglyceride größer sind als die der gesättigten Triglyceride. Die so gefundenen Flächenprozente lassen sich daher nicht verallgemeinern und vor allem auch nicht zwischen verschiedenen Ölsorten vergleichen. Bei Vergleich innerhalb ein und desselben Öles (z. B. Probe A Sojaöl mit Probe B Sojaöl) lassen sich jedoch gewisse Aussagen treffen. In bestimmten Fällen wie z. B. bei Palmölen (vgl. DGF-Einheitmethode C-VI 13c), bei Mandelölen, Olivenölen usw. können bestimmte Peakflächen-Verhältnisse besonders aussagekräftig sein oder zur Charakterisierung der Öle und ggf. zum Nachweis von Vermischungen herangezogen werden. Für absolute quantitative Angaben ist die individuelle Ermittlung systemabhängiger Response-Faktoren für die einzelnen Peaks unerlässlich.

Die Berechnung des Anteils der einzelnen Triglyceride in Flächenprozent werden nach folgender Formel durchgeführt:

$$AF_{TG} = \frac{A_{TGI}}{A_T} * 100$$

Hierin bedeuten:

- A_{FTG} Anteil des Triglycerids in %;
- A_{TGI} Peakfläche des Triglycerids i ;
- A_T Summe der Peakfläche aller Triglyceride.

Abteilung C – Fette	DGF-Einheitsmethoden
C-VI 13a (22)	Seite 8/12

- 8.3 Die Zuordnung der Peaks erfolgt über ihre Retention, durch Vergleich mit bekannten Ölen oder Triglycerid-Testgemischen bzw. über für das jeweilige chromatographische System berechnete spezifische EPN-(ECN-)Zahlen.

Anm.: Zur Berechnungsweise, Einfluss von System-Parametern usw. vgl. DGF-Einheitsmethode C-VI 13b.

9 Analysenbericht

Bei der Darstellung von Ergebnissen als Flächenprozent oder als Peakflächenverhältnis bestimmter Peaks ist das Ergebnis unter Hinweis auf diese Methode und individuelle Arbeitsbedingungen (Fließmittel!) anzugeben. Ferner sind alle Angaben zur Identifizierung der Probe, gegebenenfalls alle Sonderbehandlungen, alle Arbeitsschritte, die nicht in der Methode erwähnt sind, und die ausgewählte Auswertemethode im Protokoll aufzuführen.

Anm.: Wegen der speziellen Verhältnisse bei Brechungsindexdetektoren ist bei der Angabe und Interpretation von Flächenprozent-(RI)-Ergebnissen besondere Vorsicht geboten. Bei der Verwendung anderer Detektoren und anderer Elutionsmittelgemische ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse (Flächenprozent) nicht direkt miteinander vergleichbar sind.

10 Anhang

Zum Testen des HPLC-Systems mit RP-Säule und Brechungsindex-Detektoren eignen sich am besten Palmöl und verschiedene Umesterungsgemische.

- a) Palmöl in Aceton:Acetonitril = 50:50, $\varphi = 500$ mL/L;
- b) Umesterungsgemisch aus MMM und OOO in Aceton:Acetonitril = 50:50, $\varphi = 500$ mL/L;

- c) Umesterungsgemisch aus hydriertem Palmöl und hydriertem Palmkernöl (1:1) in Aceton:Acetonitril = 50:50, $\varphi = 500$ mL/L;
- d) Dasselbe Umesterungsgemisch bei einem anderen Mischungsverhältnis der mobilen Phase Aceton in Acetonitril = 70:30, $\varphi = 700$ mL/L.

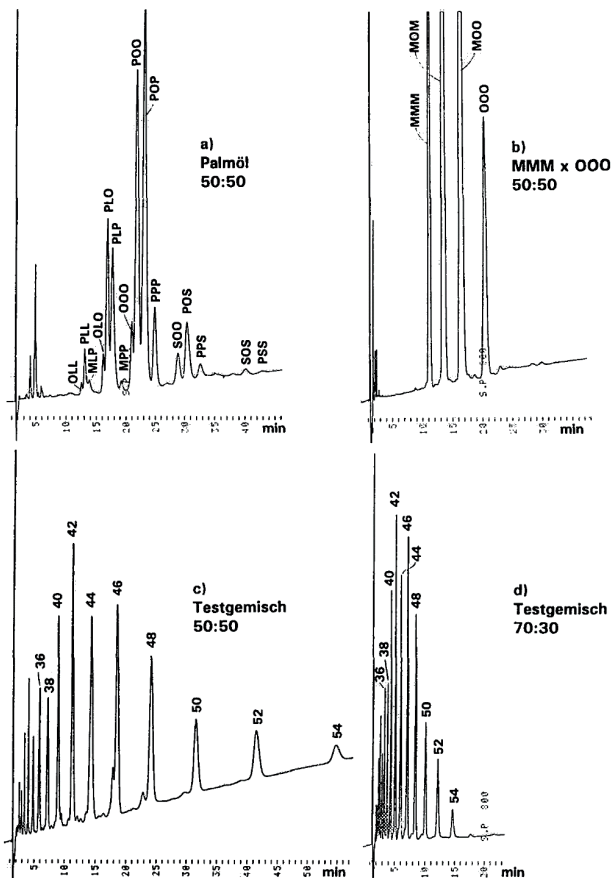


Abb. 1: HPLC-Chromatogramme von Palmöl und Testgemischen

Tab. 1: Partition number (PN), Triglycerid in Kurzschreibweise, Carbon number (CN) und Anzahl der Doppelbindung (DB) für die Reversed-Phase HPLC der Triglyceride; Abkürzungen siehe auch Anmerkungen in 7.1.1 und 7.2, TG mit drei gesättigten Fettsäuren (ges.)

PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB
24	CoLnCo	30:3	34	CoLM	38:2	38	CCS	38:0	44	OLL	54:5
	ges.	24:0		CyOC	36:1		CyMP	0		OLnO	5
				CoOLa	1		CyLaS	0		SLnL	5
26	CoLnCy	32:3		CLaLa	34:0		CoPP	0		PLL	52:4
	CoLCo	30:2		CCM	0		CoMS	0		PLnO	4
	ges.	26:0		CoLaM	0					PLnP	50:3
28				CyCP	0	40	LLnL	54:7		MLO	3
	CyLnCy	34:3		CyCyS	0		OLnLn	7		MLnS	3
	CoLnC	3		CoMM	0		PLnLn	52:6		MLP	48:2
	CoLCy	32:2		CoLaP	0		MLnL	50:5		LaOO	2
	CoOCo	30:1		CoCS	0		LaLL	48:4		LaLS	2
	CoCoP	28:0					LaLnO	4		MOM	46:1
	CoCyM	0	36	LnLnLn	54:9		MLnM	46:3		LaOP	1
	CoCLa	0		LaLnLn	48:6		LaLnP	3		COS	1
	CyCyLa	0		CLnL	46:5		CLO	3		MMP	44:0
	CyCC	0		CyLL	44:4		CLnS	3		LaPP	0
30				CyLnO	4		LaLM	44:2		LaMS	0
	CoLnLn	42:6		LaLnLa	42:3		CLP	2		CPS	0
	CyLnC	36:3		CLnM	3		CyOO	2		CySS	0
	CoLnLa	3		CyLnP	3		CyLS	2			
	CyLCy	34:2		CoLO	3		LaOLa	42:1	46	OLO	54:4
	CoLC	2		CoLnS	3		COM	1		SLL	4
	CoOCy	32:1		CLLa	40:2		CyOP	1		SLnO	4
	CoCoS	30:0		CyLM	2		CoOS	1		PLO	52:3
	CoCyP	0		CoLP	2		LaMM	40:0		PLnS	3
	CoCM	0		COC	38:1		LaLaP	0		PLP	50:2
	CoLaLa	0		CyOLa	1		CMP	0		MOO	2
	CyMM	0		CoOM	1		CyPP	0		MLS	2
	CyCLa	0		LaLaLa	36:0		Clas	0		MOP	48:1
	CCC	0		CLaM	0		CyMS	0		LaOS	1
				CCP	0		CoPS	0		MPP	46:0

PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB	
32	CyLnLn	44:6		CyMM	0					MMS	0	
	CoLnL	42:5		CyLaP	0	42	LLL	54:6		LaPS	0	
	CLnC	38:3		CyCS	0		OlLn	6		CSS	0	
	CyLnLa	3		CoMP	0		SLnLn	6				
	CoLnM	3		CoLS	0		PLnL	52:5	48	OOO	54:3	
	CyLC	36:2					MLL	50:4		SLO	3	
	CoLLa	2	38	LLnLn	54:8		MLnO	4		SLnS	3	
	CyOCy	34:1		MLnLn	50:6		MLnP	48:3		POO	52:2	
	CoOC	1		LaLnL	48:5		LaLO	3		PLS	2	
	CoCP	32:0		CLL	46:4		LaLnS	3		POP	50:1	
	CoLaM	0		CLnO	4		MLM	46:2		MOS	1	
	CyCyP	0		LaLnM	44:3		LaLP	2		PPP	48:0	
	CyCM	0		CLnP	3		COO	2		MPS	0	
	CyLaLa	0		CyLO	3		CLS	2		LaSS	0	
	CCLa	0		CyLnS	3		LaOM	44:1				
	CoCyS	0		LaLLa	42:2		COP	1	50	SOO	54:2	
	34	CLnLn	46:6		CLM	2		CyOS	1		SLS	2
		CyLnL	44:5		CyLP	2		MMM	42:0		POS	52:1
CoLL		42:4		CoOO	2		LaMP	0		PPS	50:0	
CoLnO		4		CoLS	2		LaLaS	0		MSS	0	
CLnLa		40:3		COLa	40:1		CPP	0				
CyLnM		3		CyOM	1		CMS	0	52	SOS	54:1	
CoLnP		3		CoOP	1		CyPS	0		PSS	52:0	
CLC		38:2		LaLaM	38:0		CoSS	0				
CyLLa		2		CMM	0				54	SSS	54:0	
				CLaP	0							

11 Änderungen

Die Methode wurde nur redaktionell überarbeitet.

DGF Standard Methods	Section C – Fats
Replaces C-VI 13a (98)	C-VI 13a (22)

HPLC of triglycerides „Fingerprint“ method

Qualitative determination of the composition of triglycerides

1 Scope and field of application

This DGF standard method describes a procedure that allows the separation of the individual triglycerides (triacylglycerols) and triglyceride groups in common dietary fats and oils by HPLC. The different triglycerides are separated according to the partition number (PN), i. e. according to both the carbon number (CN) and the number of double bonds (DB) and to a certain extent beyond that, and indicated by a refractive index detector (RI detector). The method allows rapid discrimination of a range of oils on the basis of their characteristic composition “fingerprint”. The position of the fatty acids within the triglyceride can be characteristic of the botanical origin as well as the processing state (hardness, transesterification).

This method is applicable to most vegetable and animal oils and fats. The applicability of the method might be limited for some more complicated composed fats such as milk fat (butter), partially hydrogenated fats with *trans* fatty acids or fats with special fatty acids such as γ -linolenic acid, petroselinic acid or long-chain, highly unsaturated fatty acids (fish oils) as well as for some margarine fat compositions and mixed fats containing milk fat.

2 Definition

The HPLC chromatogram of triglycerides determined by this method is called the “fingerprint” of a fat or oil.

3 Principle of the method

A solution of the oil or fat in acetone is injected directly into the HPLC system. From the peak patterns (“fingerprints”) obtained under controlled conditions by means of reversed-phase HPLC and refractive index detection, conclusions about the identity of the fat can be drawn by comparison with known samples.

4 Reagents

WARNING: Attention is drawn to the regulations governing the handling of hazardous substances. Technical, organisational and personal protective measures must be observed.

Unless otherwise stated

- reagents which are pure for analysis and suitable for HPLC must be used;
- the eluent must be filtered and sufficiently degassed before introduction into the HPLC system.

4.1 Acetone;

4.2 Acetonitrile;

4.3 Eluent: Acetone in acetonitrile in a suitable mixing ratio, e. g. between $\varphi^* = 500$ to 750 mL/L. Adjust the mixing ratio of acetone to acetonitrile to give a separation according to section 7.2 and figs. 1 and 2.

Note: When degassing or filtering, watch out for changes due to evaporation! Propionitrile as HPLC eluent usually yields completely different results; it is less suitable here.

* φ = volume fraction

DGF Standard Methods	Section C – Fats
Page 3/12	C-VI 13a (22)

5 Apparatus

- 5.1 HPLC pump;
- 5.2 Injection system with sample loop, 20 μL capacity;
- 5.3 C18 reversed-phase HPLC column with high loading, depending on separation performance 250 mm long or 2 columns in series (2 x 250 mm), inner diameter approx. 4 mm, packed with spherical particles (5 μm); possibly with column temperature control device. The type, age and history of the column, the coating of the column packing material and the temperature influence the separation (cf. 7.1);
- 5.4 Microliter syringe, 100 μL content;
- 5.5 Recording or integration system.

6 Sample

6.1 Sampling

Sampling is not part of this method. Use the samples taken and prepared according to DGF standard method C-I 1 to 5 for the examination.

6.2 Preparation of the test sample

Warm solid and semi-solid samples slightly above melting temperature, mix well and dissolve in acetone.

Filter liquid or melted samples or their solutions still containing visible impurities.

7 Procedure

7.1 Preparation of the analysis system

Adjust the conditions in the chromatographic system by use of test mixtures or reference samples in such a way that monoacidic and

mixed-acid triglycerides with the same partition number, but for which $PN \neq CN$ applies, separate from each other as well as possible. For saturated triglycerides with $PN = CN$, there is no separation between monoacidic and mixed acid triglycerides. A resolution according to fig. 1 and 2 serves as an example. Temperature differences have an influence on the separation selectivity.

*Note: Partition number (PN) = Carbon number (CN) minus twice the number of double bonds (DB): $PN = CN - 2 * DB$;*

*For triolein (OOO) applies: $PN = 54 - 2 * 3 = 48$;*

*For palmito-linoleo-olein (PLO) applies: $PN = 52 - 2 * 3 = 46$;*

PN in tab. 1 corresponds here to the integer partition number and says nothing about the actually observed elution order.

Abbreviations used for the fatty acids:

<i>Co</i>	<i>Caproic acid</i>	<i>C6:0</i>	<i>P</i>	<i>Palmitic acid</i>	<i>C16:0</i>
<i>Cy</i>	<i>Caprylic acid</i>	<i>C8:0</i>	<i>S</i>	<i>Stearic acid</i>	<i>C18:0</i>
<i>C</i>	<i>Capric acid</i>	<i>C10:0</i>	<i>O</i>	<i>Oleic acid</i>	<i>C18:1</i>
<i>La</i>	<i>Lauric acid</i>	<i>C12:0</i>	<i>L</i>	<i>Linoleic acid</i>	<i>C18:2</i>
<i>M</i>	<i>Myristic acid</i>	<i>C14:0</i>	<i>Ln</i>	<i>Linolenic acid</i>	<i>C18:3</i>

By choosing a suitable eluent, triglycerides can also be separated within the same PN (see DGF standard method C-VI 13b).

A long (several hours) equilibration phase of the system is required for the separation of the triglycerides. Otherwise, retention time shifts might occur in the sequence.

7.2 Analysis of one or more test mixtures

Note: Single acid and mixed acid triglycerides are commercially available individually and in mixtures. From monoacid triglycerides, mixed acid triglycerides can be produced by transesterification (heating with catalytic amounts of sodium or sodium methylate).

DGF Standard Methods	Section C – Fats
Page 5/12	C-VI 13a (22)

The hydrogenated transesterification product of palm kernel fat and palm oil (cf. figs. 1c and 1d) is very suitable for determining the retention times of the saturated triglycerides at a chain length interval of 2 carbon atoms and thus it is also suitable for calculating EPN and ECN values (cf. DGF standard method C-VI 13b) of unsaturated triglycerides, respectively, by interpolation between the adjacent saturated triglycerides.

The comparison of the retention times of the peaks of fig. 1c and 1d clearly shows the extraordinary large influence of the mixing ratio of the eluent.

Abbreviations used e. g.:

MPP = myristoyldipalmitoyl-, OOO = trioleoyl-, POO = palmitoyldioleoyl-, POP = oleoyldipalmitoyl-, PPP = tripalmitoyl-, PPS = stearoyldipalmitoyl-, PSS = palmitoyldistearoyl-glycerol. MPP, POO, PPS and PSS refer to the sum of all positional isomers.

In reversed-phase HPLC – which is the normal case in triglyceride HPLC-position isomers are not separated at the glycerol. Here it has become common practice to use peak abbreviations for triglycerides, e. g. POP or PLO (see table 1). The rule applies that all position isomers or their sum are always meant. Exception: This rule explicitly does not apply to HPLC on silver nitrate columns, where a symmetric/asymmetric separation – i. e. POP from PPO – may occur.

- 7.2.1 In addition to palm oil, interesterified mixtures of fully hydrogenated palm kernel fat and fully hydrogenated palm oil and interesterified mixtures of triolein with saturated triglycerides are particularly suitable as test mixtures. Care should be taken that triglycerides with 2 oleic acid residues do not overlap with the 2 *PN units* lower saturated triglycerides (e. g. SOO with PPP in table 1; see also palm oil in DGF standard method C-VI 13c).

7.3 Measurement of the sample

- 7.3.1 Dissolve the pretreated unknown sample in acetone at a suitable concentration, filter if necessary and inject into the HPLC system. Adjust the concentration depending on the solubility of the sample and the sensitivity of the detector used; for palm oil e. g. $\rho^* = 50 \text{ mg/mL}$ in acetone, for poorly soluble fats use less concentrated solutions. Make sure that the solution is complete!
- 7.3.2 It is helpful to determine the fatty acid composition by gas chromatography according to DGF standard method C-VI 10 and C-VI 11 before analysis for samples, whose fatty acid composition is not known.

8 Result of the determination

- 8.1 The result of the test is a “fingerprint” (chromatograms as in figs. 1 and 2) which is compared with the corresponding “fingerprint” of a known oil.
- 8.2 Quantification by this method is only possible to a limited extent, as the response of the individual triglycerides differs greatly due to the specific molar refractions. However, the ratio of areas of individual, specific triglycerides can be characteristic and of interest in special cases (cf. DGF standard method C-VI 13c).

Note: Area percentage results of refractive index detectors are generally dependent on the eluent! With refractive index detectors, the relative response factors change in principle with a change in the composition of the eluent. This is unimportant when used as a pure “fingerprint” method. However, if semiquantitative data (e. g. peak area ratios, area percent) are to be determined, this must be taken into account.

When determining the area percentages for the individual peaks, it must also be taken into account that the refractive indices of the

* ρ = mass concentration

DGF Standard Methods	Section C – Fats
Page 7/12	C-VI 13a (22)

more highly unsaturated triglycerides are higher than those of the corresponding saturated triglycerides. The area percentages thus found cannot therefore be generalized and, above all, cannot be compared between different types of oil. However, when comparing within one and the same type of oil (e. g. sample A soybean oil with sample B soybean oil) certain conclusions can be drawn. In special cases, such as palm oils (cf. DGF standard method C-VI 13c), almond oils, olive oils, etc., certain peak area ratios may be particularly meaningful or may be used to characterize the oils and, if necessary, to detect blends. For absolute quantitative data, the individual determination of system-dependent response factors for the individual peaks is indispensable.

The calculation of the percentage of each triglyceride per unit area are carried out according to the following formula:

$$AF_{TG} = \frac{A_{TGI}}{A_T} * 100$$

where:

- A_{FTG} Percentage of triglyceride;
- A_{TGI} Peak area of triglyceride;
- A_T Sum of the peak area of all triglycerides.

Peaks are assigned by their retention, by comparison with known oils or triglyceride test mixtures, or by specific EPN (ECN) numbers calculated for the respective chromatographic system.

Note: For calculation method, influence of system parameters, etc., see DGF standard method C-VI 13b.

9 Test report

If results are presented as area percent or as peak area ratio of certain peaks, the result has to be stated with reference to this method and individual working conditions (eluent!). Furthermore, all information on the identification of the sample, if applicable all

special treatments, all working steps not mentioned in the method and if applicable the selected evaluation method have to be listed in the protocol.

Note: Due to the special conditions of refractive index detectors, special caution should be exercised when reporting and interpreting area percentage (RI) results. When using other detectors and other eluent mixtures, it must be assumed that the results (area percent) are not directly comparable.

Appendix

For testing the HPLC system with RP column and refractive index detectors, palm oil and various transesterification mixtures are best suited.

- a) Palm oil in acetone:acetonitrile = 50:50, φ = 500 mL/L;
- b) Transesterification mixture of MMM and OOO in acetone:acetonitrile = 50:50, φ = 500 mL/L;
- c) Transesterification mixture of hydrogenated palm oil and hydrogenated palm kernel oil (1:1) in acetone:acetonitrile = 50:50, φ = 500 mL/L;
- d) The same transesterification mixture at a different mixing ratios of acetone and acetonitrile in the eluent = 70:30, φ = 700 mL/L.

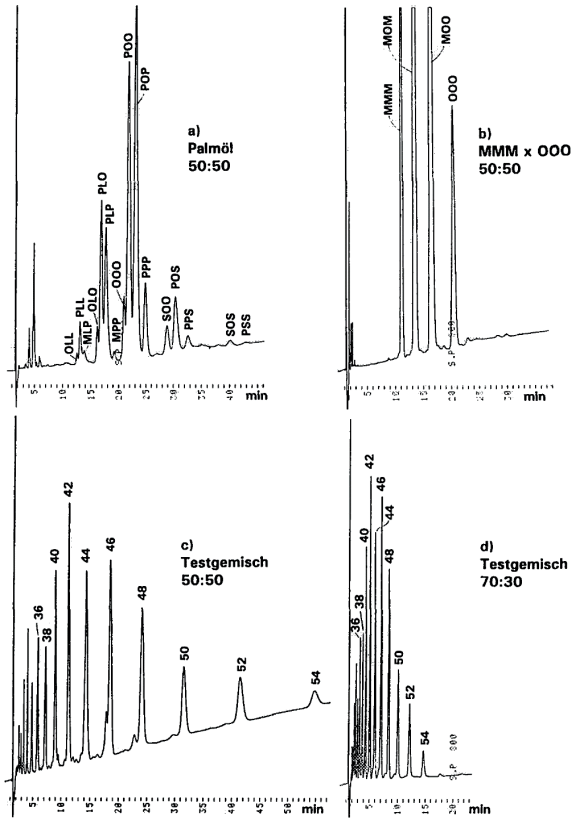


Fig. 1: HPLC chromatograms of palm oil and test mixtures
 A: Palm oil 50:50, B: MMM x OOO 50:50, C: Test mixture 50:50, D: Test mixture 70:30

Tab. 1: Partition number (PN), triglyceride in short form, carbon number (CN) and number of double bond (DB) for reversed-phase HPLC of triglycerides; for abbreviations see also notes in 7.1.1 and 7.2, triglycerides with three saturated fatty acids (Satd.)

PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB	
24	CoLnCo Satd.	30:3	34	CoLM	38:2	38	CCS	38:0	44	OLL	54:5	
		24:0		CyOC	36:1		CyMP	0		OLnO	5	
				CoOLa	1		CyLaS	0		SLnL	5	
26	CoLnCy CoLCo Satd.	32:3		CLaLa	34:0		CoPP	0		PLL	52:4	
		30:2		CCM	0		CoMS	0		PLnO	4	
		26:0		CoLaM	0					PLnP	50:3	
28	CyLnCy CoLnC CoLCy CoOCo CoCoP CoCyM CoCLa CyCyLa CyCC	34:3		CyCyS	0	40	LLnL	54:7		MLO	3	
		3		CoMM	0		OLnLn	7		MLnS	3	
		32:2		CoLaP	0		PLnLn	52:6		MLP	48:2	
		30:1		CoCS	0		MLnL	50:5		LaOO	2	
		28:0					LaLL	48:4		LaLS	2	
							LaLnO	4		MOM	46:1	
		0		LnLnLn	54:9		MLnM	46:3		LaOP	1	
		0		LaLnLn	48:6		LaLnP	3		COS	1	
		0		CLnL	46:5		CLO	3		MMP	44:0	
		0		CyLL	44:4		CLnS	3		LaPP	0	
30	CoLnLn CyLnC CoLnLa CyLCy CoLC CoOCy CoCoS CoCyP CoCM CoLaLa CyMM CyCLa CCC	42:6		CyLnO	4		LaLM	44:2		LaMS	0	
				LaLnLa	42:3		CLP	2		CPS	0	
		36:3		CLnM	3		CyOO	2		CySS	0	
		3		CyLnP	3		CyLS	2				
		34:2		CoLO	3		LaOLa	42:1		46	OLO	54:4
		2		CoLnS	3		COM	1		SLL	4	
		32:1		CLLa	40:2		CyOP	1		SLnO	4	
		30:0		CyLM	2		CoOS	1		PLO	52:3	
		0		CoLP	2		LaMM	40:0		PLnS	3	
		0		COC	38:1		LaLaP	0		PLP	50:2	
		0		CyOLa	1		CMP	0		MOO	2	
		0		CoOM	1		CyPP	0		MLS	2	
32	CyLnLn CoLnL	44:6		LaLaLa	36:0		CLaS	0		MOP	48:1	
				CLaM	0		CyMS	0		LaOS	1	
				CCP	0		CoPS	0		MPP	46:0	
		44:6		CyMM	0					MMS	0	
		42:5		CyLaP	0		42	LLL		54:6	LaPS	0

PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB	PN	TG	CN:DB
	CLnC	38:3		CyCS	0		OLnL	6		CSS	0
	CyLnLa	3		CoMP	0		SLnLn	6			
	CoLnM	3		CoLS	0		PLnL	52:5	48	OOO	54:3
	CyLC	36:2					MLL	50:4		SLO	3
	CoLLa	2	38	LLnLn	54:8		MLnO	4		SLnS	3
	CyOCy	34:1		MLnLn	50:6		MLnP	48:3		POO	52:2
	CoOC	1		LaLnL	48:5		LaLO	3		PLS	2
	CoCP	32:0		CLL	46:4		LaLnS	3		POP	50:1
	CoLaM	0		CLnO	4		MLM	46:2		MOS	1
	CyCyP	0		LaLnM	44:3		LaLP	2		PPP	48:0
	CyCM	0		CLnP	3		COO	2		MPS	0
	CyLaLa	0		CyLO	3		CLS	2		LaSS	0
	CCLa	0		CyLnS	3		LaOM	44:1			
	CoCyS	0		LaLLa	42:2		COP	1	50	SOO	54:2
				CLM	2		CyOS	1		SLS	2
34	CLnLn	46:6		CyLP	2		MMM	42:0		POS	52:1
	CyLnL	44:5		CoOO	2		LaMP	0		PPS	50:0
	CoLL	42:4		CoLS	2		LaLaS	0		MSS	0
	CoLnO	4		COLa	40:1		CPP	0			
	CLnLa	40:3		CyOM	1		CMS	0	52	SOS	54:1
	CyLnM	3		CoOP	1		CyPS	0		PSS	52:0
	CoLnP	3		LaLaM	38:0		CoSS	0			
	CLC	38:2		CMM	0				54	SSS	54:0
	CyLLa	2		CLaP	0						

11 Changes

Only editorial changes have been made in the revised version.