

April 2013

### **Hinweise zur Bestimmung der Triacylglycerine (Triglyceride) durch Gaschromatographie (C-VI 14) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (C-VI 13a)**

Fette und Öle bestehen fast ausschließlich aus den Triglyceriden (TG) der Fettsäuren. Die Zusammensetzung der Fettsäuren sowie ihre Position innerhalb des TG bestimmen die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Fette und Öle und können charakteristisch für ihre botanische und geographische Herkunft sowie ihren Verarbeitungszustand (Härtung, Umesterung) sein. Die Analyse der TG in Fetten und Ölen gibt somit in erster Linie Aufschluss über Identität und Authentizität.

#### **Analytik**

Die Zusammensetzung der TG lässt sich sowohl gaschromatographisch (GC) als auch mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysieren. Keines der beiden Verfahren erlaubt eine vollständige Trennung **aller** TG. Beide Verfahren unterscheiden sich grundsätzlich in der Selektivität ihrer Auftrennung und der thermischen Belastung der TG.

Die HPLC an RP-Phasen [DGF C-VI 13a] mit vorzugsweise aprotischen mobilen Phasen trennt die TG nach der Equivalent Carbon Number (ECN), auch Equivalent Partition Number (EPN), wobei häufig Überlappungen mit anderen TAGs auftreten. Die Auftrennung ist stark von der mobilen Phase und der Temperatur abhängig. Streng genommen erfolgt bei der Bestimmung mittels HPLC die Auftrennung sowohl nach der C-Zahl (CN) als auch nach der Anzahl der Doppelbindungen (DB) in den drei gebundenen Fettsäuren innerhalb des Moleküls (Trennung nach Partition Number,  $PN = CN - 2 \times DB$ ). Durch die Wahl geeigneter Eluenten lassen sich aber auch solche TG trennen, die eine identische PN aufweisen. Hierfür wurde der EPN- oder ECN-Wert eingeführt [DGF C-VI 13b]. Für gesättigte TG gilt  $PN = CN = ECN$ .

Die Quantifizierung ist bei der HPLC mittels RI-Detektion nur bedingt möglich, da der Respons der einzelnen TG aufgrund der unterschiedlichen molaren Refraktionen stark differiert. Überlappende Peaks lassen sich daher nicht mehr quantifizieren. Für die verschiedenen TG müssten zur Ermittlung des Respons Standards eingesetzt werden, die nicht alle verfügbar sind. Eine Alternative bietet die Detektion der Massen mit dem Lichtstreu-Detektor oder über eine LC-MS-Kopplung. Die Verwendung eines Lichtstreuendetektors, wie es das Europäische Arzneibuch für Sesamöl vorsieht, hat sich jedoch nicht durchgesetzt, da auch hier eine Kalibrierung notwendig wird.

Die HPLC-Trennung der TG setzt eine lange (mehrstündige) Äquilibrierungsphase des Systems voraus. In der Praxis hat sich gezeigt, dass es insbesondere bei Serienanalysen zu Retentionszeitverschiebungen kommt, die durch die Anreicherung der stationären Phase mit TG hervorgerufen wird.

## DEUTSCHE EINHEITSMETHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON FETTEN, FETTPRODUKTEN, TENSIDEN UND VERWANDTEN STOFFEN

---

Das Chromatogramm der TG bei der HPLC ist daher nur ein Fingerprint [DGF C-VI 13a] und erlaubt keine korrekte Quantifizierung. Einzelne Aussagen zu verschiedenen TG sind nur dann möglich, wenn man sich auf einzelne Öle bzw. einige wenige Peaks im Chromatogramm wie z. B. bei Olivenöl [VO (EWG) Nr. 2568/91] oder Palmölfractionen [DGF-C-VI 13c] methodisch beschränkt. Für die Identifizierung von Fetten lässt sich die HPLC-RI Methodik nur bei konstanten Bedingungen einsetzen.

Für den Analysenreport ist daher bei Anwendung dieser Methodik erforderlich, dass die HPLC-Bedingungen genau angegeben werden.

Bei der Bestimmung mittels GC erfolgt die Auftrennung dagegen vorrangig nach der Gesamtanzahl der Kohlenstoffatome im Molekül (Trennung nach Carbon Number, CN), also nach der Masse der TG, hierdurch werden die Ergebnisse für die einzelnen TG vergleichbar. Der Retentionszeit ist bei allen TG nahezu identisch, steigt aber mit der Anzahl der Doppelbindungen im TG. Die Hochtemperatur-Gaschromatographie ist seit der Verfügbarkeit thermisch stabiler Trennsäulen für die Routineanalytik zur Zeit die bessere Methode, weshalb sie in die ISO Methoden für Milchfette (ISO 17678 /IDF 202, hier allerdings als Trennung der TG nur nach der Carbon Number auf einer 5 m langen, unpolaren Kapillarsäule) und Kakaobutterersatzfette (ISO 23275-1 und -2) Eingang gefunden hat. In der DGF Methode C-IV-14 (08) und den o. g. ISO-Methoden werden auch Isomeren bei gleicher C-Zahl getrennt und für die Beurteilung herangezogen.

Da aber auch bei der GC nur ein Teil der TG vollständig getrennt werden, sind die Ergebnisse nur nach Normalisierung der getrennten Peakflächen verwertbar und vergleichbar. In der Literatur beschränkt man sich daher häufig auf folgende TG (POP, PLL, PLO, OOO, OLL, OLO, LLL, SOS, SSS, POS), da diese mit ausreichender Sicherheit getrennt und identifiziert werden. Bei den Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) der DGF war die GC-Methode immer die bessere Methodik für die Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung der TG. Die GC der Triglyceride ist im Vergleich zur HPLC universeller anwendbar und liefert reproduzierbarere Ergebnisse für Pflanzenöle und -fette mit moderatem Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren.

Das gaschromatographische Verfahren ist nicht zu empfehlen für linolensäurereiche Öle, da die TG mit zwei oder drei Linolensäure-Molekülen schlechte Wiederfindungsraten haben. Für beide Methoden sind Co-Elutionen bekannt und dokumentiert. Eine Trennung von Stellungsisomeren (z. B. POP/PPO) ist mit beiden oben genannten standardisierten Methoden nicht möglich.

Die Ergebnisse beider Verfahren sind somit nur bedingt miteinander vergleichbar, die Wahl der Methode hängt von der Fragestellung ab.