

Plant aardige en dierlijke oliën en vetten
 Chromatografische bepaling van het gehalte
 aan diglyceriden en hun vetzuursamenstelling

NEDERLANDSE
 NORM

NEN 6379

Vegetable and animal oils and fats – Chromatographic determination of
 diglycerides content and their fatty acid composition

1e druk, april 1986

1 **Onderwerp**

Deze norm beschrijft de bepaling van het totale gehalte aan diglyceriden in een olie of vet alsmede de bepaling van hun vetzuursamenstelling met behulp van dunnelaag- en gaschromatografie.

Opmerking

Voor algemene richtlijnen, zie NPR 6300.

2 **Toepassingsgebied**

De norm is van toepassing bij het onderzoek van plantaardige en dierlijke oliën en vetten. In verband met de vele glyceriden met korte ketens in melkvet, die bij de dunnelaagchromatografie een overlapping van de di- en triglyceridebanden op de dunnelaagplaat veroorzaken, is deze norm niet geschikt voor melkvet en mengaels hiervan.

3 **Beginsel**

Het monster, waaraan een bekende hoeveelheid diglyceride als interne standaard is toegevoegd, wordt gescheiden in mono-, di- en triglyceride-fracties door middel van dunnelaagchromatografie. De geïsoleerde diglyceriden worden volgens NEN 6302 omgezet in methylesters, die gaschromatografisch worden geanalyseerd volgens NEN 6334. Zowel het percentage (*m/m*) van de diglyceriden in het monster als de vetzuursamenstelling van de diglyceriden worden met deze methode verkregen.

4 **Reagentia**

Alle reagentia en oplosmiddelen moeten van analysekwaliteit zijn, tenzij anders is vermeld.

Waarschuwing

Het werken met chemicaliën kan schadelijk zijn voor de gezondheid. Raadpleeg daarom de desbetreffende Chemiekaarten en neem de daarin aanbevolen preventieve maatregelen in acht.

4.1 Dichloormethaan.

4.2 Diëthylether, vers gedestilleerd.

4.3 Methanol.

4.4 Indicatoroplossing: Los ca. 100 mg 2',7'-dichloorfluoresceïne of Rhodamine B op in 100 ml methanol.

4.5 Loopmiddel: toluen/methanol 90/10 (V/V).

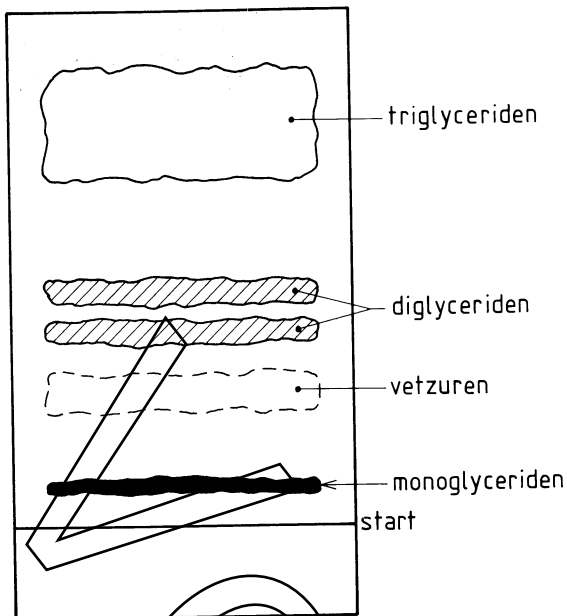
Opmerking

Als loopmiddel kan ook n-hexaan/diëthylether/ijsazijn 50/50/2 (V/V/V) worden toegepast. Daarmee worden echter iets minder nauwkeurige resultaten verkregen.

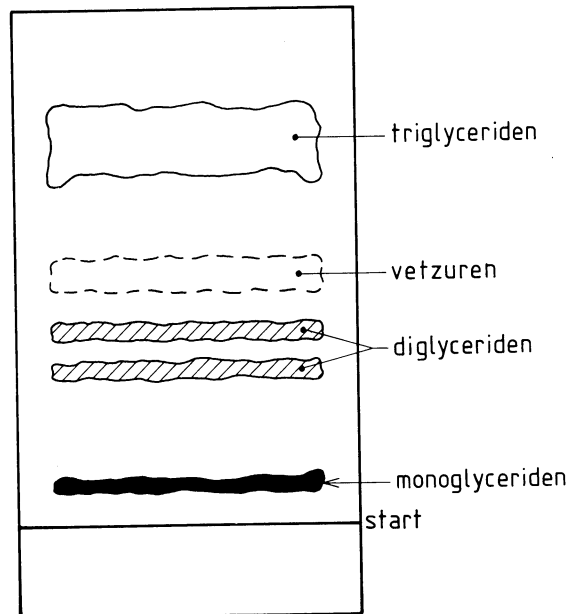
Figuur 1 laat de scheidingspatronen zien die worden verkregen met de genoemde loopmiddelen. Onzorgvuldig opbrengen van het monster kan leiden tot overlapping van de di- en triglyceridebanden (1a), of van de diglycerideband en de vetzuurband, indien aanwezig (1a en 1b).

4.6 **Standaard diglyceride-oplossing (D15-oplossing):** Mengsel van ongeveer gelijke hoeveelheden van 1,2- en 1,3-glyceroldipentadecanoaat (D15), ca. 3 % (*m/m*) in toluen/methanol 90/10 (V/V). Weeg ca. 60 mg van het glyceroldipentadecanoaatmengsel tot op 0,1 mg in een monsterflesje (5.9). Voeg ca. 2 ml van het toluen-methanolmengsel toe en weeg opnieuw. Bereken het gehalte aan D15 (w_6) in deze oplossing in mg/mg in 4 decimalen.

4.7 Reagentia voor de bereiding van methylesters zoals omschreven in NEN 6302.



Figuur 1a
Voorbeeld van scheiding
met toluen/methanol 90/10 (V/V)
als loopmiddel



Figuur 1b
Voorbeeld van scheiding met
n-hexaan/diëthylether/ijszijn
50/50/2 (V/V/V) als loopmiddel

5 Toestellen en hulpmiddelen

Gebruikelijk laboratoriumglaswerk en in het bijzonder de volgende.

- 5.1 Plaat voor dunnelaagchromatografie; glas, 20 cm × 20 cm, bedekt met silicagel 60, laagdikte 0,5 mm of 1 mm.

Opmerking

Voor het zelf maken van platen, zie NEN 3726.

- 5.2 Ontwikkeltanks (twee) met deksel, waarvan de wanden aan de binnenzijde zijn bekleed met filtreerpapier, geschikt voor platen van 20 cm × 20 cm.
- 5.3 Opbrengapparaat, eventueel een glazen injectiespuit, micropipet of capillaire spleet.
- 5.4 Sproeier, voor de indicatoroplossing.
- 5.5 Ultravioletlamp (golflengte 254 of 360 nm).
- 5.6 Benodigheden voor bereiding en gaschromatografie van methylesters van vetzuren, zoals beschreven in NEN 6302 en NEN 6334.
- 5.7 Glazen injectiespuit, of micropipet, 100 µl.
- 5.8 Glazen injectiespuit, of micropipet om ongeveer 0,3 ml te kunnen doseren.
- 5.9 Glazen monsterflesjes, 2 tot 5 ml, voorzien van een met PTFE beklede schroefdop.
- 5.10 Rondbodempkolf, 50 ml, voorzien van slijpstuk.

Opmerking

Aangezien de methode een microanalyse is, dient er zorgvuldig op te worden gelet dat al het te gebruiken glaswerk volledig vrij is van sporen van vette bestanddelen.

6 Monsterneming

Zie NEN 6301.

7 Voorbehandeling van het monster

Indien het monster bij kamertemperatuur niet geheel is gesmolten, verwarm het dan tot maximaal 10 °C boven de temperatuur waarbij dit wél het geval is.

Wanneer het monster in vloeibare vorm niet helder is, filtreer het dan door een filter van kwalitatief, normaal filterend filtreerpapier, zo nodig onder toevoeging van watervrij natriumsulfaat, ervoor zorg dragend dat het monster tijdens deze behandeling geheel vloeibaar blijft.

8 Werkwijze

8.1 Voorbehandeling van de dunnelaagplaat

Gebruik bij voorkeur een dunnelaagplaat met een laagdikte van 1 mm (5.1), indien van het monster meer dan 50 mg wordt ingewogen.

Breng in één van de ontwikkel tanks ongeveer 100 ml diëthylether (4.2) en doordrenk het filtreerpapier langs de wanden hiermee geheel.

Zet een dunnelaagplaat in de tank en sluit deze af.

Elueer totdat de diëthylether het bovineinde van de plaat heeft bereikt. Laat de plaat nog 5 – 10 min staan alvorens deze er uit te halen.

Neem de plaat uit de tank en laat deze gedurende een uur in een zuurkast liggen om de diëthylether volledig te laten verdampen.

Opmerking

Aldus behandelde platen kunnen in een exsiccator worden bewaard.

Markeer voorzichtig met een potlood de opbrenglijn op 2 cm van de onderzijde van de plaat.

Maak over de gehele breedte van de plaat een groef in de silicalaag tot op het glas, 15 cm boven de opbrenglijn en evenwijdig aan deze.

8.2 Bereiding van de monsteroplossing

Weeg, volgens de in onderstaande tabel aangegeven richtlijn, van het voorbehandelde monster een met het te verwachten diglyceride-gehalte overeenkomende hoeveelheid monster tot op 0,1 mg in een monsterflesje (5.9). Voer eventueel een oriënterende bepaling uit.

te verwachten gehalte aan diglyceriden % (m/m)	in te wegen hoeveelheid monster mg
0 - 5	100
5 - 10	80
10 - 20	50
20 - 30	30
30 - 40	25
40 - 50	20
50 en hoger	15

Voeg aan het ingewogen monster ongeveer 100 µl van de D15-oplossing (4.6) met behulp van de injectiespuit (5.7) toe en bepaal de massa (m_s) daarvan tot op 0,1 mg.

Voeg met behulp van de injectiespuit of de micropipet (5.8) ongeveer 0,3 ml dichloormethaan toe, sluit het monsterflesje zorgvuldig af en schud om het monster goed op te lossen.

8.3 Dunnelaagchromatografie

Breng ongeveer 100 ml van het loopmiddel in de tweede ontwikkel tank en doordrenk het filtreerpapier langs de wanden hiermee geheel. Sluit de tank goed af en laat deze ten minste 1 h staan.

Breng bij voorkeur met behulp van een opbrengapparaat 300 µl van de monsteroplossing (8.2) in een onderbroken gelijkmatige smalle streep van ongeveer 14 cm lengte op de voorbehandelde plaat, ongeveer 3 cm van de zijkanten en 2 cm van de onderkant van de plaat.

Breng ter weerszijde van de streep enkele µl van de D15-oplossing op de plaat, ter bepaling van de plaats van de diglyceridebanden.

Breng de plaat in de ontwikkel tank, sluit deze af en ontwikkel de plaat totdat het vloeistoffront de groef heeft bereikt.

Laat de plaat nog 10 ± 1 min in de tank staan.

Neem de plaat uit de tank en laat het loopmiddel in een zuurkast verdampen.

8.4 Isolering van de diglyceriden

Besproei de plaat licht met de indicatoroplossing (4.4) en bekijk de plaat onder de ultravioletlamp (5.5). Als de scheiding tussen de banden niet volledig is, moet de plaatscheiding volgens 8.3 opnieuw worden uitgevoerd.

Bepaal met behulp van de vlekken afkomstig van de D15-oplossing de plaats van de diglyceriden-banden en markeer deze.

Krab de vlekken afkomstig van de D15-oplossing met een spatel af en gooi dit materiaal weg. Krab dan de beide diglyceridebanden af en breng dit materiaal over in de kolf van 50 ml (5.10).

8.5 Omzetting in methylesters

Bereid de methylesters zoals omschreven in NEN 6302, uitgaande van het afgekrabde materiaal (8.4).

Hierbij kunnen de te gebruiken reagentia het beste in de volgende hoeveelheden en volgorde worden toegevoegd:

- 4 ml methanolische natriumhydroxide-oplossing $c(\text{NaOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$ en 3 ml methanol;
- 4 ml boortrifluoride-methanoloplossing;
- 2 ml heptaan.

De verzeping en methylering moeten onder voortdurend schudden worden uitgevoerd. De temperatuur van het toe te passen verwarmingsmedium moet ca. $70 \text{ }^\circ\text{C}$ zijn.

8.6 Gaschromatografie

Voer de gaschromatografische analyse uit volgens NEN 6334.

Injecteer enkele μl van de verkregen oplossing van methylesters in heptaan.

9 Berekeningen

9.1 Berekening van het gehalte aan diglyceriden

Bereken het totale gehalte aan diglyceriden in het oorspronkelijke monster met behulp van de volgende formule:

$$w_d = \frac{(100\% - c_{15}) \cdot w_s \cdot m_s \cdot 100\%}{c_{15} \cdot m_0}$$

waarin:

w_d is het totale gehalte aan in het monster aanwezige diglyceriden, in % (m/m);

c_{15} is het percentage (oppervlak/oppervlak) van de C15-methylesters in het methylestermengsel incl. interne standaard C15;

w_s is het gehalte aan D15 (interne standaard) in de D15-oplossing, in mg/mg;

m_s is de massa van de interne standaard-D15-oplossing, in mg;

m_0 is de ingewogen massa van het monster, in mg.

9.2 Berekening van de vetzuursamenstelling van de diglyceriden

Bereken de samenstelling van de methylesters van de diglyceridevetzuren met behulp van de volgende correctieformule:

$$a_i = \frac{c_i \cdot 100\%}{(100\% - c_{15})}$$

waarin:

a_i is het percentage (oppervlak/oppervlak) van component i , uitgedrukt in methylesters, in de oorspronkelijke diglyceride-fractie;

c_i is het percentage (oppervlak/oppervlak) van component i in het methylestermengsel inclusief interne standaard C15;

c_{15} is het percentage (oppervlak/oppervlak) van de C15-methylesters in het methylestermengsel inclusief interne standaard C15.

Bestelformulier

NEN

Stuur naar:

NEN Standards Products & Services
t.a.v. afdeling Klantenservice
Antwoordnummer 10214
2600 WB Delft

NEN Standards Products & Services

Postbus 5059
2600 GB Delft

Vlinderweg 6
2623 AX Delft

T (015) 2 690 390
F (015) 2 690 271

www.nen.nl/normshop

Ja, ik bestel

__ ex. NEN 6379:1986 nl Plantaardige en dierlijke oliën en vetten -
Chromatografische bepaling van het gehalte aan diglyceriden en hun
vetzuursamenstelling € 24.56

**Wilt u deze norm in PDF-formaat? Deze bestelt u eenvoudig via
www.nen.nl/normshop**

Gratis e-mailnieuwsbrieven

Wilt u op de hoogte blijven van de laatste ontwikkelingen op het gebied van normen,
normalisatie en regelgeving? Neem dan een gratis abonnement op een van onze
e-mailnieuwsbrieven. www.nen.nl/nieuwsbrieven

Retourneren

Fax: (015) 2 690 271
E-mail: klantenservice@nen.nl
Post: NEN Standards Products
& Services,
t.a.v. afdeling Klantenservice
Antwoordnummer 10214,
2600 WB Delft
(geen postzegel nodig).

Gegevens

Bedrijf / Instelling

T.a.v. O M O V

E-mail

Klantnummer NEN

Uw ordernummer BTW nummer

Postbus / Adres

Postcode Plaats

Telefoon Fax

Factuuradres (indien dit afwijkt van bovenstaand adres)

Postbus / Adres

Postcode Plaats

Datum Handtekening

Voorwaarden

- De prijzen zijn geldig tot 31 december 2016, tenzij anders aangegeven.
- Alle prijzen zijn excl. btw, verzend- en handelingskosten en onder voorbehoud bij o.m. ISO- en IEC-normen.
- Bestelt u via de normshop een pdf, dan betaalt u geen handeling en verzendkosten.
- Meer informatie: telefoon (015) 2 690 391, dagelijks van 8.30 tot 17.00 uur.
- Wijzigingen en typfouten in teksten en prijsinformatie voorbehouden.
- U kunt onze algemene voorwaarden terugvinden op: www.nen.nl/leveringsvoorwaarden.