シフト試薬を用いる飽和及び不飽和脂肪酸メチル エステルの核磁気共鳴スペクトル

野田 万次郎・高橋 朋弘

京都府立大学農学部農芸化学科（京都市左京区下鴨半木町）

NMR Analysis of Saturated and Unsaturated Fatty Acid Methyl Esters by Using Shift Reagents

Manjiro NODA and Tomohiro TAKAHASHI

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
Kyoto Prefectural University (Shimogamo, Sakyo-ku, Kyoto)

The effect of relative concentration of shift reagents, $\text{Eu}(\text{fod})_3$ and $\text{Pr}(\text{fod})_3$, on the proton chemical shifts of the methyl esters of saturated, oleic, petroselinic, erucic, linoleic, linolenic, and stearolic acids was represented as figures comparable with one another.

The shift reagent, $\text{Pr}(\text{fod})_3$, was superior to $\text{Eu}(\text{fod})_3$ in complete separation of the signals for olefinic and the neighboring methylene protons from those for the other methyl and methylene protons. Estimation of total unsaturated fatty acids in fatty acid mixtures was possible by calculation from the integrated areas of two peaks (methoxycarbonyl methyl and non-diallylic α -methylene to double bonds) isolated as the result of the $\text{Pr}(\text{fod})_3$ -induced shift.

Difference in the induced shift between the methoxycarbonyl methyl protons of methyl oleate and petroselinate was observed. By the use of the induced shift, methyl petroselinate in mixed methyl esters could also be determined from the integrated areas of the separated singlets for the methoxy-carbonyl methyl protons, the isolated multiplet for C-6 olefinic proton, and a peak for methylene protons near ester linkage.

1 緒 言

ランタノイドシフト試薬は、近年 NMR スペクトル法の分野でよく使われるようになってきたが、特に脂質のような長鎖化合物の構造解析には、今後ますます有力な手段になるものと思われる。長鎖脂肪酸エステルに関するプロトン NMR の範囲に限っていても、飽和、不飽和脂肪酸メチルエステル^{1)~4)}、ヒドロキシ酸及びエポキシ酸メチルエステル^{5), 6)}、アシルオキシポリアセチレン酸メチルエステル⁷⁾、脂肪酸エステル過酸化物⁸⁾、トリグリセリド^{9)~14)}などの研究に利用された例がある。

しかし、この方法を脂肪酸長鎖化合物一般に広く、かつ効果的に応用してゆくためには、上記のような個々の化合物だけでなく、各種脂肪酸長鎖化合物に実際にシフト試薬を加えた場合の、広範囲の、系統的かつ基礎的なデータを必要とし、これらの結果の相互比較が簡単にできることが望ましい、この報告では以上の見地から、ま

ず最も普通に見られる飽和、不飽和脂肪酸のメチルエステルについて、シフト試薬を加えた場合の各プロトンの化学シフト値の変化を相互比較できるような、同一機器による実用的な基礎資料を提供することを一つの目的とした。

また使用したシフト試薬は、トリス（1,1,1,2,2,3,3-ヘptaフルオロ-7,7-ジメチル-4,6-オクタジオナト）ユウロピウム（Ⅲ）（ $\text{Eu}(\text{fod})_3$ ）及びトリス（1,1,1,2,2,3,3-ヘptaフルオロ-7,7-ジメチル-4,6-オクタジオナト）プラセオジウム（Ⅲ）（ $\text{Pr}(\text{fod})_3$ ）の両者であるが、特に $\text{Pr}(\text{fod})_3$ に関する結果は新しい知見も多く、有益であったので、その脂肪酸定量への応用ともあわせて、比較的詳細に記述した。

2 実 験

2.1 試薬と試料エステル

シフト試薬としては、市販 $\text{Eu}(\text{fod})_3$ 及び $\text{Pr}(\text{fod})_3$ 、

(同仁薬化学製)を、五酸化リン上で減圧加温乾燥後、五酸化リンの減圧デシケーター中で保存したものを使用した。

試料として用いた飽和脂肪酸、ペトロセリン酸、エルカ酸は、いずれも市販品(純度 99% 以上)を用い、オレイン酸、リノール酸、及びリノレン酸のメチルエステルは、それぞれオリブ油、ごま油、及びあまに油から尿素付加と低温分別結晶法で分離精製し、さらにシリカゲル-硝酸銀薄層クロマトグラフィー又は減圧蒸留法等を用いて単離したものである。ステアロール酸は、オレイン酸から調製したジブロモオクタデカン酸を、水酸化カリウムと 1-ブタノール中で加熱する常法によって得た。

遊離酸は三フッ化ホウ素-メタノール溶液を用いてメチルエステルとした。またグリセリドからの脂肪酸メチルエステルの調製は、ナトリウムメトキシド又は三フッ化ホウ素-メタノールを使うメタノリシス法によった。いずれの標品脂肪酸も、そのメチルエステルの GLC 及び TLC で純度を確認している。

NMR 用溶媒としては四塩化炭素を用い、内部標準物質としてテトラメチルシラン(TMS)を 1~3% の濃度になる程度に添加している。

2.2 装置と測定法

使用装置は日立高分解能核磁気共鳴装置 R-24 型 (60 MHz) で、室温 (16~30°C) で測定した。

試料メチルエステル 7~30 mg に所定量のシフト試薬を添加し、これを上記 TMS 含有四塩化炭素 0.3~0.4 ml に溶解した。ただし純品の試料に対しては、シフト試薬の溶解が可能なかぎり、試料 20 mg に対し四塩化炭素 0.3 ml を使うことを原則とした。この溶液を外径 4 mm の試料管に入れて測定している。

化学シフトは TMS を内部標準としたときの δ (ppm) 値で表し、TMS より高磁場側を負の値とした。

定量のための各ピークの積分値は、同一条件で 5~10 回繰り返して積分曲線を書かせ、該当ピークの測定値の平均値をとった。

3 結 果

3.1 一般の特徴

Fig.-1 に、リノール酸メチルにそれぞれ $\text{Eu}(\text{fod})_3$ 、及び $\text{Pr}(\text{fod})_3$ を加えたときの NMR スペクトルを示す。いずれの試薬の場合も、メトキシカルボニル=メチル、 $-\text{CO}-\text{OCH}_3$ (エステルメチルと略称)、又は $-\text{CO}-$ に隣接する脂肪酸側の α -メチレン基のプロトンのシグナルが最も大きく影響を受けて移動するが、 $\text{Eu}(\text{fod})_3$ の低磁場側へのシフトに対し、 $\text{Pr}(\text{fod})_3$ の高磁場側へのシフトが特徴的である。シグナル幅はシフト試薬の添加とともに増大し、ピークの先鋭度が減少する傾向にある。

Fig.-1 NMR spectra (60 MHz) of methyl linoleate (A), methyl linoleate containing $\text{Eu}(\text{fod})_3$ (B), and methyl linoleate containing $\text{Pr}(\text{fod})_3$ (C). Molar ratio: $\text{Eu}(\text{fod})_3/\text{ester}=1.57$, $\text{Pr}(\text{fod})_3/\text{ester}=0.78$.

シフト試薬添加のスペクトル中で、 δ 0.5~1.5 付近に新たに現れる大きなピークは、シフト試薬のメチルプロトンによるもので、添加比率が増大すると、当然大きくなる。

内部標準として加えた TMS のシグナルも、実際はシフト試薬の添加によって、外部標準の TMS と比べると、いずれも高磁場側にシフトしてくることが注目され

Fig.-2 Proton chemical shift plots obtained from incremental addition of shift reagents to TMS (5 mg) in CCl_4 (0.3 ml). The values are given as those on the basis of TMS without shift reagents.

る (Fig.-2)。しかし前述のように、本報告では、常に内部標準の TMS を基準 (δ 0) として測定した δ 値を採用した。

3.2 Eu(fod)₃ の添加の影響

飽和、不飽和脂肪酸メチルエステルに、種々のモル比で Eu(fod)₃ を添加し、各プロトンシグナルの移動を追って見た。代表的な天然 C₁₈ 脂肪酸メチルについて測定された結果を Fig.-3 にまとめて例示する。

Fig.-3 Proton chemical shift plots for methyl stearate (18:0), methyl oleate (18:1), methyl linoleate (18:2), and methyl linolenate (18:3) with Eu(fod)₃.

この報告の条件では、アシル基の C-5 以下のメチレンプロトンの低磁場側へのシフトが顕著であり、それぞれのメチレンプロトンのシグナルを判別できる。またオレフィンプロトン (a, δ 5.2 付近)、二重結合間のメチレン (ジアリル型) プロトン (b, δ 2.7 付近)、二重結合外側に隣接するメチレンプロトン (c, δ 2.0 付近)、C-18 メチルプロトン (δ 0.9 付近) 等のシグナルはほとんど移動せず、明らかにその個々が区別できる。なお以上以外のメチレンプロトン (δ 1.3 付近) のシグナルはあまり移動せず、従ってシフト試薬添加後も重なったピークとして残る。またエステルメチルプロトンの一重

線は前述のように最も大きくシフトしている。

これら図示された不飽和酸メチルの各相当プロトンのシフト傾向は相互に類似し、ジエン酸以上で認められる二重結合間のメチレンプロトンのシグナル (b) が、オレイン酸では欠如している程度の差が認められるにすぎない。

パルミチン酸その他の飽和酸メチルの場合もステアリン酸メチルと酷似する。エルカ酸メチル [22:1 (cis-13)] はオレイン酸メチルの図と大体一致するが、ペトロセリン酸メチル [18:1 (cis-6)] の場合は、二重結合がカルボキシル基に比較的近く影響を受けるため、Eu(fod)₃ の添加に伴って、二重結合両側のメチンプロトンのそれぞれが分離してくる^{2),3)}。

三重結合を持つステアロル酸 (9-オクタデシン酸) メチルの場合は、Fig.-4 のようにオレイン酸メチルに類似しているが、オレフィンプロトンがない点が当然異なる。三重結合両側の隣接プロトン (c, δ 2.1 付近) は判別できる。

Fig.-4 Proton chemical shift plots for methyl stearolate with Eu(fod)₃.

3.3 Pr(fod)₃ の添加の影響

Pr(fod)₃ を加えると、一般に各プロトンのシグナルは高磁場側にシフトする。

Fig.-5 に代表的な C₁₈ 飽和、不飽和酸メチルの各プロトンシグナルのシフトの状態を対比してあげる。本実験の条件では、エステルメチルプロトン (d) と C-2~C-5 までのメチレンプロトンのシグナルが内部標準 TMS の位置より高磁場に出て完全に区別できる。

Pr(fod)₃/エステルのモル比が 1.0 以下では、高磁場方向へのシフトの程度は C-2>エステルメチル>C-3>C-4>C-5 の各プロトンの順であった。C-18 の末端メチルプロトン、オレフィンプロトン (a)、及びそれに隣接するメチレンプロトン (b, c) も Eu(fod)₃ の場合と同様に、シフト値の変化は微小である。従って低磁場側には二重結合周辺のプロトンのシグナルのみが残り、TMS より高磁場側に移動したエステル結合近辺のメチ

Fig. 5 Proton chemical shift plots for methyl stearate (18:0), methyl oleate (18:1), methyl linoleate (18:2), and methyl linolenate (18:3) with $\text{Pr}(\text{fod})_3$. Carbon chain positions on fatty acid ester molecules are represented with the same numbers or symbols as in Fig. 3.

ル、メチレンプロトンのものと完全に分離するので、二重結合周辺プロトンのピークの積分値を利用する定量には、 $\text{Pr}(\text{fod})_3$ を使う方が有利である。

ステアリン酸以外の飽和酸メチルは、ステアリン酸メチルのシフト特性と基本的に同一である。またエルカ酸メチルのものもオレイン酸メチルの図に酷似する、ペトロセリン酸メチルについては、オレイン酸メチルのものといくらか相違があり、これについては後述(3・4・2)する。 $\text{Pr}(\text{fod})_3$ は $\text{Eu}(\text{fod})_3$ に比べて、許容添加モル比が低いところに限定される。通常 $\text{Pr}(\text{fod})_3$ /エステルモル比が1.0以下が実用的で、それ以上ではシフト値の顕著な変化は望めない。

3.4 脂肪酸定量への応用

3.4.1 飽和酸と不飽和酸の含有比率

飽和酸とオレイン酸、リノール酸、リノレン酸等の最も普通の脂肪酸から成る混合脂肪酸の場合、シフト試薬を用いる NMR を利用して、飽和酸と全不飽和酸のモル百分率を求めることができる。例えば、混合脂肪酸メチルに 0.25~0.30 程度のモル比で $\text{Pr}(\text{fod})_3$ を加えると、Fig. 6 のように、二重結合周辺のプロトンとエステル結合近辺のプロトンのシグナルが分離するから、c のプロトン (4 H, 積分値 c) と d のプロトン (3 H, 積分

値 d, 各脂肪酸メチルの d のシフト値は異なり、その一重線は 3 本に分離) の積分値の比から、飽和、不飽和酸モル百分率を算出することができる。

$$\text{飽和酸 \%} = 100 - \frac{75c}{d} \quad (1)$$

$$\text{不飽和酸 \%} = \frac{75c}{d} \quad (2)$$

Fig. 6 NMR spectrum (60 MHz) of a mixture of methyl palmitate, methyl oleate, methyl linoleate, and methyl linolenate with $\text{Pr}(\text{fod})_3$. Molar ratio, $\text{Pr}(\text{fod})_3$ /esters=0.26.

この方法を使い、混合脂肪酸メチルについて定量を行った例を、DEGS を固定液相とするガスクロマトグラフィーの分析値と対比して Table 1 に示す。この表のように、ガスクロマトグラフィーによる定量値との差は著しくはないが GLC の微量性と信頼性には及ばない。

Table 1 Estimation of saturated and unsaturated fatty acids by NMR using $\text{Pr}(\text{fod})_3$.

Sample	Method	Fatty acid composition (mol%)	
		Saturated	Unsaturated
Mixture of 16:0, 18:1, 18:2, and 18:3	Weighed	28.8	71.2
	NMR	29.7	70.3
	GLC	28.0	72.0
Cacao butter	NMR	64.9	35.1
	GLC	62.3	37.7
Olive oil	NMR	13.9	86.1
	GLC	13.3	86.7
Soybean oil	NMR	14.5	85.5
	GLC	13.6	86.4

ただし本法は試料が回収できる利点がある。なお $\text{Pr}(\text{fod})_3$ の添加比によっては、飽和酸と各不飽和酸のエステルメチルプロトンシグナル (d) のシフト値がそれぞれ異なり、ピークが分離する場合があるので、この場合は理論的には、飽和酸、モノ-, ジ-, トリエン酸の各脂肪酸の百分率の算出が可能であるが、実験の結果は、充分信頼のおける測定値が得られなかった。

3.4.2 ペトロセリン酸の定量

ペトロセリン酸を含む試料の場合、DEGS を使う一

般の GLC では、オレイン酸との分離が極めて困難である。この場合、 $\text{Pr}(\text{fod})_3$ を加える NMR 分析を併用することによって、両者の定量が可能となることが判明した。

ペトロセリン酸メチルに $\text{Pr}(\text{fod})_3$ を添加していくと **Fig.-7** のように、C-6、C-7 のオレフィンプロトンのシグナルは低磁場側にとどまり、かつ両者のシグナルは完

Fig.-7 Proton chemical shift plots for methyl petroselinate with $\text{Pr}(\text{fod})_3$.

全に分離する。オレイン酸メチル（リノール酸メチルやリノレン酸メチルの場合も同様）とペトロセリン酸メチルの混合物では、両者のオレフィンプロトンもエステルメチルプロトン（d）もそれぞれの相当するシグナルが相互分離しないが（**Fig.-8, A**）， $\text{Pr}(\text{fod})_3$ を加えていくと、両脂肪酸メチルの各相当シグナルで、そのシフト値に差が現れ、明確にピークが分離する（**Fig.-8, B**）。

分離したピークを単一化合物についての実験結果と比

Fig.-8 NMR spectra (60 MHz) of a mixture of methyl oleate and methyl petroselinate without $\text{Pr}(\text{fod})_3$ (A), and with $\text{Pr}(\text{fod})_3$ (B). $\text{Pr}(\text{fod})_3/\text{esters} = 0.84$. Ole, oleate; Pet, petroselinate.

較した結果、オレフィンプロトンのピークは、低磁場側よりオレイン酸メチルの C-9 及び 10、ペトロセリン酸メチルの C-7、同 C-6 の順に 3 群に分離し、エステルメチルプロトン（d）は低磁場側がペトロセリン酸メチル、高磁場側がオレイン酸メチルのものであり、両一重線間の間隔は $\text{Pr}(\text{fod})_3/\text{エステル} = 0.80$ 付近で約 12 Hz であった。また脂肪酸側の C-2~C-4 は、 $\text{Pr}(\text{fod})_3$ の添加によっても相当するそれぞれのプロトンのピークは相互分離しないが、各脂肪酸によってわずかなシフト値の差が生じ、その結果として多重線のシグナルの先鋭度は減少する。

この **Fig.-8, B** に見られるようなシグナルの分離を利用して、各ピークの積分値からペトロセリン酸のモル百分率を算出することができる（積分値 a~f は **Fig.-8, B** の記号 a~f の測定値に対応する）。

オレイン酸とペトロセリン酸だけの混合物の場合、

$$\text{ペトロセリン酸 \%} = \frac{100b}{a+b} \quad (3)$$

両脂肪酸以外に他の脂肪酸も入っている場合、

$$\text{ペトロセリン酸 \%} = \frac{500e}{c} \quad (4)$$

または

$$\text{ペトロセリン酸 \%} = \frac{200e}{f} \quad (5)$$

なお定量の場合のシフト試薬の添加モル比は、

Table-2 Estimation of methyl petroselinate by NMR using $\text{Pr}(\text{fod})_3$.

Methyl esters	Method*	Fatty acid composition (mol %)		
		Petroselinic	Oleic	Others
Mixture I	Weighed	17.8	82.2	
	NMR (3)	18.5	81.5	
	NMR (4)	17.2	82.8	
	NMR (5)	17.9	82.1	
Mixture II	Weighed	47.5	52.5	
	NMR (3)	48.7	51.3	
	NMR (4)	46.9	53.1	
	Oxidation	48.5	51.5	
Mixture III	Weighed	59.3	40.7	
	NMR (3)	60.0	40.0	
	NMR (4)	60.6	39.4	
	NMR (5)	58.3	41.7	
Methyl esters from carrot seed triacylglycerols	Oxidation	60.4	39.6	
	NMR (4)	61.5	38.5	
	Oxidation	61.7	20.8	17.5

* Numbers in parentheses indicate the numbers of equations employed, respectively (see text). Estimation by the oxidation method was carried out in combination with gas-liquid chromatography. The ratio of petroselinic to oleic in their overlapped peaks on gas-liquid chromatogram could be calculated from the ratio of lauric to nonanoic acid produced by a modified periodate-permanganate oxidation^{15),16)}.

$\text{Pr(fod)}_3/\text{エステル}=0.8\sim0.9$ 程度が適当である。

この方法を使って混合脂肪酸メチル中のペトロセリン酸メチルを定量した例を **Table-2** に示す。上記のどの計算式を使っても大体一致した値が得られた。また酸化法 (**Table-2** 脚注参照) による定量値とも一致した。

3.5 試料の回収

試料メチルエステル7~30mg, シフト試薬, 及び TMS を含む NMR 測定後の四塩化炭素溶液 0.2~0.4 ml に 6 N-塩酸 2 ml とエーテル 5~10 ml を加え, ふりまぜた後, 5 回水洗を繰り返し, エーテル層を分離した。エーテル層は, 硫酸ナトリウム (無水物) で脱水後, 溶媒を留去し, 試料 エステルを回収した。これを GLC (固定液相 DEGS, 温度 205°C) 及び TLC (シリカゲル G プレート, 溶媒ヘキサン-エーテル-酢酸 (70:30:1)) で分析したところ, もとのメチルエステルのみが回収され, シフト試薬及び TMS が除かれていることを確認した。この回収メチルエステルをさらに精製分離するには, 上記の TLC を利用するのが適当である。

4 考 察

シフト試薬を用いる脂肪酸の構造研究は, 本実験に使ったような, 特に高性能でもない普及機種を用いた場合, とりわけ効果的であるように思われる。著者らも Eu(fod)_3 を用い, 以上の基礎的な知見をもととして, 複雑な構造のアシルオキシボリアセチレン酸メチルの構造決定に有効に利用することができた⁷⁾。

Pr(fod)_3 を用いた例は Eu(fod)_3 の場合ほどまだ多くはないが, このシフト試薬も極めて有効に利用できる。特に Eu(fod)_3 とは反対に高磁場側へプロトンのシグナルが移動する点が貴重であり, 二重結合及びその周辺のプロトンのシグナルと, 他のメチレン及びメチルプロトンとのシグナルを完全に分離するには効果的であって, 定量の目的には都合がよい。ただし前述のように, Pr(fod)_3 の添加許容量は Eu(fod)_3 の場合よりも小さく, メチルエステルに対し等モル程度までであって, それ以上の添加による著しいシフト効果は認められなかった。

この実験の条件では, 実用的に完全に区別をつけうる脂肪酸のメチレンプロトンは, 不飽和結合近辺のもののほか, C-5 及びそれよりカルボキシ基に近いメチレンプロトンであって, それ以外のメチレンプロトンのシグナルは重なって分離しないが, 重水素化された Eu(fod)_3 - d_{30} や Pr(fod)_3 - d_{30} を用いることによって, シフト試薬自身のプロトンによる妨害がなくなり, さらに分離精度が増すものと思われる。

シフト試薬の増加は, プロトンシグナルの移動の増大をもたらすが, 反面ピークの幅も増大し, その先鋭度を減ずる。ことに混合脂肪酸メチルの場合は, 脂肪酸の種類によって, 各相当プロトンのシフト値にいくらか差が

出てくることがあるので, シフト試薬を比較的多量添加したときの各ピークの多重線の先鋭度は失われやすい。

脂肪酸の分析には, この報文のようにメチルエステルとして NMR にかけることが望ましい。四塩化炭素に対する溶解度がよいばかりではなく, エステルメチルの明りょうな一重線が, シフト試薬を加えたときの他のプロトンのシフト値の定性的指標となりうるからである。さらにこの一重線は, 脂肪酸炭素鎖部の構造の相異によって, シフト試薬添加の場合に, 各脂肪酸メチルでシフト値に差が生じることが多い。この現象と, シフト値に変動が少ない二重結合周辺のプロトンのシグナルとを利用して, 脂肪酸の定量が可能となった。

実用的な定量精度の面と, 試料が比較的多量 (7 mg 以上) 必要とする点では GLC に劣るが, 試料が完全に回収できる点が利点である。ことに GLC では分離困難なオレイン酸とペトロセリン酸の分離, 定量には効果的であった。なお NMR を利用する一般飽和, 不飽和脂肪酸の定量は古くから試みられてはいるが, シフト試薬発見以前のため, 十分な成果はあげられていない^{17), 18)}。

以上のような脂肪酸メチルに対するシフト試薬添加に関する基礎的知見をもととして, この方法が脂肪酸の構造研究のみならず, 定量その他の新しい応用法の開発にも発展していくことが期待される。

(昭和54年1月17日受理)

文 献

- 1) D. Swern, J. P. Wineburg, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **48**, 371 (1971)
- 2) G. J. Boudreaux, A. V. Bailey, V. W. Tripp, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**, 200 (1972)
- 3) J. P. Wineburg, D. Swern, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**, 267 (1972)
- 4) D. J. Frost, I. Sies, *Chem. Phys. Lipids*, **13**, 173 (1974)
- 5) J. P. Wineburg, D. Swern, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 142 (1973)
- 6) J. P. Wineburg, D. Swern, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 528 (1974)
- 7) K. Ichihara, T. Kawai, M. Kaji, M. Noda, *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 353 (1976)
- 8) N. Ikeda, K. Fukuzumi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 340 (1974)
- 9) P. E. Pfeffer, H. L. Rothbart, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 2533 (1972)
- 10) Y. Wedmid, C. Litchfield, *Lipids*, **10**, 145 (1975)
- 11) D. J. Frost, J. Bus, R. Keuning, I. Sies, *Chem. Phys. Lipids*, **14**, 189 (1975)
- 12) J. Bus, C. M. Lok, A. Groenewegen, *Chem. Phys. Lipids*, **16**, 123 (1976)
- 13) Y. Wedmid, C. Litchfield, *Lipids*, **11**, 189 (1976)
- 14) C. R. Smith, Jr., R. V. Madrigal, D. Weisleder, R. D. Plattner, *Lipids*, **12**, 736 (1977)
- 15) E. P. Jones, J. A. Stolp, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **35**, 71 (1958)
- 16) E. P. Jones, V. L. Davison, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 121 (1965)
- 17) W. H. Storey, Jr., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **37**, 676 (1960)
- 18) C. A. Glass, H. J. Dutton, *Anal. Chem.*, **36**, 2401 (1964)