

DETERMINATION DES TRACES DE METAUX DANS LES CORPS GRAS :
COMPARAISON DES DIFFERENTES METHODES D'ANALYSE (*)

par M. PINTA, CRSTOM - BONDY

Mon objectif n'est pas de vous enseigner le rôle de certains éléments métalliques dans les corps gras, mais plutôt d'examiner les moyens physico-chimiques permettant d'étudier le mécanisme de leur action et les conséquences de leur présence dans le milieu qui vous intéresse aujourd'hui. Permettez-moi toutefois, de rappeler très brièvement l'origine des éléments en traces et le domaine de leurs teneurs.

Les éléments alcalins (K, Na, et alcalino-terreux (Ca, Mg), nécessairement présents dans les milieux végétal et animal, se retrouvent par voie de conséquence dans les huiles et graisses. Les substances brutes, peuvent contenir quelques dixièmes à quelques dizaines de ppm de Na, K, Ca ou Mg. A des teneurs plus faibles, il en sera de même pour les oligo-éléments, particulièrement Fe, Cu, Zn, Mn, également Ni et Co, présents dans les huiles brutes, au niveau de 0,01 à 1 ppm. Ces métaux, en particulier les métaux de transition tels Fe et Cu, ont des rôles divers sur les corps gras, notamment sur leur stabilité ; ils interviennent comme catalyseur d'oxydation ; leur teneur au-delà d'une certaine valeur, est préjudiciable à leur conservation. La présence de métaux peut aussi provenir du traitement de l'huile : raffinage (Na), hydrogénation (Ni).

Les niveaux de teneurs que l'on rencontre, ne sont pas sans poser quelques difficultés dans leur détermination chimique. J'examinerai donc de façon critique, le domaine d'application des principales méthodes physico-chimiques possibles, telles que la colorimétrie, l'absorption atomique, la spectroscopie d'émission, la polarographie, la spectrométrie de masse à étincelle, la radiocactivation.

Mais dans un premier temps, il convient de parler de la préparation de l'échantillon qu'il n'est pas possible d'analyser sans un traitement préalable.

(*) IIIème S.I.O.L., pp. 77-89, Institut des Corps Gras, Paris, I. O. L.
27-30 septembre 1973.

14.10.1974

S.I.O.L.

Centre de Recherches

B 7172 Fedo

PREPARATION DES ECHANTILLONS

Dilution

Certaines techniques (photométrie de flamme, absorption atomique) peuvent n'exiger qu'une simple dilution de l'échantillon : il s'agit en général d'une solubilisation des huiles, graisses ... dans un solvant organique ; cette dilution est de 1/4 à 1/20. Les solvants les plus utilisés sont :

- la méthylisobutylcétone (LIST et al.), après addition d'acide dichloroacétique (PERSMARK) ;
- la méthyléthylcétone (MIBC) avec addition d'éthyléneglycol (KAHN) ;
- le mélange 50/50 acétate d'isoamyle-alcool méthylique.

Ces procédés, s'ils ont l'avantage de la simplicité, conservent la totalité de la matrice de l'échantillon, souvent gênante, et rehaussent, du fait de la dilution, les seuils de détection.

Extraction

On a songé à séparer les éléments traces des corps gras par extraction en milieu aqueux. Plusieurs procédés ont été proposés :

- dissolution de l'huile dans l'hexane et agitation avec de l'acide chlorhydrique à pH 2 (LUNDE) : dosage de Mn, Zn, Cu, Na, Br, par activation ;
- dissolution dans le chloroforme et extraction par fraction d'acide dilué ;
- ébullition à reflux avec HCl à 20% (PREVOT) ;
- dissolution de l'huile dans l'éther de pétrole et extraction avec de l'acide nitrique (PREVOT) : dosage de Na et K par absorption atomique ;
- dissolution dans l'isooctane et extraction à l'acide chlorhydrique à reflux (PERSMARK).

Ces méthodes, tout à fait séduisantes, permettent d'enrichir la solution soumise à l'analyse, mais il est à craindre des extractions incomplètes et non toujours reproductibles pour certains éléments.

Il peut en résulter des erreurs aléatoires importantes.

Minéralisation par calcination

Les matières organiques peuvent être séparées par calcination ; de très nombreuses méthodes publiées, ont été essayées avec plus ou moins de succès, ceci en raison de pertes de métaux par volatilisation de complexes organiques métalliques. EVANS et al. proposent une méthode qui consiste à carboniser l'échantillon avec calcination au four : l'huile (150 g) est chauffée 24 heures en capsule de Vycor à 300°, puis calcinée 16 heures à 500° au four. Le résidu est solubilisé dans 25 ml H₂SO₄ à 2% (à noter un facteur de concentration 150/25 = 6 qui permet d'abaisser les seuils de détection. PERSMARK et al. procèdent à la destruction en trois temps aux températures suivantes : 150 - 400 - et 500°.

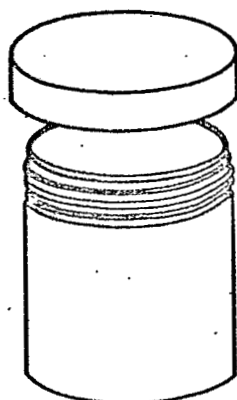


Fig. 1 - Bombe téflon pour minéralisation acide (diam. 45 mm hauteur 50 mm).

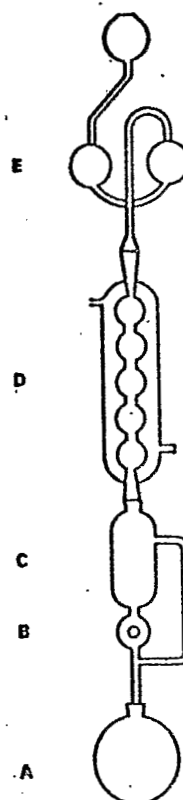


Fig. 2 - Appareil Pien, -

A : fiole d'attaque B : robinet C : piège
D : réfrigérant E : barboteur

On a également proposé des procédés de calcination à basse température en atmosphère d'oxygène.

Minéralisation par voie humide

L'ébullition à reflux, en présence d'acides sulfurique et nitrique, permet une destruction quasi totale des matières grasses. Il faut généralement des quantités d'acides relativement importantes et susceptibles d'apporter des contaminations (Ni, Cu, Fe ...). Il s'agit donc de réduire les quantités d'acides en jeu, ce qui est réalisé dans l'un des dispositifs suivants : bombe téflon (figure 1) - appareil Pien (figure 2).

L'attaque est généralement sulfurique et nitrique et n'exige que 5 à 10 ml d'acide pour quelques grammes de matières grasses. Un contrôle des acides est indispensable ; il constitue l'essai à blanc.

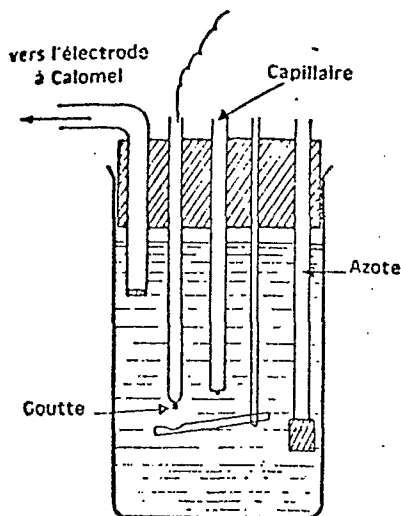


Fig. 3 - Cellule électrolytique en photographie inversée

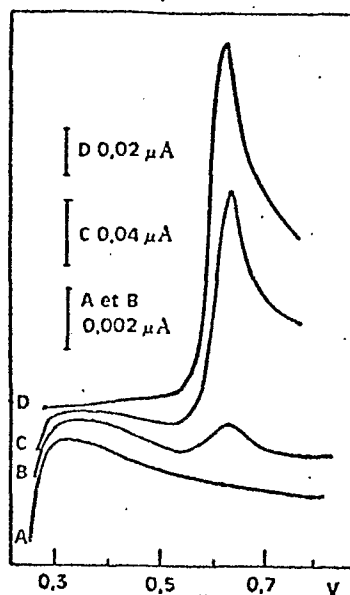


Fig. 4 - Courbe courant - tension en polarographie inversée

LES METHODES DE DOSAGES

Spectrophotométrie d'absorption et colorimétrie

C'est la méthode traditionnelle, probablement la première à avoir été utilisée au dosage de Cu, Ni, Fe ... dans les huiles ; il faut, dans un premier temps, minéraliser l'huile ou extraire les métaux en milieu aqueux. NEWLOVE, dans l'ouvrage "Laboratory Hand book for Oil and Fat Analysis" a passé en revue ces méthodes ; très utilisées il y a une dizaine d'années, elles paraissent dépassées aujourd'hui par l'absorption atomique.

La littérature ne nous propose pratiquement plus de méthode nouvelle, à l'exception peut-être de méthodes microcolorimétriques annulaires (microchromatographiques) selon le principe du four annulaire Weisz ; HANDA détermine Cu, Fe, Zn, Mn, dans le lait à des niveaux de 0, 1 à 0,2 ppm.

Polarographie

Parmi les méthodes polarographiques de conception et d'application récentes, on peut retenir la "polarographie inversée", mieux connue sous le nom d'"Anodic Stripping-Polarography", en raison du large gain (100 à 2000) de sensibilité qu'elle offre par rapport à la polarographie classique. Ceci réside dans le fait que le dosage est opéré après électrolyse, à un potentiel convenable, pendant un temps de 10 à 30 mn sur une seule goutte (goutte pendante) ; le schéma de la cuve électrolytique est représenté figure 3. On enregistre ensuite le polarogramme (courbe courant-tension) ($I = f(E)$) en partant d'un potentiel négatif pour remonter vers des valeurs plus positives (figure 4). L'enregistrement présente des pics qui résultent du départ de l'élément réduit à la goutte de mercure et de sa diffusion dans les couches voisines de l'électrode. On détecte des concen-

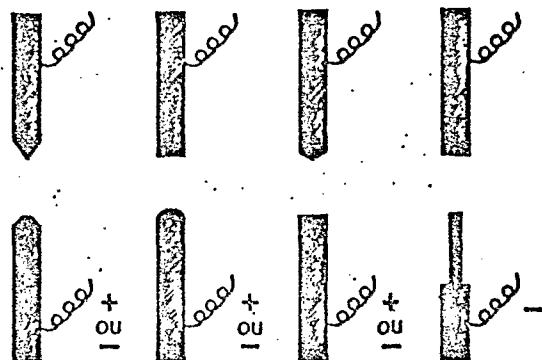


Fig. 5 - Différents types d'électrodes utilisées en spectrographie d'arc

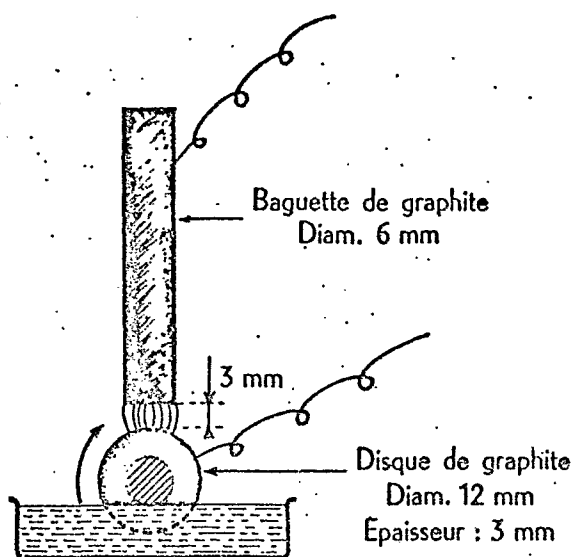


Fig. 6 - Electrode tournante utilisée en spectrographie d'étincelle

trations de 1 à 5 $\mu\text{g}/\text{l}$ de Zn; Cd, Pb. L'analyse des huiles et corps gras exige, bien sûr, une minéralisation avec destruction des matières organiques. NANGNIOT utilise la polarographie classique pour déterminer Cu et Fe dans les corps gras, mais la méthode proposée est certainement insuffisamment sensible pour atteindre les seuils des éléments (Fe, Cu ...) naturellement présents, la polarographie inversée doit permettre d'atteindre les seuils désirés.

Spectrographie d'Emission

Deux techniques doivent être envisagées :

- la spectroscopie d'arc sur échantillons minéraux solides,
- la spectroscopie d'étincelle sur solutions.

La première méthode exige donc une minéralisation suivie d'une évaporation à sec des acides ; le résidu est spectrographié dans un arc électrique entre deux électrodes convenables (figure 5). Classiquement, les seuils de détection sont de quelques ppm (pour le résidu minéralisé), à savoir Fe 10, Mn 3, Ni 3, Co 3, Cr 3, Zn 10.

Si l'on considère un facteur de concentration de 100 résultant de la minéralisation, les teneurs dosables dans les huiles sont : Fe 0,1 - Mn 0,03 - Ni 0,03 - Co 0,03 - Cr 0,03 - Zn 0,1 ppm.

La méthode est donc suffisamment sensible et d'application générale. L'erreur de fidélité peut atteindre 20%.

La seconde méthode (spectroscopie d'étincelle) permet l'analyse des solutions. L'échantillon liquide est introduit dans l'étincelle, par l'intermédiaire d'une électrode tournante (figure 6). La technique a été utilisée entre 1950 et 1970 pour l'analyse des huiles lubrifiantes. Il importe, toutefois, de diluer l'huile ($\frac{1}{4}$ à $\frac{1}{10}$) avec un solvant convenable (MIBC ...). Les seuils de détection sont, pour des conditions spectroscopiques classiques : Cu 0.5 - Fe 2

Deux types de techniques se font jour : l'absorption atomique en flamme et l'absorption atomique en four. C'est encore la flamme (figure 7) qui reste aujourd'hui, la source d'atomisation la plus répandue, encore que des fours (figure 8) en matériaux réfractaires (graphite, tantale ...), chauffés électriquement, commencent à être utilisés pour décomposer la substance à analyser et réduire à l'état atomique les éléments à déterminer.

Nous envisageons rapidement les propriétés des deux procédés. L'atomisation en flamme, est exploitée à l'analyse des huiles depuis huit années environ. PREVOT détermine Na et K soit après extraction à l'eau, soit après simple dilution (1/10 et 1/30), dans un solvant organique. Dans le premier cas, il dose 0,003 ppm et Na et K, dans le second 0,010 et 0,030 ppm respectivement pour Na et K. GUILLAUMIN, après dilution (1/10 dans un mélange alcool méthylique-acétate d'isomyle) peut doser (en ppm) Na 0,1 - Ca 0,4 - Mg 0,005 - K 0,05 - Fe 0,1 - Cu 0,05 - Ni 0,5. Ces seuils peuvent paraître souvent insuffisants (Cu, Fe, Ni). C'est pour quoi on est amené à minéraliser pour concentrer les éléments dans un volume suffisamment restreint : ainsi EVANS concentre après minéralisation, les éléments minéraux de 50 à 150 g d'huile dans 25 ml, et peut ainsi déterminer le cuivre à partir de 0,01 ppm. On peut extrapoler la méthode d'EVANS et al. à bien d'autres éléments : Mn, Fe, Ni, Co, dont les seuils de détection sont du même ordre de grandeur.

La méthode la plus séduisante consiste sans aucun doute à diluer l'échantillon pour l'introduire dans une flamme ; les mesures d'absorption atomique permettent le dosage de Na, K, Ca Mg à leurs teneurs naturelles. La détermination des oligo-éléments risque fort de manquer de sensibilité. Si l'on admet comme dilution minimale une dilution de 5, nous pouvons retenir les seuils suivants comme généralement valables : Co 0,5 - Cr 0,2 - Cu 0,1 - Fe 0,3 - Mn 0,05 - Ni 0,2 - Zn 0,05 selon notre propre expérience.

Les techniques d'atomisation en four électrique, devraient permettre un gain de sensibilité souvent suffisant pour atteindre et mesurer les teneurs normales ou critiques des éléments Fe, Cu, Mn, Ni dans les corps gras.

Les techniques pratiques sont à l'étude. LAGATHU et al. parviennent à déceler : Cu 0,004 - Fe 0,002 - Co 0,007 - Mn 0,0013 - Sr 0,002 ppm dans le lait. PREVOT analyse les huiles avec des seuils de 0,01 ppm pour Fe, Cr, Ni et 0,008 ppm pour Cu. Nous avons procédé pour notre part à quelques essais qui ont montré la possibilité de déterminer Cu, Mn, Fe, Ni dans de bonnes conditions, aux teneurs supérieures à 0,01 ppm. A noter, cependant, dans de nombreux cas, l'importance d'absorption non spécifique gênante, en particulier pour les éléments volatils (Pb, Cd, Cu ...) qu'il est indispensable de corriger à l'aide d'un dispositif convenable, d'ailleurs classique aujourd'hui. Mais il convient de préciser que ces méthodes doivent encore être exploitées avec prudence. Les meilleures conditions d'atomisation, dépendent de nombreux facteurs liés en particulier à la matrice, au solvant, à l'instrument. Il faut bien admettre que l'on n'a pas encore véritablement maîtrisé les conditions de répétabilité des analyses. Les principales difficultés rencontrées et qu'il ne faut pas sous-estimer, sont dans la mise au point des conditions optimales de décomposition de la matrice et d'atomisation des éléments à déterminer.

L'analyse est effectuée à partir de volume de 20 à 50 μ l d'échantillon dilués 3 à 10 fois dans un solvant suffisamment volatil : MIBC par exemple. Il s'agit donc, d'une méthode microanalytique permettant la détermination des traces. Il convient encore de signaler une difficulté liée à l'analyse directe de l'échantillon simplement dilué : à savoir, l'étalonnage de la méthode dont dépend finalement la justesse des résultats. Les procédés possibles d'étalonnage sont évoqués plus loin.

Spectrométrie de masse

A côté des méthodes physiques classiques très largement répandues dans les laboratoires d'analyses, on doit signaler des techniques moins connues, mais néanmoins susceptibles de compléter les possibilités analytiques des méthodes précédentes : la spectrométrie de masse à étincelle et la radioactivation.

Avec la spectrométrie de masse, on entre dans le domaine de la recherche de traces infimes : 0,001 à 1 ppm : l'échantillon est ionisé dans une étin-

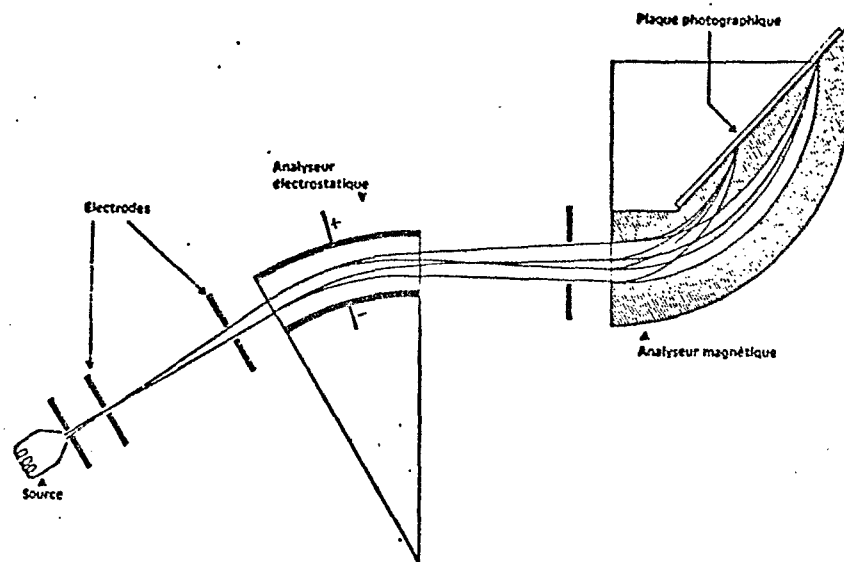


Fig. 9 - Spectroscopie de masse à étincelle

La Radioactivation

Lorsqu'un échantillon est soumis à un bombardement de particules de forte énergie, telles que les hélions obtenus dans un cyclotron ou les neutrons formés dans la réaction en chaîne d'une pile atomique, il y a formation de noyaux radioactifs dans l'échantillon. Le nombre $\frac{dN}{dt}$ de noyaux formés à un instant donné dt à partir de l'élément étudié, est exprimé par la différence entre la vitesse de formation des noyaux radioactifs et la vitesse de décroissance de la radioactivité des noyaux, soit :

Utilisée comme procédé analytique, une mesure de radioactivité doit être spécifique de l'élément étudié ; si l'échantillon contient plusieurs éléments activables, trois possibilités s'offrent pour achever l'analyse :

- 1°) Une séparation chimique convenable permet de mesurer l'activité sur un produit "radiochimiquement pur" ;
- 2°) si les périodes des éléments activés sont suffisamment différentes, il est possible, à l'aide de la courbe de décroissance radioactive de l'échantillon, de déterminer la radioactivité propre à chacun des éléments avec le seul usage d'un compteur de mesure ;
- 3°) la détermination de plusieurs radio-éléments simultanément présents est possible par spectrométrie β ou γ .

La première caractéristique de la radioactivation est sa très grande sensibilité, pratiquement inégalée dans les autres méthodes.

La technique générale pratique de dosage d'un élément donné E par radioactivation, comprend les opérations suivantes :

- 1°) Irradiation dans les conditions déterminées d'une quantité connue d'échantillon ;
- 2°) mise en solution du produit irradié et addition à la solution d'une quantité connue de l'élément E, sous la même forme chimique, et non radioactif, devant servir ensuite d'entraîneur de l'isotope radioactif ;
- 3°) séparation chimique de la totalité de l'élément E (quantités initiales et ajoutées) sous forme d'un composé chimique défini ;
- 4°) détermination du rendement de l'opération (3°) si celle-ci n'est pas quantitative ;
- 5°) préparation d'une gamme de témoins radioactifs dans les conditions analogues ;
- 6°) détermination et comparaison des radioactivités des produits inconnus et des témoins.

Incontestablement, la radioactivation vient, un peu comme la spectrométrie de masse à étincelle, compléter le champ d'application des méthodes physiques d'analyse, en particulier dans le domaine des traces entre 0,001 et 1 ppm.

La sensibilité et la précision de "l'activation" est fonction des nombreux paramètres intervenant dans la réaction. Lorsque l'irradiation est faite sur l'échantillon brut, les risques de contamination, sont pratiquement inexistantes.

Très utilisée en biologie, la radioactivation l'a été également dans le domaine des corps gras ; signalons notamment les travaux de SHINBORI et al. sur le dosage de As dans les huiles raffinées, de LUNDE sur As et Br dans les huiles, SOULIOTIS sur le Ni dans les huiles hydrogénées ... HERRMANN et al. se sont livrés à une étude fort intéressante sur les propriétés comparées de l'émission de flamme, de l'absorption atomique et de la radioactivation ; ces auteurs concluent "qu'aucune méthode n'est véritablement supérieure ou préférable aux autres ; en fait, elles sont complémentaires". Voici quelques limites de détection pour les milieux biologiques en général, en absorption atomique en flamme (A.A.) et activation (R.A.) rapportées par HERRMANN :

A.A.

R.A

Co : 3.10^{-9} (0,003 ppm)

3.10^{-11} (0.00003 ppm)

Cu : 1.10^{-8} (0,01 ppm)

10^{-9} (0,001 ppm)

Fe : 3.10^{-9} (0.003 ppm)

4.10^{-4} (100 ppm)

Mn : 10^{-8} (0,01 ppm)

2.10^{-10} (0.0002 ppm)

de travail. Il est bien évident que l'on doit chercher à simplifier les opérations chimiques préliminaires à la mesure ; c'est ce qui est partiellement réalisé en spectrométrie d'absorption atomique. Il en est de même en radioactivation lorsque l'activation est faite sur l'échantillon brut, avant tout traitement.

Etalonnage et étalons

Pratiquement, dans toute méthode physique d'analyse, les mesures sont comparatives à des substances étalons ; il s'agit généralement d'échantillons synthétiques dont la composition matricielle (constituants majeurs) est voisine du milieu étudié. Lorsqu'il s'agit d'analyser, ou plus exactement de mesurer, sur solutions (les traitements chimiques étant mis à part), il est facile de préparer des solutions de composition semblable à celles soumises au dosage, bien que souvent, on doive tenir compte d'effets de matrice capables de causer d'importantes erreurs de justesse.

Dans le cas de l'analyse des corps gras, trois aspects doivent être envisagés. Tout d'abord, lorsque l'analyse est faite après minéralisation, on est en présence d'un milieu minéral aqueux dont les effets de matrice sont faciles à connaître par suite à corriger, à l'aide en particulier d'étalons synthétiques convenables. En second lieu, l'analyse est exécutée sans séparation chimique : c'est ce qui se passe, par exemple, en absorption atomique en flamme ou en spectroscopie d'étincelle sur solution. Il s'agit alors de préparer des solutions organiques synthétiques adéquates. La matrice peut être constituée par un échantillon de même type ou de composition voisine, par exemple de l'huile de soja raffinée, mais exempt des éléments à doser (BLACK) ; ceci n'est pas toujours possible. Les éléments (Cu, Fe, Mn, Cr, Ni ...) sont solubilisés dans la matrice à partir de complexe organique de composition connue. A cet effet, on peut partir des cyclohexanebutyrates de Co, Cu, Ni, Mg, Mn, Na, Sr ... en solution déterminée dans la MIBC. Certains auteurs font abstraction de la matrice pour n'utiliser que des solutions simples des composés métalliques. Ceci n'est pas toujours valable, en particulier en absorption atomique sans flamme où il importe que le programme de décomposition, aboutisse à une élimination totale de la matière organique. Certains auteurs ont aussi tenté l'utilisation de solutions aqueuses. Un troisième aspect enfin, concerne : le problème des étalons et de leur conservation. Aux teneurs inférieures à 1 ppm, on peut craindre lorsqu'il s'agit de solutions synthétiques, à la fois des contaminations dues aux récipients, et une évolution (précipitation) dans le cas de complexes organiques.

Les problèmes d'étalonnages, d'autant plus importants aux basses teneurs, sont très sensiblement les mêmes pour tous les milieux analysés (minéraux, végétaux, biologiques). Dans de très nombreux domaines d'analyses de milieux naturels, bien des difficultés ont été surmontées grâce à l'emploi d'échantillons naturels "étalons" ; il s'agit de produits de même type que ceux à étudier et qui ont été analysés par un nombre suffisant de laboratoires et par le plus de techniques possibles valables. Il a été montré que, toutes valeurs aberrantes mises à part, la moyenne des résultats interlaboratoires, pouvait être considérée comme un résultat "juste".

A ma connaissance, il ne semble pas exister de tels échantillons pour l'analyse des corps gras ; il y a probablement, là, une lacune d'ailleurs facile

à combler, puisque dans le domaine similaire des huiles lubrifiantes, on a pu constituer toute une série de tels étalons.

Etant donné l'intérêt des métaux à l'état de traces dans les huiles et graisses, et donc l'importance de leur détermination, il ne devait pas être difficile d'organiser une étude coopérative interlaboratoire qui permettrait de définir quelques échantillons types, devant servir ensuite au contrôle des différentes méthodes d'analyse utilisées dans chaque laboratoire ; si certaines méthodes sont incontestablement plus fidèles que d'autres, on ne peut, en revanche, affirmer que telle méthode est plus juste et plus sûre que les autres. J'ai tenté de dégager les principales causes d'erreur des différents procédés de la chimie analytique moderne. Seul, à mon avis, l'utilisation d'échantillons naturels "étalons" permettra une classification des techniques et par suite, le choix le plus valable de la méthode à utiliser en fonction du problème à résoudre. Cette dernière suggestion sera, si vous le voulez bien ma conclusion.

B I B L I O G R A P H I E

- AHEARN (A.J.) - J. Appl. Phys., (7) 1961, II97
BLACK, (T.) - J. Amer. Oil. Chem. Soc., 47 (9), 1970, 313-315
EVAN (C.D.), LIST (G.R.) and BLACK (L.T.) - J. Amer. Oil. Chem. Soc.,
48, 1971, 840
GUELLAUMIN (R.) - Rev. Franc. des Corps Gras, (7) 1969, 497
HANDA (A.C.) and JOHRI (K.N.) - Anal. Chim. Acta, 59, (I), 1972, 156
HERMANN (R.) and LANG (W.) - in Nuclear Activation Techniques in the Life
Sciences, proceedings of a symposium, Amsterdam. Ed. Internation.
Atom. Energy Agency, Vienna 1967, 247.
KAHN (H.L.) and KERBER (J.D.) - J. Amer. Oil Chem. Soc. 48 (9) 1971, 434
LAGATHU (j.) et DESIRANT (J.) - Rev. Franc. des Corps Gras (3), 1972 169
LUNDE (G.) - J. Amer. Oil. Chem. Soc., 48, 1971, 517
LUNDE (G.) - J. Amer. Oil. Chem. Soc., 49, (I), 1972, 44
MANGNIOT (P.) - La polarographie en agronomie et en biologie. Ed. Duculots,
Gembloux, 392 p.
O'CONNOR (R.T.) et al. - J. Amer. Chem. Soc., 24 (6), 1947, 185
PERSMARK (U.) and TOREGARD (B.) - J. Amer. Oil. Chem. Soc., 48, 1971, 650-652
PIEN (J.) - Ann. Fals. Fraudes., 47, 1954, 266
PINTA (M.) - Dosage des éléments à l'état de traces dans les roches et les autres
substances minérales naturelles, Coll. Nation. C.N.F.S., Nancy
1968, 923, Ed. C.N.F.S. Paris 1970, 25
PREVOT (A.) - Atom. Absorpt. Newsletter, 5 (2), 1966, 13-16
PREVOT (A.) - Rev. Franc. des Corps Gras, (II), 1971, 655
PREVOT (A.) et GENTE (M.) - Rev. Franc. des Corps Gras, (2), 1973
PRICE (W.J.), ROOS (J.T.H.) and CLAY (A.F.) - Analyst, 95, 1970, 760
ROSCHNIK (R.K.) - J. Dairy Sci., 55 (6), 1972, 750
SHINBORI (Y.) and KUWAHARA - J. Jap. Oil. Chem. Soc., 18, (3), 1969, 37
SOULIOTIS (A.G.) - Anal. Chem. 36, 1964, 1385
TAUFELK et al. - Fette. Seifen Austrich, 60 (7), 1958, 534