

일단계 추출 및 메틸화법에 의한 유료작물의 지방산 분석

김진경*[†] · 김남희* · 방진기* · 이병규* · 박충범* · 이봉호*

*작물시험장

Fatty Acid Composition Analysis of Major Oil Crops by One-Step Extraction/Methylation Method

Jin-Kyung Kim*[†], Nam-Hee Kim*, Jin-Ki Bang*, Byung-Kyu Lee*,
Chung-Berm Park* and Bong-Ho Lee*

National Crop Experiment Station, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT: Lipid extraction preceding fatty acid methyl esters preparation for gas-liquid chromatography is time-consuming and cumbersome. We performed one-step extraction/methylation method with a mixture of methanol-heptane-benzene-DMP-H₂SO₄ without prior fat extraction. The simultaneous digestion and lipid transmethylation takes place at 80°C in a single phase. After cooling till room temperature, two phases are formed. The upper one of the phases contains the fatty acid methyl esters ready for GLC. The fatty acid composition of major industrial crops obtained by the one step extraction/methylation method (method 1 and 2) was almost identical with the fatty acid composition of the pure fats extracted with hexane by the Soxtec instrument (method 3). Due to its simplicity, speed, and reduced organic solvent the one-step extraction/methylation method (method 1 and 2) should be useful to determine overall fatty acid composition, especially in situations where many samples have to be analyzed.

Keywords: lipid extraction, methylation, fatty acid composition, oil crop.

유지의 지방산 조성은 기체-액체 크로마토그래피(GLC, Gas-Liquid Chromatography)에 의하여 주로 분석한다. GLC에서는 분리하고자 하는 혼합물을 기화시켜 질소 혹은 헬륨과 같은 불활성기체[mobile phase]와 함께 액체막을 입힌 고체분말[stationary phase]이 채워져 있는 관 속으로 통과시키는데 이 때, 이동상과 정지상 사이에 시료물질의 분포 평형을 이루게 되고 검출기를 순차적으로 통과하게 된다. GLC로 분석하기 위해서는 먼저 시료가 기화되어야 하는데 유지의 주요 성분인 triglyceride는 끓는 점이 높아 기화될 수 없으므로 trigly-

ceride를 가수분해한 후 휘발성인 구성 지방산의 메틸에스테르를 만든 다음 분석하여야 한다.

반면 지방산의 메틸에스테르를 만드는 방법으로는 유지의 가수분해로 생성되는 유리지방산을 diazomethane로 에스테르화하는 방법과 메탄올 중 촉매량의 산 또는 알칼리에 의해 에스테르 교환반응을 일으켜 만드는 방법 등이 있다(Morrison and Smith, 1964; Christie, 1992; Glass, 1971). 그러나 이들 방법은 모두 지방산의 메틸에스테르를 만들기에 앞서 지방을 먼저 추출해야 하므로 분석하는 시간이 많이 소요되는 단점이 있다. 따라서 지질의 추출 및 지방산의 메틸에스테르를 한번에 실시하는 방법들에 대한 연구가 많이 진행되고 있다(Browse *et al.*, 1986; Ulberth and Henninger, 1992; Fourie and Basson, 1990; Luddy *et al.*, 1968).

한편 유료작물 연구분야에서는 지방산 조성이 품질에 상당한 영향을 미치기 때문에 이를 개량하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이를 위해서는 여러 가지 육종방법 혹은 다른 처리에 따라 대량의 시료에 대한 지방산 분석이 신속하게 이루어져야 한다. 지금까지 실시해온 기존의 방법으로는 시료량이 많이 들고 지방산의 메틸에스테르에 앞서 지방을 먼저 추출해야 하므로 한꺼번에 많은 양을 분석해야 하는 육종에는 사용하기가 적합하지 않다.

따라서 본 연구에서는 지질 추출 및 지방산의 메틸에스테르화를 한번의 단계에서 실시하도록 식물체 조직을 분쇄하고 지질을 transmethylation하며 지방산의 메틸에스테르 추출을 한번의 단계에서 실시하도록 혼합시약을 조제하여 실험하였으며, 또한 이미 추출된 지방에 대해서도 이 혼합시약을 사용하여 분석하였다.

이 방법은 Rafael Graces 등(1993)이 제안한 방법으로 다른 개량된 지방산 분석 전처리법보다 훨씬 더 간단하며 특히 수분이 있는 시료에도 사용할 수가 있다.

One-step extraction/methylation method(일단계 추출 및 메

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6722 (E-mail) kbatajm@chollian.net

<Received May 9, 2000>

탈화법을 유묘작물에 적용할 수 있는지를 보기 위하여 기존의 메틸에스테르화 방법과 비교, 몇가지 유묘작물을 대상으로 지방산 조성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

방법을 달리한 지방산 조성 분석에 사용된 공시재료로 참깨, 들깨, 땅콩, 홍화, 아마 등은 1999년 작물시험장 특작과 시험포장에서 재배된 것을 시료로 하였고 유채는 도입된 종자를 대상으로 각각 3품종을 공시하였다.

참깨, 들깨, 유채, 아마는 균일한 종자를 선택하여 그대로 사용하였고 땅콩과 홍화는 blender로 간 후 시료로 사용하였다. 방법 1은 종자 2~3립 혹은 분말 시료 일정량을 Teflon cap이 있는 튜브에 넣고 종자를 부순다음 methylating mixture (methanol : benzene : 2,2-dimethoxypropane(DMP) : H₂SO₄=39:20:5:2, v/v, 냉암소에 보관)를 340 μ l 넣고 heptane 200 μ l 를 넣어 충분히 혼든 다음 80°C에서 2시간 추출하였다. 메탄올성 H₂SO₄는 free fatty acids와 glycerolipids를 메틸에스테르화 하는데 필요하며 benzene은 triacylglycerols과 같은 비극성 지질을 추출하며 또한 모든 성분들이 반응온도에서 단일층을 형성하도록 하는데 필요하며 DMP는 glycerolipids의 transmethylation을 향상시키는 동시에 과량의 물을 잡아주므로 신선한 상태의 시료로부터 지방산의 메틸에스테르를 만드는 데 효과적이다(Mason and Waller, 1964; Browse *et al.*, 1986; Garcés and Mancha, 1993). 추출한 후 상온으로 냉각하여 두 층이 형성되면 위의 층에서 일정량을 취해 GLC로 분석하였다. 15% diethylene glycol succinate로 충전된 glass column을 사용하였고 column 과 injector 온도는 각각 200, 220°C로 하였으며 detector는 FID, 온도는 220°C로 하였다.

방법 2는 먼저 시료로부터 지방을 추출한 다음 이 지방을 대상으로 방법 1에 따라 실험하였다.

방법 3은 대조방법으로서 hexane으로 지방을 추출한 다음 sodium methoxide를 촉매로 하는 methanolysis법에 따라 에스테르화 하여(이 등, 1974) GLC로 분석하였으며 분석조건은 위와 동일하게 하였다.

결과 및 고찰

지방산의 메틸에스테르를 만드는 방법에 따라 몇 가지 주요 유묘작물의 지방산 조성을 실험한 결과는 Table 1~Table 6과 같다.

참깨의 주요 지방산 조성은 Table 1과 같이 팔미틴산(C16:0), 스테아린산(C18:0), 올레인산(C18:1), 리놀산(C18:2)이 검출되었다. 추출된 지방을 대상으로 methylation방법을 달리한 방법 2와 3에서는 지방산이 거의 동일한 함량을 보였고 원시료를 대상으로 한 방법 1 역시 동일한 패턴을 보였다. 다만 팔미틴산이 약간 높게 나타났으나 유의적인 차이가 없었다.

들깨는 Table 2에서 보는 바와 같이 팔미틴산, 스테아린산, 올레인산, 리놀산, 리놀렌산(C18:3)이 검출되었고 방법간에 조성상의 차이는 없었다.

Table 3은 땅콩의 지방산 조성을 나타낸 것이다. 땅콩의 지방산으로는 포화지방산인 팔미틴산, 스테아린산, 아라키딘산(C20:0), 베헨산(C22:0)과 불포화지방산인 올레인산, 리놀산, 에이코젠산(C20:1)으로 구성되어 있으며 방법에 따른 함량의 차이는 없었다.

유채는 모두 에루진산이 없는 도입종자를 대상으로 실험하였으므로 주요 지방산 조성은 팔미틴산, 스테아린산, 올레인산, 리놀산, 리놀렌산으로 나타났으며 품종에 상관없이 올레인산의 함량이 65~66%를 차지하고 있었다(Table 4). 방법간에 지방산 조성의 차이는 없었다.

홍화의 경우 지방산 조성은 팔미틴산, 스테아린산, 올레인산, 리놀산으로 특히 리놀산 함량은 78~80%를 나타내었다

Table 1. Composition of fatty acid of seame according to a different method of transmethylation (% , mean \pm sd).

Variety	Method [†]	Composition of fatty acid [‡]			
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Ansankkae	1	10.50 \pm 0.17	5.46 \pm 0.23	41.99 \pm 0.04	42.06 \pm 0.02
	2	9.48 \pm 0.15	5.68 \pm 0.05	42.48 \pm 0.06	42.36 \pm 0.13
	3	9.21 \pm 0.22	5.37 \pm 0.05	42.09 \pm 0.09	43.34 \pm 0.29
Yangbagkkae	1	9.27 \pm 0.19	5.30 \pm 0.18	41.61 \pm 0.24	43.83 \pm 0.11
	2	8.82 \pm 0.14	5.46 \pm 0.05	41.45 \pm 0.10	44.26 \pm 0.27
	3	8.99 \pm 0.08	5.08 \pm 0.04	40.89 \pm 0.07	45.04 \pm 0.01
Yanghugkkae	1	9.99 \pm 0.08	4.31 \pm 0.25	39.34 \pm 0.13	46.36 \pm 0.04
	2	9.88 \pm 0.40	4.75 \pm 0.10	40.42 \pm 0.25	44.95 \pm 0.13
	3	9.02 \pm 0.13	4.55 \pm 0.14	40.40 \pm 0.22	46.03 \pm 0.40

[†]method 1: one step e/m method using two or three seeds or powder of the samples

method 2: one step e/m method using extracted lipids

method 3: control method using extracted lipids.

[‡]C16:0-palmitic acid C18:0-stearic acid C18:1-oleic acid C18:2-linoleic acid

Table 2. Composition of fatty acid of perilla according to a different method of transmethylation (% mean \pm sd).

Variety	Method [†]	Composition of fatty acid [‡]				
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Hwahong-deulkkae	1	7.08 \pm 0.74	2.42 \pm 0.74	14.63 \pm 0.27	14.64 \pm 0.21	61.23 \pm 0.48
	2	7.19 \pm 0.10	2.12 \pm 0.02	14.73 \pm 0.16	15.37 \pm 0.14	60.59 \pm 0.35
	3	6.84 \pm 0.04	1.89 \pm 0.10	13.74 \pm 0.55	15.29 \pm 0.14	62.23 \pm 0.48
Seyubsil-deulkkae	1	7.35 \pm 0.17	1.89 \pm 0.06	14.69 \pm 0.45	16.17 \pm 0.35	59.89 \pm 0.37
	2	7.21 \pm 0.07	1.97 \pm 0.04	15.14 \pm 0.12	16.09 \pm 0.07	59.60 \pm 0.30
	3	6.63 \pm 0.13	1.74 \pm 0.05	14.21 \pm 0.21	15.89 \pm 0.04	61.53 \pm 0.17
Suwon 53	1	8.64 \pm 0.35	1.62 \pm 0.09	16.53 \pm 0.14	16.81 \pm 0.11	56.39 \pm 0.40
	2	8.23 \pm 0.23	1.68 \pm 0.09	17.46 \pm 0.26	16.67 \pm 0.40	55.97 \pm 0.64
	3	7.81 \pm 0.53	1.66 \pm 0.44	15.35 \pm 0.51	16.34 \pm 0.09	58.84 \pm 0.69

[†]See table 1

[‡]C18:3- linolenic acid

Table 3. Composition of fatty acid of peanuts according to a different method of transmethylation (% mean \pm sd).

Variety	Method [†]	Composition of fatty acid [‡]						
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C22:0
Daekwang	1	9.40 \pm 0.05	3.22 \pm 0.03	54.66 \pm 0.62	27.11 \pm 0.34	1.56 \pm 0.11	1.28 \pm 0.03	2.78 \pm 0.31
	2	9.54 \pm 0.05	3.13 \pm 0.01	54.88 \pm 0.09	27.00 \pm 0.13	1.59 \pm 0.00	1.18 \pm 0.01	2.70 \pm 0.00
	3	9.31 \pm 0.16	3.25 \pm 0.03	54.01 \pm 0.18	28.17 \pm 0.05	1.37 \pm 0.02	1.12 \pm 0.10	2.77 \pm 0.07
Daepung	1	10.10 \pm 0.43	2.66 \pm 0.06	53.25 \pm 0.47	28.77 \pm 0.02	1.34 \pm 0.07	1.23 \pm 0.06	2.64 \pm 0.21
	2	9.76 \pm 0.18	2.67 \pm 0.02	53.54 \pm 0.04	28.33 \pm 0.19	1.51 \pm 0.03	1.28 \pm 0.03	2.91 \pm 0.11
	3	10.33 \pm 0.35	2.95 \pm 0.10	51.58 \pm 0.40	30.34 \pm 0.41	1.31 \pm 0.08	1.10 \pm 0.02	2.40 \pm 0.32
Saedeul	1	10.53 \pm 0.05	2.65 \pm 0.02	53.23 \pm 0.36	28.56 \pm 0.36	1.28 \pm 0.02	1.20 \pm 0.03	2.55 \pm 0.11
	2	10.25 \pm 0.04	2.66 \pm 0.01	53.68 \pm 0.01	28.24 \pm 0.19	1.42 \pm 0.01	1.20 \pm 0.04	2.55 \pm 0.12
	3	10.75 \pm 0.16	2.65 \pm 0.02	52.16 \pm 0.47	30.09 \pm 0.26	1.00 \pm 0.30	1.08 \pm 0.04	2.28 \pm 0.01

[†]See table 1

[‡]C20:0-arachidic acid C20:1- eicosenoic acid C22:0-behenic acid

Table 4. Composition of fatty acid of rapeseeds according to a different method of transmethylation (% mean \pm sd).

Variety	Method [†]	Composition of fatty acid				
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
S-allele	1	5.24 \pm 0.54	1.55 \pm 0.02	64.93 \pm 0.68	19.57 \pm 0.40	8.71 \pm 0.51
	2	5.00 \pm 0.21	1.58 \pm 0.03	65.53 \pm 0.31	20.02 \pm 0.09	7.87 \pm 0.29
	3	5.07 \pm 0.17	1.11 \pm 0.12	65.02 \pm 0.29	20.99 \pm 0.11	7.81 \pm 0.13
Spring field	1	4.60 \pm 0.28	1.85 \pm 0.21	65.92 \pm 0.38	19.10 \pm 0.42	8.53 \pm 0.30
	2	4.58 \pm 0.04	2.02 \pm 0.04	65.51 \pm 0.04	18.53 \pm 0.01	9.36 \pm 0.03
	3	4.77 \pm 0.14	1.65 \pm 0.13	65.49 \pm 0.33	19.87 \pm 0.01	8.22 \pm 0.33
OAC POP	1	4.42 \pm 0.80	2.19 \pm 0.06	66.73 \pm 0.12	18.35 \pm 0.03	8.31 \pm 0.89
	2	4.47 \pm 0.31	1.92 \pm 0.00	65.88 \pm 0.50	18.65 \pm 0.17	9.08 \pm 0.02
	3	4.67 \pm 0.16	1.16 \pm 0.01	66.44 \pm 0.21	19.10 \pm 0.33	8.63 \pm 0.68

[†]See table 1

(Table 5). 홍화도 다른 작물과 마찬가지로 방법간에 조성상 및 함량의 차이는 없었다.

Table 6은 아마의 지방산 조성을 나타내었는데 팔미틴산, 스테아린산, 올레인산, 리놀산, 리놀렌산이 검출되었으며 방법에 따른 성분상의 차이는 거의 없었다.

One step extraction/methylation method(방법 1과 2)에서는 작물에 상관없이 리놀산의 함량이 다소 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었으며 전체적인 지방산 조성은 방법간에 큰 차이가 없었다(Table 7). 특히 미량으로(1~3%) 함유되어 있는 지방산도 One step extraction/methylation method에서 다 검

Table 5. Composition of fatty acid of safflowers according to a different method of transmethylation (% , mean \pm sd).

Variety	Method [†]	Composition of fatty acid			
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Kyungnam	1	7.85 \pm 0.18	1.80 \pm 0.03	12.39 \pm 0.28	77.96 \pm 0.19
	2	7.39 \pm 0.37	1.84 \pm 0.25	12.60 \pm 0.62	78.18 \pm 0.25
	3	7.62 \pm 0.09	1.83 \pm 0.01	12.99 \pm 0.53	77.57 \pm 0.95
Bukhansan	1	6.48 \pm 0.17	2.07 \pm 0.01	13.37 \pm 0.48	78.09 \pm 0.43
	2	6.57 \pm 0.07	2.06 \pm 0.06	13.59 \pm 0.47	77.78 \pm 0.55
	3	6.80 \pm 0.17	1.70 \pm 0.04	12.60 \pm 0.25	78.91 \pm 0.38
White flower	1	6.39 \pm 0.13	1.54 \pm 0.01	12.83 \pm 0.32	79.25 \pm 0.37
	2	7.31 \pm 0.97	1.61 \pm 0.18	12.73 \pm 0.48	78.35 \pm 0.68
	3	6.87 \pm 0.63	1.25 \pm 0.05	11.80 \pm 0.18	80.090 \pm .40

[†]See table 1**Table 6.** Composition of fatty acid of flax seeds according to a different method of transmethylation (% , mean \pm sd).

Variety	Method [†]	Composition of fatty acid				
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Centra Asia	1	8.18 \pm 0.23	3.76 \pm 0.18	31.62 \pm 0.47	11.86 \pm 1.03	44.59 \pm 0.61
	2	7.07 \pm 0.14	5.03 \pm 0.09	31.76 \pm 0.45	11.86 \pm 0.23	44.28 \pm 0.54
	3	7.43 \pm 0.55	4.99 \pm 0.18	31.88 \pm 0.14	11.61 \pm 0.20	44.09 \pm 0.03
Russia	1	6.10 \pm 0.00	5.27 \pm 0.00	22.23 \pm 0.56	12.56 \pm 0.76	53.85 \pm 0.32
	2	5.77 \pm 0.17	6.06 \pm 0.07	24.64 \pm 0.41	12.45 \pm 0.26	51.07 \pm 0.90
	3	5.80 \pm 0.04	4.65 \pm 0.28	24.53 \pm 0.49	12.59 \pm 0.01	52.44 \pm 0.25
Canada	1	6.14 \pm 0.64	3.87 \pm 0.31	26.79 \pm 0.47	13.83 \pm 0.43	49.37 \pm 0.65
	2	6.32 \pm 0.07	4.14 \pm 0.05	26.67 \pm 0.06	13.61 \pm 0.16	49.26 \pm 0.20
	3	6.37 \pm 0.48	3.75 \pm 0.08	26.64 \pm 0.45	13.75 \pm 0.11	50.17 \pm 0.95

[†]See table 1**Table 7.** F-value of fatty acid composition of major oil crops according to different methods.

Crops	F-value							
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0
Sesame	2.410	0.307	0.134	0.264	-	-	-	-
Perilla	0.602	0.484	0.904	0.081	0.751	-	-	-
Peanut	0.177	0.161	1.848	2.601	-	2.610	10.352 [†]	1.213
Rapeseed	0.173	3.646	0.101	1.380	0.816	-	-	-
Safflower	0.097	0.734	0.722	0.589	-	-	-	-
Flax seed	0.162	0.739	0.039	0.011	0.050	-	-	-

[†]Significant at the 0.05 probability level by ANOVA.

출되었으며 방법간 유의적인 차이가 없었다. 다만 땅콩의 에 이코젠산의 경우 기존의 methylation 방법에 비해 유의적으로 높은 함량을 보였다.

즉, 이 One step method는 일단 지방을 추출한 다음 기름을 재료로 했을때(방법 2)는 물론이고 생체시료를 그대로 사용한 경우(방법 1)에도 기존의 방법과 큰 차이가 없음을 알 수 있다. 방법 1의 경우 생체시료는 수분을 함유하고 있어서 기존 메틸화를 실시할 때는 과잉의 물을 잡아주기 위해 sodium sulfate anhydrous를 써서 overnight 시켜야 하며 과잉

의 ether나 hexane을 제거하여야 하는데 비하여 이 One step extraction/methylation method는 일단 시료량이 작아서(종자 2~3립 혹은 분말시료 소량) 들어가는 시약의 양도 적으며 특히 DMP의 경우 과잉의 수분을 잡아주므로 이 조작을 생략할 수 있다. 따라서 대량의 시료를 신속하게 분석해야 하는 성분 육종에서는 기존의 지방산 메틸화법을 이 One step extraction/methylation method로 대체한다면 정확성을 그대로 유지하면서도 시간과 노력을 훨씬 더 줄일 수 있어 육종 효율을 높일 수 있는 분석법이라고 생각한다. 아울러 방법 2처럼 추출된 지방을

가지고 방법 1의 혼합시약으로 지방산의 메틸화를 실시한 경우에도 기존 방법에 비해 시료량 및 시약의 양이 적게 들며 시간을 절약할 수가 있어 기존 방법보다 더 효율적이라 사료된다.

적 요

시료의 지방산 분석은 먼저 지방의 추출이 선행되어야 하는데 이때에는 시료량 및 시약이 많이 들고 또한 분석시간이 많이 소요되므로 지방 추출 및 지방산의 에스테르화를 한 단계에서 실시하는 One step extraction/methylation법(방법 1)에 따라 주요 유류작물의 지방산 조성을 살펴보았다. 이 방법은 methanol-heptane-benzene-DMP-H₂SO₄ 혼합용매를 사용하여 지방 추출 및 지방산 에스테르화를 단일층에서 일어나게 한 것으로 기존의 sodium methoxide를 촉매로 한 methanolysis 법에 의한 지방산 분석 결과와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 이 혼합시약으로 이미 추출된 지방을 대상으로 실험하였을 때에도(방법 2) 기존방법과 유의적인 차이가 없었다. 따라서 이 One step extraction/methylation법은 시료가 생체이든 추출된 지방이든 그 과정이 단순하고 시간과 노력이 훨씬 적게 소요되어 지방산 분석에 널리 이용될 수 있을 것이며, 특히 1회에 많은 시료를 처리하고자 할 때 더욱 분석효율이 높을 것으로 기대되었다.

인용문헌

Browse John, McCourt, P. J. and Somerville, C. R., 1986. Fatty acid

composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Analytical Biochemistry* 152:141-145.

Chrisie, W. W. 1992. Preparation of fatty acid methyl esters. *INFORM* 3:1031.

Fourie P. C. and Basson. D. S., 1990. Application of a Rapid Transesterification Method for Identification of Individual Fatty Acids by Gas Chromatography on Three Different Nut and Oils. *JAOCS*. 67(1):18-20.

Garces Rafael and Manuel Mancha. 1993. One-Step Lipid Extraction and Fatty Acid Methyl Esters Preparation from Fresh Plant Tissues. *Analytical Biochemistry* 211:139-143.

Glass, R. G. 1971. Alcoholysis, saponification and the separation of fatty acid methyl esters. *Lipids* 6:919.

李正日, 志賀敏夫, 高柳謙治. 1974. 우리나라 食用油脂 資源作物의 油脂含量과 脂肪酸組成에 關한 研究. 農事試驗研究報告. 16(C):53-64.

Luddy, F. E., Barford, R. A., Herb, S. F. and Magidman, P., 1968. A rapid and quantitative procedure for the preparation of methyl esters of butter oil and other fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45:549.

Mason, M. E. and Waller, G. R., 1964. Dimethoxypropane induced transesterification of fats and oils in preparation of methyl esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*. 36(3):583-586.

Morrison, W. E. and Smith, L. M. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5:600.

Ulberth Franz and Monika Henninger, 1992. One-step Extraction/Methylation Method for Determining the Fatty Acid Comositon of Processed Foods. *JAOCS*. 69(2):174-177.