

L'ESTÉRIFICATION DES ACIDES ORGANIQUES PAR LES SOLVANTS ALCOOLIQUES

JULES CARLES, ARMAND LATTES ET FRANÇOISE LATTES

*Laboratoire de Physiologie végétale de
l'Institut Catholique de Toulouse (France)*

(Reçu le 1 février 1961)

Lorsqu'un acide organique se trouve en présence d'un alcool, il est susceptible de s'unir à lui pour donner naissance à un ester; cette estérification devient plus rapide à chaud, surtout en milieu acide. Or, en physiologie végétale, où l'on étudie de plus en plus les acides organiques, la méthode classique de fixation et d'extraction comporte un séjour plus ou moins prolongé dans l'alcool bouillant.

Cependant, les possibilités d'estérification paraissent complètement méconnues, ou tout au moins sous-estimées par les biochimistes, et l'on voit très souvent des chromatogrammes ou bien des dosages d'acides organiques après passage sur colonnes de célite ou de silice qui présentent, à l'endroit précisément où se situent les esters acides, des taches ou des pics surmontés d'un point d'interrogation. Cette étude voudrait contribuer à faire disparaître un certain nombre de ces inconnus.

LA FORMATION DES ESTERS

Il n'est pas douteux que des estérifications plus ou moins abondantes se produisent au cours de la fixation ou de l'extraction du matériel végétal dans l'alcool bouillant¹. Cette production augmente si le matériel est abandonné pendant un certain temps avant l'étude en contact avec l'alcool éthylique. Un équilibre d'estérification tend à se faire, équilibre qui se réalise plus ou moins complètement dans le vin qui vieillit.

Divers types d'esters peuvent être formés. Avec les monoacides, tels que l'acide lactique, il se forme du lactate d'éthyle qui échappe désormais à toutes les études d'acides.

Avec les diacides symétriques, tels que l'acide succinique ou l'acide tartrique, il se forme un ester acide et un ester neutre, le monosuccinate d'éthyle et le disuccinate d'éthyle.

Avec les diacides dissymétriques, tels que l'acide malique, il se forme un ester neutre et deux esters acides suivant que l'un ou l'autre des deux carboxyles est estérifié.

Avec les triacides, le nombre d'esters possibles devient plus grand: l'acide citrique, par exemple, peut former deux monoesters, deux diesters et un triester

neutre, tandis que l'acide aconitique, parce que dissymétrique, peut former trois monoesters, trois diesters et un triester neutre.

Les esters se forment biologiquement par suite de l'intervention des estérases ou bien chimiquement par action de masses.

La formation d'acétate d'éthyle dans le vin qui se pique est due à l'action d'une estérase produite par le *Mycoderma aceti*. Puisque dans l'étude du matériel végétal, le premier contact avec l'alcool se fait au moment de la fixation dans ce liquide bouillant dont le but est précisément de détruire les diastases et les microbes, l'action des estérases peut être négligée.

La formation d'esters par voie chimique est régie par les lois d'équilibre, et si, comme c'est le cas dans les fixations et extractions alcooliques, la quantité d'alcool dépasse de beaucoup celle des acides organiques, l'équilibre est déplacé vers l'estérification.

Il est difficile de déterminer *a priori* quels sont, dans un milieu complexe les acides qui s'estérifient les premiers et ceux qui le font en plus grande quantité, car la vitesse d'estérification est fort mal connue pour la plupart et les études qui ont été faites sur cette vitesse l'ont été ordinairement avec des quantités équimoléculaires d'acide et d'alcool². On sait cependant que dans la série aliphatique, la vitesse d'estérification, mais aussi la vitesse de saponification sont d'autant plus grandes que la chaîne carbonée est moins longue. C'est ainsi que l'ester oxalique se forme beaucoup plus vite que l'ester succinique, mais il disparaît en 3 ou 4 jours, tandis que l'ester succinique met 6 mois à se décomposer³. D'autre part, les esters acides sont moins stables que les esters neutres, et, dans un milieu où se trouve, par exemple, du mono-oxalate d'éthyle, il se formera du dioxalate et de l'acide oxalique.

Dans un milieu complexe tel que le matériel végétal, de nombreuses circonstances interviennent dont les plus importantes sont le pH, le solvant, la concentration et la température.

En principe, une fonction acide ne peut être estérifiée que si elle est libre. Or, les fonctions acides organiques sont toujours plus ou moins salifiées. L'acide citrique, par exemple, a trois fonctions acides dont le pK est 3,74, 4,77 et 6,4. Pour un pH de 4,77 cet acide aura une fonction libre, une fonction neutralisée et une fonction à moitié libre, à moitié neutralisée. Il se fera très facilement du monoester sur la fonction à pK 6,4 et un peu sur la fonction à pK 4,77 qui n'est qu'à moitié libre, mais sur laquelle la vitesse est plus grande; la fonction à pK 3,74 doit rester normalement hors de la réaction. Il est donc vraisemblable qu'il se formera relativement beaucoup de monoesters, un peu de diesters et théoriquement pas de triester. Si le pH est plus élevé et se situe aux environs de 6 ou de 7, il se formera surtout des esters avec la fonction de pK 6,4, mais les diesters deviendront rares.

D'après ces données, il semblerait qu'on puisse éviter toute estérification en maintenant le milieu à un pH supérieur à celui de la fonction acide qui possède le pK le plus élevé. Cette condition n'apporte cependant aucune certitude parce qu'interviennent le solvant, la concentration et la température.

Il nous faut tout d'abord rappeler la différence qui existe entre le pK et le pH:

un acide faible de pK 4 ne sera que légèrement salifié à pH 4, et pour que cette salification devienne à peu près complète, il faudra dépasser le pK d'au moins deux unités et arriver au pH 6.

De plus, n'oublions pas que la constante de dissociation est définie pour un milieu aqueux homogène. En milieu hydro-alcoolique, cette constante diminue lorsque la teneur en alcool augmente: avec 20 % d'alcool, la constante diminue de 50 %; le pK de chaque fonction acide augmentera donc avec le pourcentage d'alcool. Ainsi s'explique, par exemple, qu'en solution alcoolique l'acétate de potassium dont le pK est de 4.75 soit décomposé par le gaz carbonique dont le pK est beaucoup plus élevé, 6.37 et 10.39.

D'ailleurs, même dans l'eau, cette constante varie. En effet, les sels d'acides faibles neutralisés par des bases fortes forment des ions susceptibles de réagir avec les ions de l'eau:



Le degré d'hydrolyse du sel AB sera défini approximativement par une relation où nous introduisons un terme correctif pour tenir compte du fait que, dans le milieu où nous opérons, il convient de considérer les activités plutôt que les concentrations, car celles-ci sont inutilisables dans les calculs, par suite de la multitude des corps dissous et de la présence de l'alcool:

$$\beta = \sqrt{\frac{K_{H_2O}}{K_A}} \times \frac{I}{c} \sqrt{\frac{y_{A^-}}{y_{OH^-}}}$$

De cette formule il découle que le degré d'hydrolyse étant inversement proportionnel à la concentration du sel dissous c , plus celle-ci sera faible par rapport au solvant, plus l'hydrolyse sera importante. Or, les quantités d'acides organiques sont vraiment très faibles par rapport à la masse du solvant employé pour la fixation et l'extraction.

Enfin, nous voyons à quel point peut influencer la température puisque le degré d'hydrolyse varie dans le même sens que K_{H_2O} . Or, le K de l'eau qui à 20° est de $0.68 \cdot 10^{14}$ passe pour 100° à $58.2 \cdot 10^{14}$ soit à une valeur près de cent fois supérieure; la dissociation des acides variera donc dans le même sens et dans les mêmes proportions.

Ainsi donc est-il difficile de prévoir avec exactitude la quantité d'ester qui se formera à partir de tel acide organique lors de la fixation initiale ou du séjour en milieu alcoolique, mais il est sûr qu'il s'en formera une certaine quantité. Il peut même se former des esters neutres avec des polyacides dont une fonction acide paraissait tout de même bien protégée par le fait que son pK était bien inférieur au pH de la solution.

Nous allons surtout parler des esters acides parce qu'on les trouve en étudiant les acides: ils sont retenus par les mêmes résines échangeuses d'ions, révélés avec les mêmes révélateurs et dosés de la même manière. Les esters des monoacides, ainsi que les esters neutres nous échappent totalement dans ces conditions parce qu'ils ne réagissent plus comme les acides.

LE COMPORTEMENT DES ESTERS EN CHROMATOGRAPHIE

1. *En chromatographie sur papier*

Les esters se séparent fort bien des acides comme on pouvait le prévoir, puisque disparaît par estérification une de ces fonctions dont la présence diminue considérablement le R_F . Les diesters se séparent eux aussi des monoesters, et nous voyons, par exemple, l'acide citrique passer de la zone des triacides dans celle des diacides avec les monoesters, et dans celle des monoacides avec les diesters. En revanche, les différents monoesters et les différents diesters du même acide ne se séparent pas l'un de l'autre, dans les conditions où nous opérons.

Dans le Tableau I sont présentés avec notre système de solvants, éthanol-ammoniacal et butanol-formique, sur papier Arches 302⁴ les R_F , ou plus exactement les R_G (acide glycolique) de quelques acides et ceux de leurs esters éthyliques, avec les valeurs de l'acide lactique comme référence.

TABLEAU I

	R_G	
	<i>Ethanol- ammoniacal</i>	<i>Butanol- ac. formique</i>
Ac. lactique	145	120
Ac. aconitique ¹	20	135
monoaconitate	75	155
diaconitate	230	165
Ac. citrique	15	75
monocitrate	70	125
dicitrate	220	150
Ac. malique	40	90
monomalate	180	135
Ac. tartrique	30	50
monotartrate	130	105
Ac. malonique	30	110
monomalonate	170	145
Ac. succinique	50	125
monosuccinate	200	150
Ac. maléique	45	105
monomaléate	190	140

Si, considérant ces valeurs, nous représentons le R_G des esters en milieu acide en fonction du R_G des acides dont ils proviennent, nous constatons que les points représentatifs se distribuent en courbe régulière qui paraît avoir la forme d'une fraction de branche d'hyperbole (Fig. 1). Il semble donc exister une relation simple entre ces valeurs, et ceci nous incite à rechercher si l'estérification d'un acide se traduit par une variation régulière du R_F pouvant nous permettre de trouver une loi d'additivité analogue à celle que REICHL⁵ indique pour les acides organiques:

$$R_M = \log \frac{R_F}{1 - R_F}$$

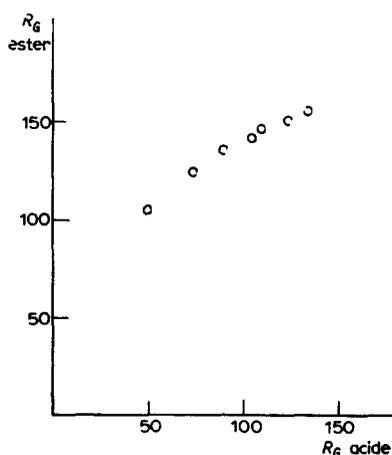


Fig. 1. R_G des esters en milieu acide en fonction du R_G des acides dont ils proviennent.

Puisque nous obtenons les R_G en prenant comme égale à 100 la valeur du R_F de l'acide glycolique qui est en réalité 0.60, nous pouvons calculer les R_M à partir des R_G en remplaçant 1 par 167, soit :

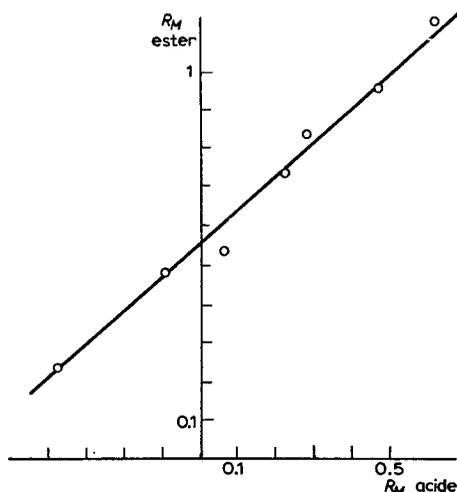
$$\frac{100}{60} \times 100, \text{ et nous avons } R_M = \log \frac{R_G}{167 - R_G}$$

Dans les conditions où nous opérons, voici, suivant cette relation, quelques constantes de groupe avec le solvant acide: + 0.82 pour la constante de base; + 0.16 pour un atome de carbone; — 0.50 pour un carboxyle, etc. Le changement apporté par une estérification doit pouvoir être représenté par une constante que nous trouverons en comparant les valeurs des R_M des acides avec celles de leurs esters éthyliques (Tableau II).

TABLEAU II

	R_M d'acide	R_M d'ester	ΔR_M
Ac aconitique	0.63	1.12	0.49
Ac. citrique	—0.09	0.48	0.57
Monocitrate d'éthyle	0.48	0.95	0.47
Ac. malique	0.07	0.53	0.46
Ac. tartrique	—0.37	0.23	0.60
Ac. malonique	0.29	0.83	0.54
Ac. succinique	0.48	0.95	0.47
Ac. maléique	0.23	0.72	0.49

Les ΔR_M indiqués dans la dernière colonne oscillent autour d'une valeur moyenne. Cette valeur est déterminée graphiquement en représentant les R_M des esters en fonction des R_M des acides (Fig. 2): les points se distribuent approximativement sur une droite qui coupe l'axe des ordonnées en un point, 0.55, que nous avons choisi comme valeur pratique de calcul $\Delta R_M = 0.55$.

Fig. 2. R_M des esters en fonction des R_M des acides.

Nous pouvons dès lors calculer, à partir du R_F des acides, celui de leurs esters éthyliques. Le Tableau III montre une concordance stricte entre les valeurs calculées et les valeurs mesurées expérimentalement.

TABLEAU III

	Valeur du R_F		ΔR_F
	mesurée	calculée	
Monoaconitate	0.93	0.93	0
Monocitrate	0.75	0.742	-0.008
Dicitrate	0.90	0.91	+0.01
Malate	0.81	0.80	-0.01
Tartrate	0.63	0.60	-0.03
Malonate	0.87	0.87	0
Succinate	0.90	0.90	0
Maléate	0.84	0.85	+0.01

Il existe donc une relation simple entre les R_G des acides et celui des esters et nous pouvons écrire:

$$R_M \text{ ester} = a R_M \text{ acide} + b$$

qui devient avec $Y = R_G \text{ ester}$ et $X = R_G \text{ acide}$ l'équation:

$$\log \frac{Y}{167 - X} = a \log \frac{X}{167 - X} + b$$

La résolution de cette équation montre que la loi de variation des $R_G \text{ ester}$ en fonction des $R_G \text{ acide}$ est de la forme $Y = \frac{AX}{BX+C}$ ou plutôt $Y = \frac{AX+D}{BX+C}$ pour tenir compte du fait qu'expérimentalement la courbe ne passe pas par l'origine.

Nous arrivons ainsi à l'équation $Y = \frac{225 X + 625}{X + 65}$ qui nous permet de calculer avec une très bonne approximation le R_G des esters à partir du R_G des acides (Fig. 3) (Tableau IV).

TABLEAU IV

	R_G des acides	R_G des esters		ΔR_G
		mesurée	calculée	
Ac. aconitique	135	155	155	0
Ac. citrique	75	125	125	0
Ac. malique	90	135	134.6	-0.4
Ac. tartrique	50	105	103.2	-1.8
Ac. malonique	110	145	145	0
Ac. succinique	125	150	150	0
Ac. maléique	105	140	139	-1

Ces mêmes calculs pourraient être faits avec les R_G du solvant alcalin, bien que l'additivité soit un peu moins bonne.

Quoiqu'il en soit, la carte chromatographique de ces esters montre qu'ils vont se grouper surtout dans la région de l'acide lactique (Fig. 4).

La révélation de ces taches est moins nette que celle des acides, surtout avec les révélateurs basés sur l'acidité. Ces esters gardent cependant quelque chose de la réaction des acides dont ils sont issus et le monotartrate d'éthyle, par exemple, présente avec le nitrate d'argent une évolution assez nette vers le châtain et le marron.

2. En chromatographie sur colonne

Lorsque, pour doser les acides organiques, on les fait passer sur colonne de silice ou de célite, les esters se séparent fort bien des acides et les monoesters des diesters. Cependant, les esters sortent tous avec le premier solvant, et leur ordre de sortie est si rapproché l'un de l'autre qu'il faut, pendant le passage de ce premier solvant, prendre les fractions les plus petites possible, si l'on veut essayer de les séparer.

Pour les séparer un peu mieux, on peut, avant le premier solvant, en utiliser un autre qui soit moitié moins riche en butanol (4 % au lieu de 8 %) : ce solvant fait sortir les esters monoacides. Certains, comme le dicitrate d'éthyle, peuvent même sortir sans butanol avec le seul chloroforme.

Mais, considérons seulement les solvants classiques. Il est assez difficile de donner des précisions sur les résultats obtenus par suite de la variété des techniques employées. Voici cependant l'ordre et la place de sortie de quelques esters dans la méthode que nous utilisons et qui n'est guère autre chose qu'une adaptation de celle de BOVÉ ET RAVEUX⁶ à de plus petites quantités. Avec une colonne de 0.65 cm² de section contenant 3 g de célite et un premier solvant de 42 ml dont 8 % de butanol et 92 % de chloroforme, l'acide fumarique sort au 35ème ml, le monocitrate au 33ème et le dicitrate au 4ème, le monomalate au 14ème, le tartrate au 20ème, etc.

Les esters sortent donc dans le premier solvant quand ils ne sont pas saponifiés,

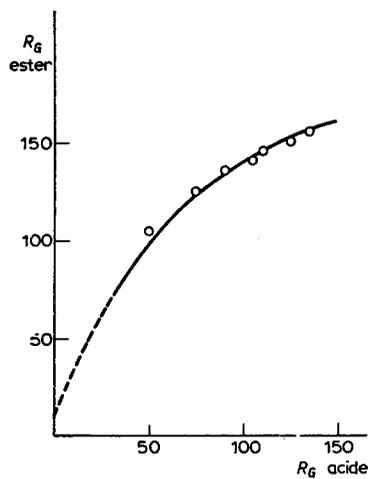


Fig. 3. R_G des esters calculé à partir du R_G des acides.

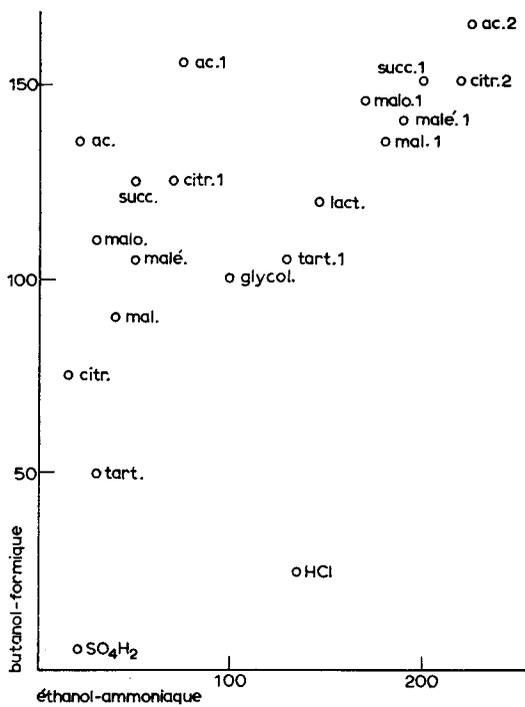


Fig. 4. Répartition des acides et de leurs esters sur la carte chromatographique.

mais il existe une possibilité que l'on ne saurait exclure, à savoir la saponification des esters sur la colonne.

Pour l'acide oxalique dont la saponification est très rapide, elle se fait, si elle n'est déjà faite, avant le départ de l'élution: il ne nous a pas été possible d'obtenir la moindre trace de mono-oxalate d'éthyle au sortir de la colonne. Pour les autres acides, il est possible qu'une saponification se fasse entre le début et la fin de l'élution. Supposons qu'il s'agit d'un monocitrate d'éthyle: il commence à se déplacer à la vitesse de l'ester, mais la saponification intervient et la vitesse devient alors celle de l'acide. Ces portions d'acide citrique réparties ainsi tout le long de la colonne risquent de se présenter pour le dosage comme des traînées ou bien de petits pics survenant à des endroits inattendus. En effet l'ester était emporté par le premier solvant, mais ce solvant, ainsi que le suivant, est incapable de déplacer l'acide citrique qui restera donc sur place dans la colonne jusqu'à ce qu'un solvant assez puissant balaie toutes ces portions d'acide pour en former un petit pic supplémentaire qui marque l'endroit où serait sorti l'acide citrique s'il n'avait pas eu toute la longueur de la colonne à parcourir. Certains petits pics, de faible importance d'ailleurs, paraissent avoir cette origine.

L'IDENTIFICATION DES ESTERS

De nombreuses réactions sont possibles pour identifier les esters, mais elles ne nous ont guère donné satisfaction par suite de la faible quantité d'acide ordinairement estérifiée. Nous n'en citerons qu'une, celle de FEIGL⁷ qui transforme les esters en acides hydroxamiques pour les révéler avec le chlorure ferrique. Voici comment nous l'avons appliquée à la chromatographie sur papier. Le papier porteur de la tache d'ester est imbibé d'une solution alcoolique saturée de chlorhydrate d'hydroxylamine, puis d'une solution alcoolique saturée de potasse et porté pendant 5 min à l'étuve à 105-110°. Après acidification par une solution de HCl 0.5 *N*, une solution de chlorure ferrique à 1 % fait apparaître les esters sous forme de taches violettes plus ou moins nettes.

L'identification la plus précise se fait par les R_F . Toute tache apparaissant dans la région où se situent les esters doit être soupçonnée comme un ester possible: on refait le même chromatogramme après saponification pour voir si ces taches persistent. La saponification peut se faire au bain-marie bouillant avec HCl ou SO_4H_2 (2 ou 3 *N*) dont les taches se situent fort loin de la région des esters: un tel traitement ne paraît pas affecter les autres acides organiques, tandis que les esters disparaissent.

Pour arriver à plus de certitude, on élue l'ensemble des taches soupçonnées être des esters, ou bien toute la région des esters. On en refait deux chromatogrammes, l'un qui montrera que l'élution est bonne et qu'il n'apparaît pas de tache en dehors de la zone des esters et l'autre qui, après saponification, témoignera de la disparition des esters et de l'apparition des acides qui leur avaient donné naissance. Une telle expérience peut être facilement réalisée avec les esters acides du vin (Fig. 5) ou même avec l'ensemble des premiers pics du collecteur de fractions après passage sur célite ou sur silice.

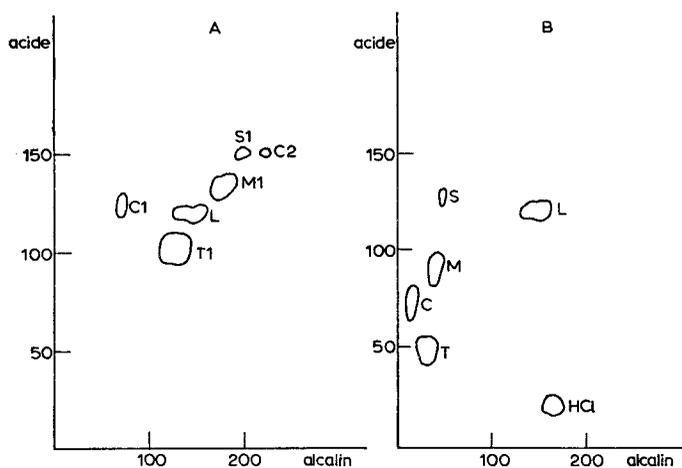


Fig. 5. Carte des esters acides du vin: (A) avant hydrolyse; (B) après hydrolyse. C1 = monocitrate; C2 = dicitrate; L = lactique; M1 = monomalate; S1 = monosuccinate; T1 = monotartrate.

LE DOSAGE

Le dosage des esters acides ne soulève pas de difficultés spéciales, si ce n'est que la séparation de ces esters est assez délicate sur colonne, et que les fractions doivent, comme nous l'avons dit, être très petites si l'on ne veut pas se contenter d'un dosage global.

Prenons par exemple un dosage de l'acide citrique et de ses esters. Le premier pic qui se situe au 4ème ml de solvant représente le dicitrate d'éthyle, le second au 33ème représente le monocitrate et le troisième, beaucoup plus loin, l'acide citrique (Fig. 6). Le dosage du premier s'est fait avec 10.7 ml de soude 0.01 N, celui du deuxième avec 60.8 ml et celui du troisième avec 78 ml.

Si nous considérons l'acidité dosée, l'acide citrique représente 52 % de cet ensemble, le monoester 40.8 et le diester 7.15 %, mais si nous évaluons en acide citrique, le diester sera trois fois plus abondant et le monoester sera multiplié par 1.5. Nous

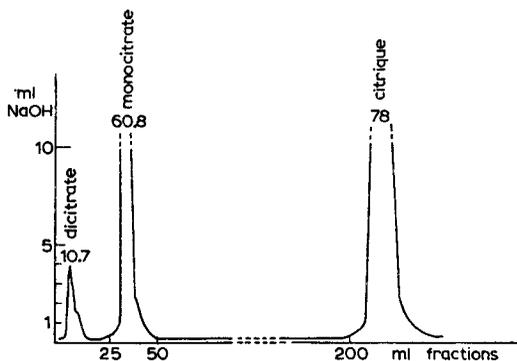


Fig. 6. Dosage de l'acide citrique estérifié.

constatons ainsi que 39% de l'acide citrique n'ont pas été estérifiés, tandis que 45.5 % sont passés sous forme de monoester et 16 % sous forme de diester.

Nous ne tenons pas compte dans ces calculs du triester neutre qui n'apparaît pas dans ces dosages. Pourtant, dans cette solution où l'acide citrique est seul présent dans le milieu alcoolique où s'est faite artificiellement l'estérification, nous pourrions arriver à une évaluation assez approximative de la quantité d'ester neutre, mais dans les cas concrets cette évaluation devient impossible. Hâtons-nous de dire que ces esters neutres sont très peu abondants, étant donné surtout le pH relativement élevé dans lequel se fait la fixation et l'extraction. Les esters neutres, beaucoup moins abondants que les esters acides peuvent donc être pratiquement négligés.

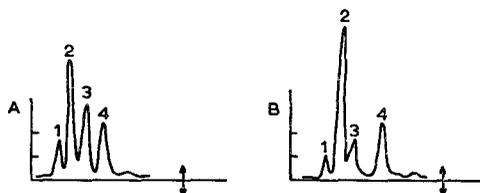


Fig. 7. Graphique du dosage des pics du premier éluant. (A) Avec autant de citrique que de malique. (B) Avec cinq fois plus de malique que de citrique. 1 = dicitrate; 2 = malate; 3 = monocitrate; 4 = fumarique.

Dans le cas le plus favorable, les pics des différents esters ont été séparés et identifiés et le dosage est simple, mais il arrive assez souvent que cette séparation ne puisse se faire avec netteté. La question se pose alors de savoir si nous pouvons, dans ce dosage global, étant donné l'ensemble des acides organiques présents, évaluer avec assez de probabilité la part qui revient à chacun.

Il est bien évident que l'oxalate est trop instable pour se trouver parmi les esters, mais il est vraisemblable que l'ensemble des esters des autres acides s'y trouve. En première approximation, on peut admettre une égale proportion d'esters pour tous et chacun des acides. Si, par exemple, le total des esters représente un cinquième de l'ensemble des acides, il conviendra d'augmenter d'un cinquième le dosage de chacun des acides, car, et cette probabilité n'est pas contredite par les faits, il est vraisemblable que si l'acide malique est deux fois plus abondant que l'acide citrique et 50 fois plus que l'acide succinique, les esters garderont à peu près entre eux la même proportion.

De telles évaluations sont assez loin de la précision absolue mais elles permettent de corriger les valeurs trouvées, aux erreurs d'expérience près, et l'on peut, quand le dosage individuel est impossible, et que l'estérification est faible, s'en contenter.

En conclusion, il faut admettre qu'après utilisation de l'alcool éthylique comme fixateur ou comme solvant, il se forme toujours des esters en plus ou moins grande abondance. Ils atteignent facilement le centième des acides présents, mais peuvent atteindre jusqu'au vingtième ou même davantage si l'on a conservé le matériel pendant un certain temps dans l'alcool.

Ces estérifications posent le problème de l'utilisation de l'alcool comme fixateur

et comme solvant lorsqu'on étudie les acides organiques. Nous pensons qu'il est difficile de se passer d'un liquide tellement pratique comme fixateur, comme solvant et comme conservateur. Si l'on connaît les corrections à faire et qu'on en tienne compte, les erreurs deviennent négligeables.

RÉSUMÉ

En présence d'alcool comme fixateur et comme solvant du matériel végétal, il se forme toujours des esters à partir des acides organiques. Cette estérification est facilitée par la température élevée, la faible concentration des acides, etc. Il est facile de repérer ces esters sur les chromatogrammes et même de les doser car ils se séparent fort bien des acides dont ils sont issus.

SUMMARY

If alcohol is used as solvent for vegetable material or for purposes of fixation, the organic acids present in the material always form esters. This esterification is facilitated by elevated temperatures and the low concentration of the acids, etc. It is easy to locate these esters on chromatograms and even to determine them, because they are widely separated from the acids from which they have been formed.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. CARLES ET S. LASCOMBES, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 90;
S. LASCOMBES, A. LATTES, R. MIQUEL ET R. PULOU, *Bull. soc. chim. biol.*, 41 (1959) 1055.
- ² M. N. MENSCHUTKIN, *Ann. chim. et phys.*, 20 (1880) 289; 23 (1881) 14, etc.
- ³ M. CONTZEN-CROWET, *Bull. soc. chim. Belges*, 35 (1926) 165.
- ⁴ J. CARLES, A. SCHNEIDER ET A. M. LACOSTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 221.
- ⁵ E. R. REICHL, *Monatsh. Chem.*, 86 (1955) 69.
- ⁶ J. BOVÉ ET R. RAVEUX, *Bull. soc. chim. France*, (1957) 376.
- ⁷ F. FEIGL, *Spot Tests in Organic Analysis*, 5ième éd., Elsevier, Amsterdam, 1956, p. 237.

J. Chromatog., 6 (1961) 486-497