

## CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES ACIDES ORGANIQUES DES MILIEUX BIOLOGIQUES

### I. QUELQUES COLORATIONS DIFFÉRENTIELLES EN FONCTION DE LEURS CONCENTRATIONS

F. G. PRIOR FERRAZ ET M. E. ALMEIDA RELVAS\*

*Laboratoire National de Recherches Vétérinaires,  
Service de Biochimie, Lisbonne (Portugal)*

(Reçu le 30 janvier 1961)

#### INTRODUCTION

Les acides du cycle de Krebs et tous ceux s'y rapportant, jouent un rôle très important dans le métabolisme général.

Par suite, on a cherché à obtenir une technique de chromatographie sur papier permettant de les séparer. Si ce problème est plus au moins résolu<sup>1-5</sup>, leur identification et leur dosage ne l'est pas d'une manière satisfaisante.

Ces difficultés sont accrues par le fait que les indications des différents auteurs ne sont pas concordantes ni en ce qui concerne les couleurs obtenues, ni en ce qui concerne les seuils de détection.

Ces considérations nous ont amenés à tenter de trouver une méthode de détection et de dosage semi-quantitatif qui apparaisse plus simple que les méthodes ordinaires appliquées à la chromatographie sur papier telles que la titration potentiométrique, les dosages colorimétriques<sup>6</sup> et la polarographie<sup>4</sup>.

En conséquence, il nous a paru intéressant de montrer les possibilités fournies par l'examen attentif des couleurs variées obtenues par les différentes concentrations des divers acides.

#### TECHNIQUE

Nous avons utilisé les solvants préconisés par NORDMANN et coll.<sup>3,7</sup>. Nous avons également obtenu de bons résultats avec ceux de OSTEUX ET LATURAZE<sup>2</sup>.

Nous avons employé la technique chromatographique ascendante à deux dimensions (papier Whatman No. 3, 20 × 20 cm, enroulé en cylindre).

Les solutions étalons des acides ont été faites à 1% dans l'alcool éthylique à 95%, sauf pour les acides nicotinique (dans l'eau) et hippurique (dans l'alcool isoamylique).

L'étude a porté sur les acides organiques suivants (utilisés parce que habituels

---

\* Assistant à la Faculté de Médecine de Lisbonne et Boursier de la Fondation Calouste Gulbenkian.

dans les milieux biologiques) : acides aconitique, *cis*-aconitique, *m*-hydroxy-benzoïque,  $\beta$ -hydroxybutyrique,  $\alpha$ -cétoglutarique, citrique, fumarique, glutarique, glycérique, glycolique, hippurique, lactique, maléique, malonique, nicotinique, oxalique, pyrrolidone-carboxylique, quinique\*, shikimique\*, succinique, tartrique. Nous avons ajouté les acides minéraux suivants: chlorhydrique, phosphorique, nitrique, et sulfurique car ils sont parfois incomplètement retenus par les résines.

Les concentrations utilisées sont de 5 à 1500  $\gamma$ . Les dépôts sont faits au moyen d'une seringue micrométrique "Agl".

Les différentes colorations employées ont été les suivantes:

1. Amine aromatique-sucré réducteur.
2. Diméthylaminobenzaldéhyde en milieu anhydride acétique.
3. Pyridine-anhydride acétique.
4. Nitrate d'argent.
5. Ferrocyanure de potassium.
6. Ferricyanure de potassium.
7. Réactif de BERG ET UFFELMANN.
8. Isatine.

Voici les techniques de colorations que nous avons employées:

1. *Amine aromatique-sucré réducteur*<sup>8</sup> avec la modification de HEITFUSS<sup>6</sup>

Glucose 2 g  
Aniline 2 ml

Dissoudre le glucose et l'aniline dans 20 ml d'eau, ajouter 20 ml d'alcool éthylique à 96° et 60 ml de *n*-butanol. Chauffer à 115° pendant 5 min dans une étuve bien ventilée.

Ce révélateur se conserve bien à l'abri de la lumière.

2. *p*-Diméthylaminobenzaldéhyde en milieu anhydride acétique<sup>3,4,9</sup>

*p*-Diméthylaminobenzaldéhyde 4 g  
Anhydride acétique 100 ml

Ajouter à la solution quelques cristaux d'acétate de sodium. Après pulvérisation des chromatogrammes, chauffer pendant 3 min à l'étuve (130°).

3. *Pyridine-anhydride acétique*<sup>10</sup>

Pyridine 7 vol.  
Anhydride acétique 7 vol.

Après pulvérisation des chromatogrammes, chauffer pendant 3 min à l'étuve (80-90°). Observer à la lumière du jour et à la lumière de Wood.

4. *Coloration du nitrate d'argent*<sup>11</sup>, modifié par CARLES<sup>12</sup>

Solution d'ammoniaque 0.1 N  
Solution de nitrate d'argent 0.1 N

Mélanger en parties égales. On peut ajouter au réactif une goutte d'acide acétique N pour chaque 5 ml de la solution de nitrate d'argent, pour éviter une précipitation très rapide.

\* Nous remercions très vivement Dr. JULES CARLES, du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Institut Catholique de Toulouse, qui nous a fourni ces deux acides.

Opérer à froid et laisser les chromatogrammes sécher à la température du laboratoire, à une lumière diffuse. Ensuite placer les papiers pendant quelques minutes à l'étuve aux environs de 40 à 50°. Observer les colorations à la lumière du jour et à la lumière de Wood.

5. *Coloration par le ferrocyanure de potassium*<sup>12-14</sup>

- (a) Solution aqueuse de ferrocyanure de potassium à 10 %
- (b) Solution de sulfate ferrique d'ammoniaque à 0.5 % dans l'alcool à 70°

Pulvériser les chromatogrammes avec la solution (a); sécher. Pulvériser avec la solution (b); laisser sécher. Noter les taches et leur différentes couleurs, en fond bleu clair (1 du Tableau I).

Placer alors les chromatogrammes dans l'étuve à 100°; le fond devient vert-bleu sombre. Décolorer avec de l'ammoniaque *N*.

Sécher et observer de nouveau les colorations (2 du Tableau I).

6. *Coloration par le ferricyanure de potassium*<sup>12, 15</sup>

- (a) Solution aqueuse à 0.3 % de chlorure ferrique
- (b) Solution aqueuse à 0.3 % de ferricyanure de potassium

Mélanger extemporanément en volumes égales. Pulvériser les chromatogrammes.

Observer pendant la première heure; le fond est jaune et certaines taches apparaissent alors; laisser les chromatogrammes à la température du laboratoire et les observer 24 h après.

7. *Réactif de BERG ET UFFELMANN*<sup>4, 16, 17</sup>

- Chlorure ferrique à 1 % 100 ml
- Acide phénique à 1 %, q.s. jusqu'au violet persistant

Plonger les chromatogrammes dans le réactif et observer les couleurs au fur et à mesure qu'elles apparaissent avant de sécher, car il s'agit de couleurs fugaces.

8. *Réaction de l'isatine*<sup>18, 19</sup>

- Isatine à 0.2 % dans l'acétone additionné de 4 % d'acide acétique

Plonger les chromatogrammes dans la solution et les sécher à la température du laboratoire et ensuite, en étuve à 105° pendant 2 min. Observer les colorations.

## RÉSULTATS

L'analyse du tableau et de la figure présentés nous permet de constater que tous les acides que nous avons utilisés se colorent avec l'aniline (sauf l'acide glycérique), quoique pas tous à la même concentration (10  $\gamma$  selon LATURAZE). Ainsi, la plupart des acides se colorent avec des concentrations entre 10 et 50  $\gamma$ , à l'exclusion des acides minéraux que se colorent à 5  $\gamma$  (Fig. 1).

On peut aussi observer que tous les acides en question sont fluorescents dans l'U.V. avant que les chromatogrammes soient colorés, mais, d'une manière générale, seulement pour des concentrations plus fortes que celles qui s'avèrent nécessaires pour qu'ils soient colorés par l'aniline (Fig. 1).

TABLEAU  
(Concentrations)

<i>Acides</i>	<i>p-Diméthylaminobenzaldéhyde</i> (Gaffney)		<i>Pyridine-anhydride acétique</i> (Furth)		<i>FeCl<sub>3</sub> + acide phénique</i> (Uffelmann)	
	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>I</i>	<i>F</i>
Adipique	1	350 J. fb.	—	—	—	—
	2	700 Li. fb.	—	200 J. fb.	—	150 Bi. fb. 350 Bi.
Oxalique	1	700 J.	—	—	—	—
	2	700 J. fo.	—	—	—	1000 J. cl.
Shikimique	1	200 Ro. cl.	700 Ro.	—	—	—
	2	350 Li. fb.	1000 Li. cl.	200 J. fb.	400 J.	200 Bi. fb. 450 Bi. cl.
Quinique	1	—	—	—	—	—
	2	350 Fl. Bl.	—	—	—	50 J. Cl. 300 J. br.
Malique	1	500 J. fb.	1500 J. B.	—	—	—
	2	250 G. Li. fb.	700	700 J. Bl.	—	25 J. fb. 400 J. br.
Tartrique	1	10 O. fb.	350 Ro. Vo. fo.	100 Bi. fb.	250 Bi.	—
	2	50 Ro.	300 R. S.	50 Bl. J. fb.	200 J.	10 J. fb. 200 J. br.
Citrique	1	50 R. Vo. cl.	400 R. Vo. fo.	10 B. fb.	300 B.	—
	2	50 Fl. V.	300 J. V.	5 Fl. V. cl.	200 J.	50 J. fb. 350 J.
Malonique	1	150 J. fb.	450 J.	—	—	—
	2	300 J. cl.	450	700 Fl. Bu.	—	200 Bl. fb. 350 Bl.
Nicotinique	1	250 J. O. fb.	350 J. O. cl.	—	—	—
	2	350	—	150 J. Bl. fb.	1000 J. S.	150 Bi. fb. 450 Bi.
Glycerique	1	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—
Hippurique	1	10 O. cl.	400 O. fo.	5 J. cl.	500 R./J. +	—
	2	10 J. cl.	50 J.	5 Fl. V. cl.	350 V. B.	250 J. Bi. cl. 400 Bi. cl.
Maléique	1	350 J. fb.	—	300 B. fb.	—	—
	2	500	—	50 J. fb.	300 J.	350 Bi. cl. 450 Bi. O.
Glycolique	1	700 J. B. cl.	—	—	—	—
	2	700 J. fb.	1500 J. cl.	700 Fl. Bl. fb.	—	25 J. fb. 200 J.
Fumarique	1	50 Bi. fb.	250 Bi. cl.	10 J. B. cl.	500 Bi. fo.	—
	2	50 B. cl.	400 B. Vo. fo.	5 Fl. J. S. cl.	300 B./J. +	50 Bi. fb. 400 Bi.

I  
2)

$K_3 Fe (CN)_6$		$K_4 Fe (CN)_6$		$AgNO_3$		Isatine	
I	F	I	F	I	F	I	F
50 Bl. J. cl.	—	50 Li. fb.	—	25 B. Bl.	300 Bl./B. cl.	200 Li.	—
50		350 V. fb.	—	25 Fl. fb.	300 Fl. Vo. br.		
50 Bl.	150 Bl. br.	10 Bu. cl.	250 Bu. br.	150 B.	450 B. Bl.	150 Vo. Bu.	—
50 Bl./Bu.	—	10 Bu. V. fb.	300	400 Fl. cl.	—		
250 Bu. G.	—			50 Bi. cl.	350 B. Bi. fo.	100 Li.	—
300 Bu.	—	10 V. fb.	50 Bu. V.	50 Fl. fb.	300 Fl. cl.		
50 J.	—	25 Bu. fb.	300 Li.	150 B. cl.	350 B. R.	50 Li. fb.	400 Li. G. cl.
350 Li. V.	—	50 Bu. cl.	300 Bu. Vo.	500 Fl. fb.	—		
25 Bl.	—	5 Li.	200 Vo. fo.	10 B. fb.	300 Bl./B. G.	100 Li.	250 Vo.
25 Bl. J.	450 J.	50 Bu. cl.	—	25 Fl. fb.	300 Fl. Vo. cl.		
10 Bu.	250 J. cl.	5 Li. cl.	50 Li.	5 G. B.	350 Bl./B. fo.	150 Li.	—
400 Vo.	—	10 Bu.	300 Vo./Bu.	5 B. fo.	350 Fl. Vo. br.		
50 Bl. J./Bu.	—	50 Vo. fo.	—	10 Vo. cl.	250 B. fo./B.	150 Li.	—
400		50 V. Bu. fo.	—	50 Fl. fb.	150 Fl. cl.		
50 Bl.	—	25 Bu.	—	10 B. fb.	350 Bl./B. G.		
250 Bl./Bu.	—	25 V. cl.	300 V. Bu./fo.	25 Fl. fb.	350 Fl. Vo. br.		
100 Bl. J.	—			150 B. cl.	350 Ro./B. V.	250 Li.	—
250 V. Bu.	—	250 Bu. V. fb.	—	200 Fl. fb.	300 Fl. cl.		
100 J. cl.	1500 Bu./Bu. fo.						
50 Li. Vo.	1500 Li./Vo.						
50 J. fb.	—	500 V. Bu. fb.	—	150 Bl. B. cl.	250 B. Bl./B. cl.	400 Li. fb.	—
400		500		150 Fl. fb.	—		
100 J. cl.	—	50 Li.	350 Vo. Bu.	150 B./G. B.	300 B. +/G. B.	250 Li. fb.	—
350 V.	—	50 V./J. cl.	—	150 Fl. fb.	—		
50 J. cl.	150 J. B. cl.	50 Li.	250 Li. Bu.	10 Ro.	300 Vo. fo.	50 Li. fb.	400 Li.
5 Vo.	200 Vo. V.	50 Bu. cl.	—	50 Fl. fb.	250 Fl. cl.		
25 J. cl.	200 J.	500 Li. fb.	1000 Li. Bu.	10 B. fb.	250 Bl./B. cl.	150 Ro. cl.	250 Vo.
25 Bu. cl.	300 Bu./J.	350 V.	—	25 Fl. fb.	250 Fl. Vo. br.		

(Continué à p. 510)

TABLEAU

Acides	<i>p</i> -Diméthylaminobenzaldéhyde (Gaffney)		Pyridine-anhydride acétique (Furth)		FeCl <sub>3</sub> + acide phénique (Uffelmann)		
	I	F	I	F	I	F	
α-Céto-glutarique	1	50 Ro.	350 Ro. Vo. fo.	50 B. fb.	200 B. cl.	100 J. fb.	400 J. fo.
	2	50	350 R. S. fo.	50 Fl. Bl.	250 Fl. Bl. br.		
Aconitique	1	50 R. Vo.	350 Vo.	5 G. B. cl.	1000 G. N.	50 Bi. fb.	700 Bi.
	2	50 B. R. cl.	300 B. R.	5 Fl. V.	450 B.N. +/V.		
<i>cis</i> -Aconitique	1	50 R. Vo.	350 Vo.	5 Vo. G.	350 Vo. G. fo.	100 Bi. fb.	200 Bi. cl.
	2	50 B. R. cl.	300 B. R.	5 Fl. V.	450 B.N. +/V.		
Lactique	1	100 O. fb.	350 O. cl.	50 J. fb.	450 Ro. Li.	25 J. cl.	300 J. br.
	2	200 S. fb.	350 S. cl.	50 Ro.	400 R.		
Glutarique	1	250 J. fb.	—	350 B. fb.	—	100 Bi. fb.	350 Bi. O.
	2	350 J. cl.	—	150 J. fb.	300 J. S. cl.		
Pyrrolidone-carboxylique	1	450 Bi. fb.	1000 Bi. cl.	700 J. B. fb.	—	150 J. fb.	250 Bi. cl.
	2	700 J.	—	700 Fl. Bl.	—		
Nitrique	1	50 J.	700 J. B. fo.			1500 J.	—
	2	50 J. B.	850 B. Bi.	200 S. fb.	850 S.		
Succinique	1	250 Ro. fb.	700 Ro. cl.			150 Bi. fb.	700 Bi. Ro.
	2			150 Fl. fb.	1500 Fl. J. cl.		
β-Hydroxy-butyrique	1					350 Bi. fb.	—
	2			700 Fl. Bl.	—		
<i>m</i> -Hydroxy-benzoïque	1	300 J. B. fb.	1500 Bi. cl.	700 J. B. fb.	—	150 Bi. fb.	350 Bi. J.
	2	300 J. fb.	1500 J. cl.	700	—		
Phosphorique	1	50 V. J.	—			50 Bl. fb.	350 Bl.
	2	50 J. fo.	—	350 J. fb.	—		
Chlorhydrique	1	50 J. br.	350 J. V. fo.				
	2						
Sulfurique	1	50 V. J.	250 V. J. fo.			150 Bl. fb.	—
	2	50 B./V. J.	250 B./V. J. fo.	100 Fl. Vo.	300 Vo.		

I = coloration initiale  
 F = coloration finale  
 Bi. = brique  
 J. = jaune  
 V. = vert  
 Ro. = rose  
 O. = orange

Bl. = blanc  
 B. = brun  
 G. = gris  
 Bu. = bleu  
 N. = noir  
 Vo. = violet  
 Li. = lilas

S. = saumon  
 R. = rouge  
 cl. = clair  
 br. = brillant  
 fb. = faible  
 fo. = foncé  
 Fl. = fluorescent

I (continué)

$K_3Fe(CN)_6$		$K_4Fe(CN)_6$		$AgNO_3$		Isatine	
I	F	I	F	I	F	I	F
50 Bl. Bu./Vo.	—	50 Li. fb.	350 Li. Bu.	150 B./V. fo.	400 B. fo./V. fo.	50 V. O. S.	350 V. O.
50 Bu. fo.	—	350 Bu. fb.	—	150 Fl. fb.	—		
10 J. B.	50 J.	50 Li. fb.	—	10 Ro. Bl.	400 Bl./B. G.	100 Ro. Li.	—
10 J. V.	—	250 V. fb.	—	10 Fl. Vo. fb.	350 Fl. Vo. R.		
50 J. B.	—	150 Li. fb.	—	10 Ro. Bl.	—	150 Li.	450 Vo.
200 V. cl.	—	350 V. fb.	—	10 Fl. Vo. fb.	—		
25 Bl. J.	50 J. cl.	50 Li. fb.	—	150 B. Bl.	—	250 Li.	—
25 Li./Bu.	450 Bu.	50 Bu. fb.	200 Bu. cl.	150 Fl. fb.	—		
50 J. fb.	—	50 Li. fb.	—	50 B. fb.	250 Bl./B. cl.	100 Vo. R.	400 Vo. R. fo.
350 V. fb.	—			50 Fl. fb.	250 Fl. Vo. br.	—	
50 Bl. J.	—	500 B. fb.	700 B. V.	150 Vo. Ro.	300 Ro. Vo.	100 Ro. cl.	350 Vo.
300 V./Bl. J.	—	400 V. fb.	—	150 Fl. fb.	—	—	
50 V.	—			250 B. J. fb.	350 B. J.		
25 Bu.	50 Bu. V.	50 Bu. V. fb.	—	250 Fl. fb.	—		
50 J.	—	50 J.	—	10 B. fb.	300 Bl./B. cl.	50 Ro.	350 Vo.
50 J. V.	400 J./Ro. fo.	200 V. cl.	—	10 Fl. Vo.	150 Fl. Vo. br.		
100 J. fb.	—			300 B.	350 B. fo.	250 Li. fb.	—
300	—						
150 J./Bu. fo.	—	250 Li.	—	150 B. cl.	350 Ro. Vo.	200 Li. fb.	—
500 V./Bu.	—	150 Bu. N. fb.	—	150 R. cl.	250 R.		
25 Bl.	—	50 Li./V. cl.	—	5 B. G.	300 Bl. J. V.	200 Li. fb.	—
25	500 Bl. J.	50 Bl.	150 Bl./V. cl.	5 N.	300 Fl. Vo. br.		
50 Bu. cl.	250 Bu. V. cl.	700 V. Bu.	—	25 B. Bl.	150 B. cl./G. V. fo.	250 Ro. fb.	400 Li.
300 Bu. V.	—			25 Fl. fb.	150 Fl. cl.		
150 Bl. J. fb.	—			10 Bl. J. fb.	300 Bl. Ro.	50 Li.	450 Vo. R.
200 V. fb.	—	200 V.	—	10 Fl. fb.	300 Fl. Vo.		

1 = lumière du jour } Gaffney, Furth  
2 = lumière de Wood } et  $AgNO_3$

1 = immédiatement }  
2 = 24 h après }  $K_3Fe(CN)_6$

1 = immédiatement }  
2 = après l'étuve }  $K_4Fe(CN)_6$

/ indique la présence d'une auréole autour de la tache  
+ indique la zone plus marqué

En ce qui concerne les colorants appréciés dans leur ensemble (Tableau I), nous pouvons observer des différences de coloration très remarquables d'acide à acide, et même, pour chacun d'eux, des variations très grandes selon que l'on emploie l'un ou l'autre des colorants.

De plus, nous tenons à souligner quelques faits qui nous semblent dignes d'être observés:

Selon BUCH<sup>20</sup>, l'acide fumarique ne provoque pas de coloration avec le colorant de FURTH alors que GODIN<sup>21</sup>, LAMBOU<sup>22</sup> et LATURAZE<sup>4</sup>, prétendent le contraire. Ce dernier indique même une concentration minimum (50  $\gamma$ ).

Nos résultats sont en accord avec ceux de ces trois derniers auteurs, mais nous trouvons un seuil plus bas que LATURAZE: 5  $\gamma$  pour l'observation en U.V. et 10  $\gamma$  pour l'observation à la lumière du jour.

Selon HALPERN<sup>23</sup>, le colorant de BERG ET UFFELMANN colore l'acide glycolique mais non l'acide pyrrolidone-carboxylique. Or, nous avons obtenu des colorations avec les deux acides avec des seuils de 150  $\gamma$  pour l'acide pyrrolidone-carboxylique et de 25  $\gamma$  pour l'acide glycolique. L'affirmation du dit auteur pourrait être due au fait qu'il n'ait pas essayé diverses concentrations.

Les couleurs que nous avons obtenues sont en général en accord avec celles des autres auteurs. Nous avons cependant observé pour l'acide aconitique avec le colorant de FURTH une couleur gris cendré alors que LATURAZE obtient le jaune, et pour l'acide malique nous obtenons avec le nitrate d'argent une couleur châtaine alors que LATURAZE observe une couleur mauve.

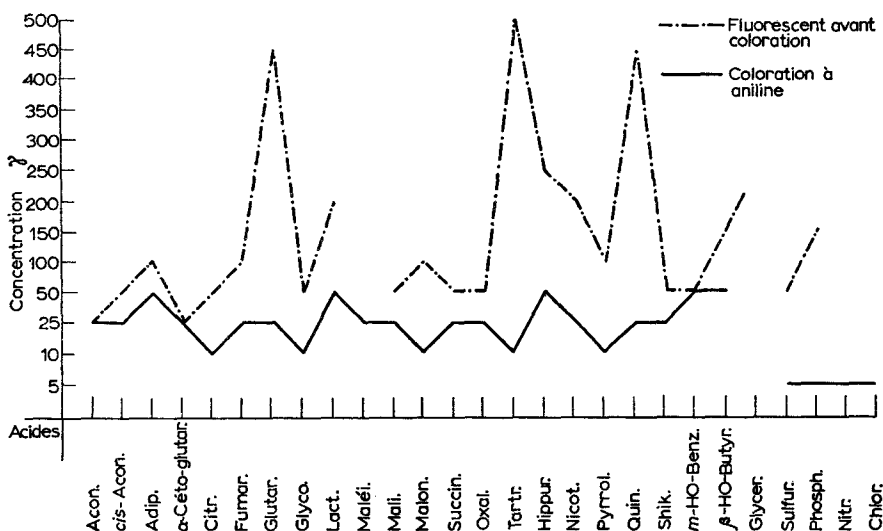


Fig. 1.

En résumé, nous ne prétendons pas avoir mis au point une technique permettant de caractériser dans tous les cas les acides organiques considérés, ni d'en indiquer les concentrations approximatives. Cependant en utilisant quelques colorants particu-



liers, l'étude du tableau et de la figure présentés facilitera certainement l'interprétation non seulement qualitative mais aussi, dans une certaine mesure, semi-quantitative de certains chromatogrammes.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions M. OSVALDO ANTUNES de sa collaboration technique.

## RÉSUMÉ

Les auteurs ont mis au point une technique chromatographique pour la séparation et l'identification des principaux acides organiques des milieux biologiques.

La technique employée est: chromatographie bidimensionnelle ascendante, au papier Whatman No. 3 enroulé en cylindre, avec les solvants de NORDMANN et coll., et en utilisant sept colorations différentes. La méthode permet la détection des acides organiques en question et leur appréciation semi-quantitative avec quelques colorants particuliers.

## SUMMARY

The authors describe a chromatographic method for the separation and identification of the most important organic acids found in biological fluids.

The technique used involves two-dimensional ascending chromatography on Whatman No. 3 paper rolled into a cylinder, using the two solvents of NORDMANN, followed by detection by means of seven different colour reactions.

With this method it is possible to detect the above-mentioned acids and, by using certain specific colour reactions, to carry out a rough semi-quantitative analysis.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. W. LUGG ET B. T. OVERELL, *Nature*, 160 (1947) 87.
- <sup>2</sup> R. OSTEUX ET J. LATURAZE, *Clin. Chim. Acta*, 1 (1956) 378.
- <sup>3</sup> J. NORDMANN, R. NORDMANN, J. P. DU RUISSEAU ET O. GAUCHERY, *Rev. franc. études clin. et biol.*, 1 (1956) 67.
- <sup>4</sup> J. LATURAZE, *Thèse de Doctorat d'État en Pharmacie*, Lille, 1959.
- <sup>5</sup> K. VAS, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 1 (1951) 335.
- <sup>6</sup> R. HEITFUSS, *Angew. Botan.*, 31 (1957) 61.
- <sup>7</sup> R. I. CHEFTEL, R. MUNIER ET M. MACHEBOEUF, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 840.
- <sup>8</sup> J. SAARNIO, F. NISKASAARI ET C. GUSTAFSSON, *Suomen Kemistilehti*, B 25 (1952) 25.
- <sup>9</sup> G. W. GAFFNEY, K. SCHREIER, N. DI FERRANTE ET K. I. ALTMAN, *J. Biol. Chem.*, 206 (1954) 695.
- <sup>10</sup> O. FURTH ET H. HERRMANN, *Biochem. Z.*, 280 (1935) 448.
- <sup>11</sup> A. JERMSTAD ET K. B. JENSEN, *Pharm. Acta Helv.*, 25 (1950) 209.
- <sup>12</sup> J. CARLES, A. SCHNEIDER ET A. M. LACOSTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 221.
- <sup>13</sup> R. A. CARTWRIGHT ET E. A. H. ROBERTS, *Chem. & Ind. (London)*, (1954) 1389.
- <sup>14</sup> A. M. BASTIE, *Arch. Sci. Physiol.*, 11 (1957) 87.
- <sup>15</sup> S. M. MARTIN, *Chem. & Ind. (London)*, (1955) 427.
- <sup>16</sup> M. A. BERG, *Bull. soc. chim. (France)*, 3 (1894) 883.
- <sup>17</sup> F. FERRAZ, *Rev. pathol. gén. et physiol. clin.*, 60 (1960) 833.
- <sup>18</sup> R. ACHER, C. FROMAGEOT ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
- <sup>19</sup> I. SMITH, *Chromatographic Techniques*, Heineman, Londres, 1959.
- <sup>20</sup> M. L. BUCH, R. MONTGOMERY ET W. L. PORTER, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 489.
- <sup>21</sup> P. GODIN, *Chem. & Ind. (London)*, (1954) 1424.
- <sup>22</sup> M. G. LAMBOU, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1449.
- <sup>23</sup> M. J. HALPERN, *Clin. Chim. Acta*, 5 (1960) 264.