

COLLECTE D'ESTERS D'ACIDES GRAS MARQUÉS AU TRITIUM ET AU CARBONE-14 ÉLUÉS PAR CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE

JEAN BEZARD, PHILIPPE BOUCROT ET GUY CLEMENT

*Laboratoire de Physiologie Animale, Faculté des Sciences de Dijon,
Côte d'Or (France)*

(Reçu le 29 juillet 1963)

INTRODUCTION

Dans les études métaboliques comportant des acides gras marqués, il est souvent indispensable de connaître la distribution de la radioactivité entre les acides gras d'un échantillon, ainsi que l'activité spécifique de chaque acide gras pris individuellement. Ceci peut être réalisé en principe de façon simple et précise par la mesure de l'activité des acides gras élués par chromatographie gaz-liquide.

Plusieurs méthodes ont déjà été décrites; elles se ramènent à deux types: soit le comptage direct, en continu, à la sortie de colonne^{1,2}, soit la collecte individuelle des esters d'acides gras et comptage ultérieur³⁻⁷, seule technique possible lorsque l'activité d'un pic est trop faible pour être comptée valablement pendant la durée d'émergence du pic. Ces méthodes ont presque toutes été développées en employant des acides gras marqués au carbone-14.

Dans ce travail, nous avons comparé le comportement en chromatographie gaz-liquide d'esters d'acides gras marqués au carbone-14 ou au tritium, à la fois sur colonne d'apiezon et sur colonne de polyester DEGS. Nous avons fait une étude systématique de l'influence des différents facteurs sur la collecte de ces esters, et nous nous sommes attachés surtout à l'étude des traînées radioactives.

TECHNIQUES

Chromatographie gaz-liquide

On utilise un appareil Barber-Colman modèle 10 avec détection par ionisation dans une microcellule au ⁹⁰Sr. Un séparateur (by-pass) placé à la sortie de la colonne, divise le courant d'argon en deux courants, un de récupération et l'autre de détection (Fig. 1). On emploie des colonnes de verre en U de 5 mm de diamètre intérieur, de 60 cm de longueur lorsque la phase stationnaire est l'apiezon, de 2 m lorsque c'est le succinate de diéthylène glycol (DEGS). Le support inerte, du chromosorb W 80-100 mesh (175-147 μ) est imprégné de liquide stationnaire selon la méthode préconisée par HORNING⁸ dans la proportion de 15-20 g d'apiezon ou de 25-30 g de DEGS pour 100 g de support. Pour une température de 170-180° et sous une pression d'entrée d'argon de 1.5 kg/cm², on obtient dans ces conditions une bonne résolution de la séparation des différents acides gras, avec un temps de rétention d'environ 20 min pour le stéarate de méthyle.

Nous avons retenu les conditions expérimentales suivantes:

Taux de séparation du courant d'argon de sortie: 95.5 % en récupération et 4.5 % en détection.

Tension appliquée au détecteur: 1250 V.

Contre-balayage d'argon dans la cellule de détection: 100 ml/min.

Température de la colonne: 170°.

Température de la cellule: 200°.

On traduit les aires enregistrées en microgrammes d'acides gras, aux différentes sensibilités de l'enregistreur, pour le calcul des activités spécifiques absolues. Dans ces conditions, on peut évaluer avec précision des quantités d'acide stéarique allant de 0.7 à 700 μg .

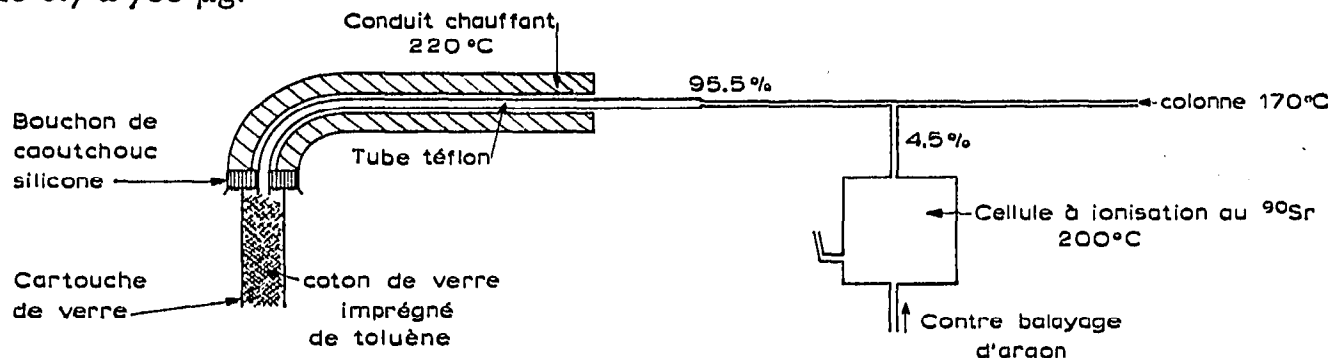


Fig. 1. Schéma du dispositif de détection et de collecte des acides gras.

Collecte des esters d'acides gras

Elle s'effectue par une méthode voisine de celle décrite par MEINERTZ ET DOLE⁶. À l'émergence de la colonne, les vapeurs d'esters méthyliques passent à travers un tube de téflon de 1.5 mm de diamètre intérieur et de 20 cm de longueur entouré d'un manchon chauffant (température 220°) fermé par une rondelle de caoutchouc siliconé de 1 cm d'épaisseur (voir Fig. 1).

Pour collecter les vapeurs, on applique contre le caoutchouc siliconé des cartouches de verre de 3.5 cm de longueur et de 6 mm de diamètre intérieur, ouvertes aux deux extrémités. Ces cartouches contiennent de la laine de verre imprégnée de toluène sur laquelle se condensent les vapeurs. On effectue le changement des cartouches manuellement, en se repérant sur le chromatogramme qui est enregistré simultanément.

On introduit la laine de verre dans un pot à scintillation en la poussant à l'aide d'un agitateur, puis on rince les parois intérieures de la cartouche avec 20 ml de liquide scintillant qu'on recueille dans le pot. On prend soin d'amener la laine de verre sur le fond du récipient afin qu'elle ne fasse pas écran devant la fenêtre des photomultiplicateurs; on élimine aussi les bulles d'air emprisonnées en pressant la laine de verre avec l'agitateur, ce qui facilite par là même la mise en solution des esters condensés; les fragments de fibre de verre disséminés dans le liquide décantent rapidement.

Afin d'obtenir une récupération aussi quantitative que possible, nous avons préféré transférer la laine de verre dans le pot plutôt qu'entraîner les esters par rinçage comme le font MEINERTZ ET DOLE⁶.

Mesure de l'activité

Elle se fait dans un appareil Tracerlab à scintillation liquide modèle LSC 10. Le liquide scintillant contient, par litre, 4 g de PPO (2,5-diphényloxazole), 100 mg de

POPOP (1,4-bis-2-(5-phényloxazolyl)-benzène) et on prend comme solvant du toluène Merck (pour analyses et chromatographie)

Les conditions de comptage offrant le meilleur rendement, comptetenu du bruit de fond sont les suivantes:

Tension appliquée aux photomultiplicateurs: 1600 V pour le tritium et 1300 V pour le carbone-14.

Comptage des impulsions en coïncidence dans les deux photomultiplicateurs, sans rejet des impulsions de haute énergie (2 channels) et gain de 24, pour les deux isotopes.

Dans ces conditions, le rendement pour le tritium est de 15 % avec un bruit de fond de 88 cpm (laine présente dans le liquide scintillant). Pour le carbone-14, le rendement est de 60 % et le bruit de fond de 82 cpm.

Préparation des échantillons et conduite des expériences

Dans nos expériences, on utilise du méthyl-stéarate-1-¹⁴C et -9,10-³H. Les échantillons sont tout d'abord purifiés par chromatographie gaz-liquide sur colonne DEGS après dilution avec du stéarate inactif; on recueille uniquement la fraction correspondant à la partie la plus étroite du pic. On s'est ensuite assuré de leur pureté en les rechromatographiant sur colonne DEGS.

Afin de se trouver dans des conditions de charge de colonne aussi comparables que possible, on choisit les activités spécifiques inversement proportionnelles au rendement du comptage. On compte ainsi un même nombre de coups pour une même quantité injectée, que le traceur soit du tritium ou du carbone-14.

Les colonnes utilisées, apiezon et DEGS, dont on a donné plus haut les caractéristiques, sont des colonnes neuves, qui n'ont encore reçu aucune injection d'acides gras radioactifs; des essais de vieillissement de colonne ont été effectués spécialement.

La durée de collecte du pic actif a été prise égale à $\frac{1}{8}$ du temps de rétention. Cette durée, légèrement différente sur les deux types de colonne, mais voisine de 3.3 min, correspond à une zone de collecte sur le chromatogramme comprenant la totalité du pic d'éluion; elle a été choisie comme unité de temps de collecte dans l'étude systématique de l'activité retenue sur la colonne. Nous recueillons en une seule fraction, soit pendant 5.5 unités de temps, tout ce qui est élué avant le pic 18:0. Nous collectons ensuite le pic actif en une seule fraction (prise comme unité), puis nous collectons 9 fractions successives de 1 unité de temps, 3 fractions de 2 unités et 3 fractions de 3 unités, soit une évaluation de la radioactivité contaminante pendant environ 80 min après l'éluion du pic actif. Les activités collectées sont exprimées en cpm et en pour cent de l'activité totale récupérable qui représente 95 % de l'activité injectée.

RÉSULTATS

1. Pic unique de méthyl-stéarate-1-¹⁴C ou -9,10-³H (Tableau I)

(a) *Fraction collectée avant le pic 18:0.* Sur colonne DEGS, aucune radioactivité n'apparaît dans cette fraction, tant pour les acides gras marqués au tritium que pour ceux marqués au carbone-14. Sur colonne d'apiezon, elle est extrêmement faible: 0.10 et 0.13 % respectivement de l'activité récupérable pendant les 5.5 unités de temps.

(b) *Fraction collectée pendant l'éluion du pic 18:0.* L'activité mesurée sur cette fraction représente plus de 95 % de l'activité totale récupérable, dans toutes les

expériences. Ce pourcentage est d'ailleurs sensiblement constant quelle que soit la phase stationnaire utilisée (apiezon, DEGS) et quel que soit l'acide gras marqué injecté.

(c) *Fractions collectées après le pic 18:0.* On détecte de la radioactivité pendant 80 min après élution du stéarate: pendant la première unité de temps, elle représente 0.6 à 1.0 % de l'activité totale récupérable sur colonne d'apiezon et 1.2 à 1.6 % sur colonne de DEGS. L'activité décroît ensuite régulièrement: 0.10 à 0.15 % à la sixième unité, soit 20 min environ après élution du pic radioactif; après 1 h, elle n'est plus que de 0.01 à 0.02 %.

Si l'on compare la décroissance de la radioactivité contaminante, il ne semble pas qu'il y ait de différence selon le type d'acide marqué. On voit sur le graphique

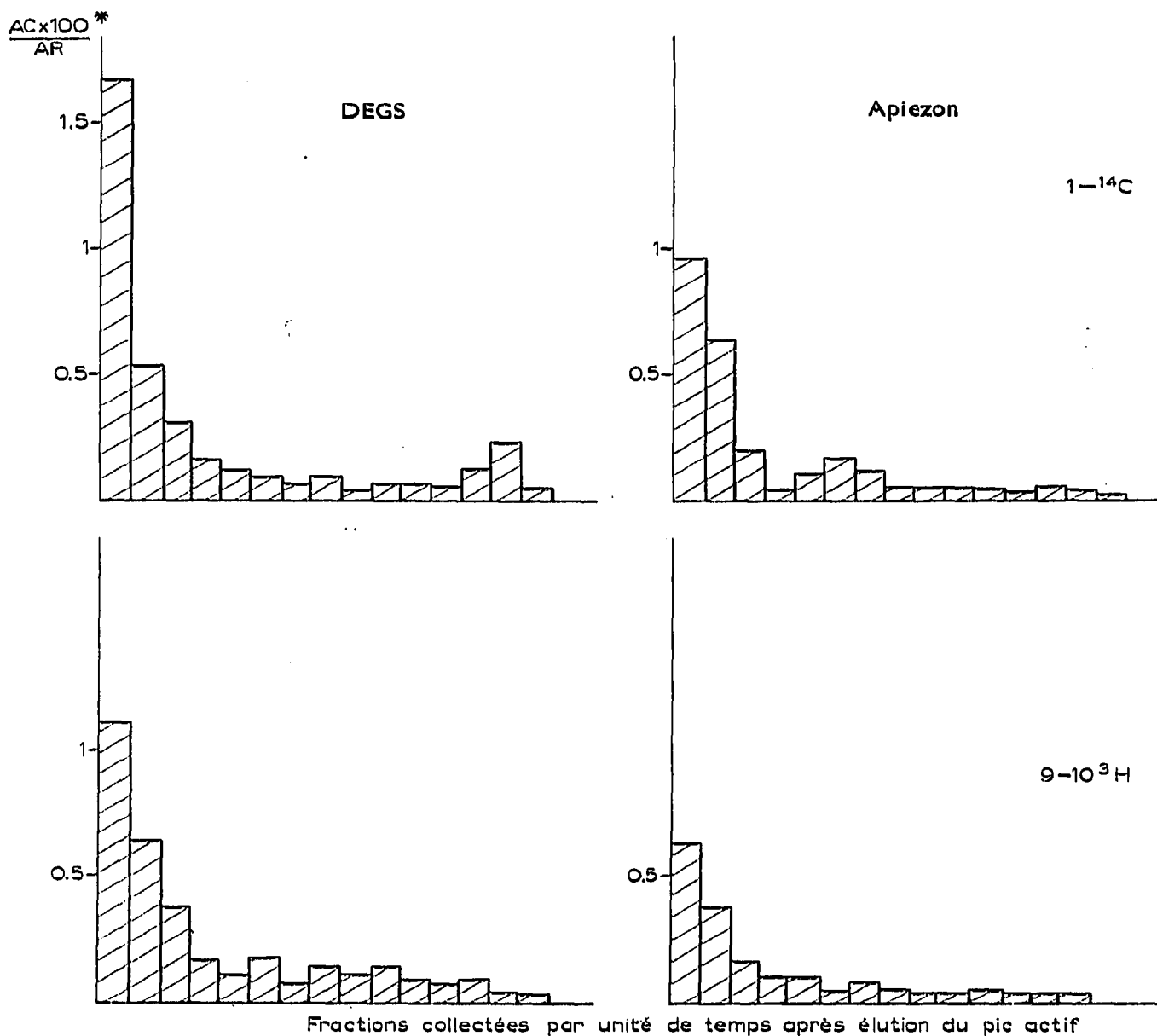


Fig. 2. Radioactivité des fractions collectées après élution du pic actif en pour cent de l'activité récupérable. Injection de méthyl-stéarate-1-¹⁴C et -9,10-³H sur colonne apiezon et DEGS (voir notes Tableau I).

TABLEAU I
RADIOACTIVITÉ DES FRACTIONS COLLECTÉES APRÈS INJECTION DE MÉTHYL-STÉARATE-1-¹⁴C ET -9,10-³H SUR COLONNES APIEZON ET DEGS

Fractions collectées	Nombre d'unités de temps de collecté*	Radioactivité** des fractions sur											
		Apiézon						DEGS					
		¹⁻¹⁴ C AR = 39,000 cpm		^{9,10-3} H AR = 39,500 cpm		¹⁻¹⁴ C AR = 36,000 cpm		^{9,10-3} H AR = 36,500 cpm		^{9,10-3} H AR = 97,500 cpm			
AC (cpm)	AC x 100/AR (%)	AC (cpm)	AC x 100/AR (%)	AC (cpm)	AC x 100/AR (%)	AC (cpm)	AC x 100/AR (%)	AC (cpm)	AC x 100/AR (%)	AC (cpm)	AC x 100/AR (%)		
Avant 18:0	5-5	43 ± 3	0.10	51 ± 4	0.13	0	0	0	0	0	0	0	
Pic 18:0	1	38,504 ± 62	98.7	38,080 ± 62	96.4	34,435 ± 58	95.6	35,824 ± 60	98.1	93,312 ± 97	95.7		
Après 18:0	1	375 ± 7	0.96	244 ± 6	0.62	605 ± 8	1.68	423 ± 7	1.16	1643 ± 13	1.69		
	1	248 ± 6	0.64	148 ± 5	0.37	192 ± 5	0.53	230 ± 5	0.63	541 ± 8	0.55		
	1	76 ± 4	0.20	60 ± 4	0.15	112 ± 4	0.31	134 ± 5	0.37	285 ± 6	0.29		
	1	17 ± 3	0.04	34 ± 3	0.09	57 ± 3	0.16	59 ± 4	0.16	220 ± 6	0.23		
	1	41 ± 3	0.10	33 ± 3	0.09	44 ± 3	0.12	35 ± 3	0.10	168 ± 5	0.17		
	1	66 ± 4	0.17	18 ± 3	0.04	34 ± 3	0.09	63 ± 4	0.17	97 ± 4	0.10		
	1	46 ± 3	0.12	26 ± 3	0.07	22 ± 3	0.06	22 ± 3	0.06	86 ± 4	0.09		
	1	21 ± 3	0.05	14 ± 3	0.04	32 ± 3	0.09	46 ± 4	0.13	68 ± 4	0.07		
	1	20 ± 3	0.05	11 ± 3	0.03	14 ± 3	0.04	38 ± 3	0.10	54 ± 4	0.06		
	2	19 ± 3	0.05	13 ± 3	0.03	22 ± 3	0.06	47 ± 4	0.13	33 ± 1	0.03		
	2	17 ± 3	0.04	19 ± 3	0.04	21 ± 3	0.06	28 ± 3	0.08	68 ± 4	0.07		
	2	10 ± 3	0.03	12 ± 3	0.03	20 ± 3	0.05	20 ± 3	0.05	40 ± 4	0.04		
	3	20 ± 3	0.05	11 ± 3	0.03	44 ± 3	0.12	29 ± 3	0.08	21 ± 3	0.02		
	3	16 ± 3	0.04	12 ± 3	0.03	84 ± 4	0.23	12 ± 3	0.03	56 ± 4	0.06		
	3	8 ± 3	0.02	0	0	19 ± 3	0.05	7 ± 3	0.02	19 ± 2	0.02		
Totaux	39,547	101.36	38,786	98.19	35,757	99.25	37,017	101.37	96,711	99.19			

* 1 unité = 3.3 min = 1/6 du temps de rétention.

** AR = activité récupérable, égale aux 95.5 % de l'activité injectée, le système de "by-pass" prélevant 4.5 % pour la détection; AC = activité collectée par fraction.

*** ± écart type.

(Fig. 2) que la décroissance a même allure, par contre elle diffère légèrement selon le type de colonne apiezon, ou DEGS.

Lorsqu'on injecte une quantité plus grande d'ester (Tableau I, 4 dernières colonnes), l'activité contaminante est relativement plus importante dans l'unité de temps qui suit immédiatement l'élution du pic: 1.76 % pour 93,300 cpm au lieu de 1.18 % pour 35,800 cpm; mais il n'y a pas de proportionnalité: pour une charge 2.6 fois plus importante, le pourcentage d'activité est multiplié seulement par 1.5. Ensuite, l'activité décroît. Dès la deuxième unité de temps on atteint un même niveau, que la charge soit forte ou faible (Fig. 3).

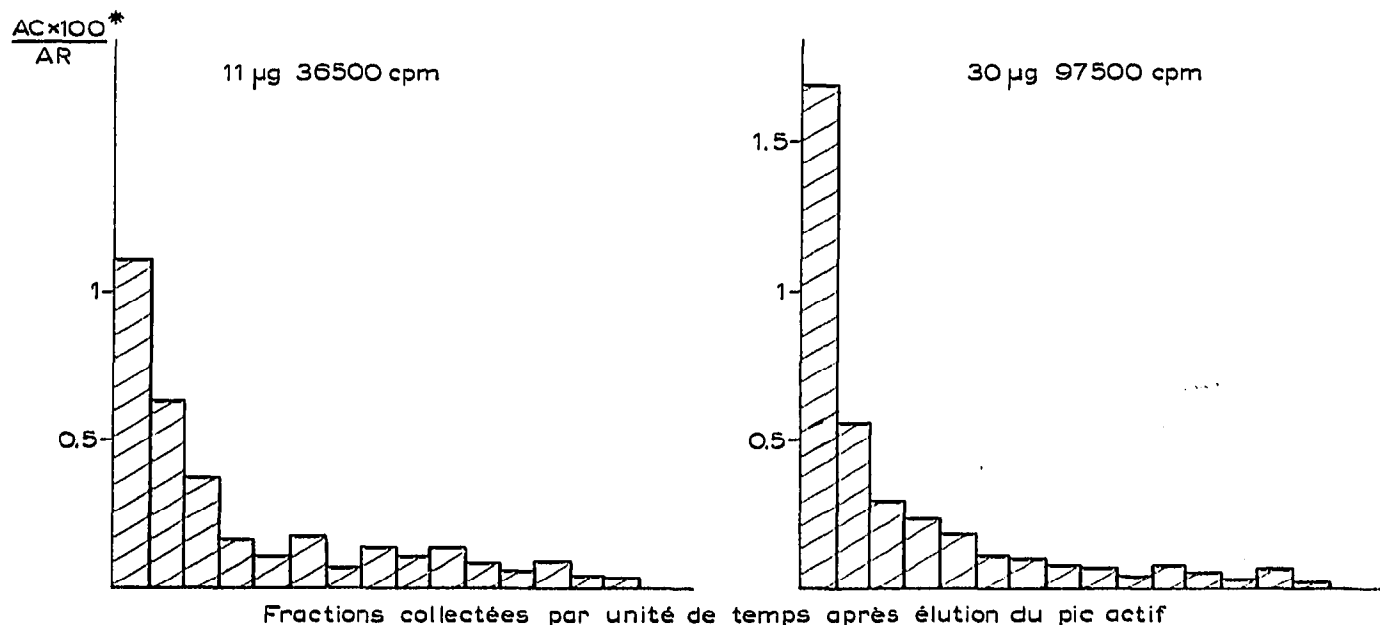


Fig. 3. Radioactivité des fractions collectées après élution du pic actif en pour cent de l'activité récupérable. Injection de deux charges différentes de méthyl-stéarate-9,10-³H sur colonne DEGS (voir notes Tableau I).

2. Addition de méthyl-stéarate non radioactif

Pour voir si la traînée constatée après élution d'un pic unique radioactif est affectée par l'élution consécutive de pics non actifs, nous avons fait 5 injections consécutives de méthyl-stéarate tritié séparées à intervalles réguliers égaux à une unité de temps de collecte en commençant aussitôt après l'injection du pic 18:0 tritié (Tableau II).

Si l'on compare ces résultats avec ceux du Tableau I, on voit que l'élution d'esters d'acides gras inactifs ne modifie absolument pas l'allure de la traînée contaminante laissée par un ester gras radioactif. Le fait est valable pour les deux catégories de phases stationnaires.

3. Effet de la durée d'utilisation de la colonne

Nous n'avons fait qu'un seul essai sur colonne DEGS en pratiquant des collectes sur une colonne neuve, puis sur la même colonne après 8 et 21 jours d'utilisation constante. Chaque fois, on pratique une injection d'une même quantité de méthyl-stéarate tritié: 11 µg, 36,500 cpm.

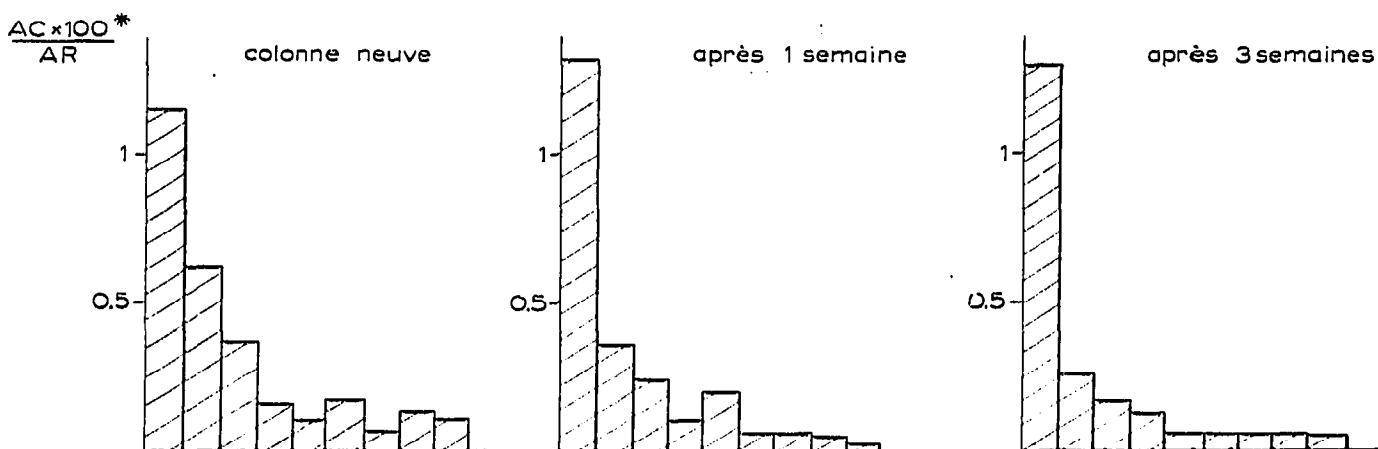
Nous avons représenté sur la Fig. 4, en pour cent de l'activité récupérable, la radioactivité par unité de temps, après élution du pic actif.

On voit que les résultats sont pratiquement identiques; il n'y a aucune augmentation des traînées radioactives du fait de l'utilisation de la colonne pendant la période testée.

TABLEAU II

RADIOACTIVITÉ DES FRACTIONS COLLECTÉES APRÈS INJECTION DE MÉTHYL-STÉARATE-9,10³H, SUIVIE DE 5 INJECTIONS DE STÉARATE INACTIF

Fractions collectées	Apiezon		DEGS	
	Activité récupérable (AR) = 37,500 cpm		Activité récupérable (AR) = 76,000 cpm	
	Activité collectée (AC) (cpm)	AC × 100/AR (%)	Activité collectée (AC) (cpm)	AC × 100/AR (%)
Pic (radioactif) 18:0	36,355 ± 60	96.95	72,800 ± 90	95.79
Pics (inactifs) 18:0	237 ± 6	0.63	1300 ± 12	1.71
	149 ± 5	0.40	423 ± 7	0.56
	91 ± 4	0.24	302 ± 6	0.40
	59 ± 4	0.16	250 ± 6	0.33
	37 ± 3	0.10	192 ± 5	0.25



Fractions collectées par unité de temps après élution du pic actif

Fig. 4. Radioactivité des fractions collectées après élution du pic actif en pour cent de l'activité récupérable. Injection de méthyl-stéarate-9,10-³H sur colonne DEGS neuve, après 1 semaine et après 3 semaines) (voir notes Tableau I).

4. Fractionnement d'un mélange de méthyl-stéarate et de méthyl-oléate marqués ¹⁴C

Après injection du mélange d'esters radioactifs, nous avons recueilli 11 et 13 sous-fractions pour les pics 18:0 et 18:1 respectivement pour mesurer la radioactivité et nous avons fait figurer sur le chromatogramme d'élution (Fig. 5) le tracé correspondant à la radioactivité des sous-fractions (radiogramme). On voit que pour les doses injectées, on obtient une excellente résolution tant chromatographique que radiographique. Le sommet de la courbe d'activité précède légèrement celui du pic d'élution chromatographique. Ceci est dû simplement au fait que les circuits de détection et de récupération sont indépendants, ce dernier étant légèrement plus court. Cela mis à part, on note une excellente concordance entre les deux tracés.

Notons que les trainées radioactives n'apparaissent pas sur ce graphique, les unités de temps (sous-fractions) étant seulement de 24 sec au lieu de 3.3 min pour les expériences précédentes.

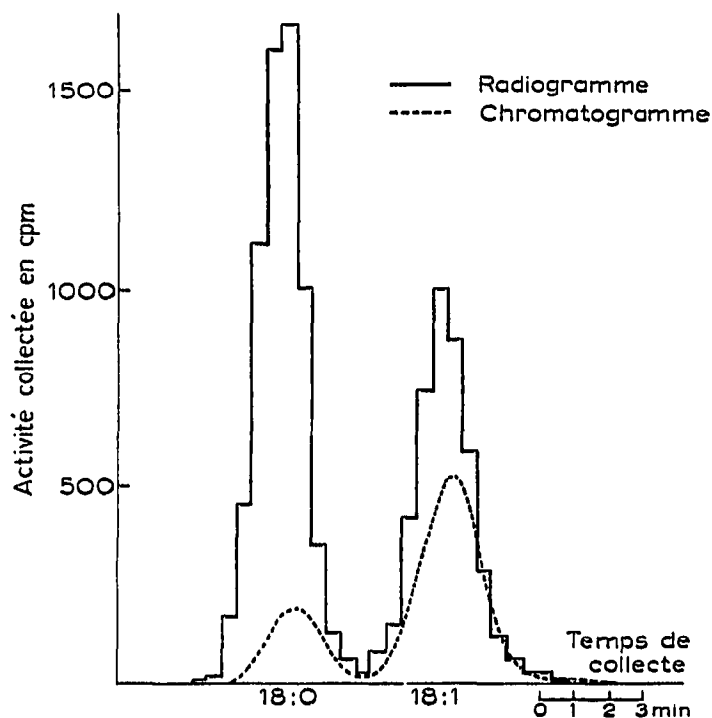


Fig. 5. Collecte du méthyl-stéarate et du méthyl-oléate-1-¹⁴C après élution sur colonne DEGS: chromatogramme et radiogramme.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS PRATIQUES

Des résultats antérieurs aux nôtres avaient déjà établi un certain nombre de faits relatifs à la collecte individuelle d'esters d'acides gras radioactifs élués par chromatographie gaz-liquide. On savait déjà par des études faites à l'aide de chromatographie et de systèmes de collecte de types divers⁴⁻⁶ qu'on pouvait recueillir plus de 90 % de l'activité injectée dans le cas d'esters méthyliques d'acides gras marqués 1-¹⁴C.

Dans le présent travail, nous montrons qu'il en est de même pour des esters d'acides gras marqués au tritium; notre pourcentage de récupération atteint presque 100 %. L'étude systématique que nous avons faite des trainées radioactives dans les conditions standard d'une analyse rapide sur microquantités (telle qu'elle peut être réalisée sur appareil Barber Colman à détection et récupération indépendantes) a permis d'établir un certain nombre de faits:

(i) Nous avons constaté que, toutes choses égales d'ailleurs (charges, activités, colonnes, etc.), les résultats sont identiques qu'il s'agisse d'acides gras marqués au tritium ou au carbone-14.

(ii) Par contre des différences apparaissent notamment dans l'importance et l'allure de la traînée radioactive selon la phase stationnaire utilisée: apiezon ou polyesters.

Une charge plus importante (activité spécifique égale) augmente l'activité retenue, surtout dans la première unité de temps. Le fait, déjà signalé par PASCAUD⁷ pour le méthyl-palmitate- $1-^{14}\text{C}$ est ici retrouvé avec le méthyl-stéarate- $9,10-^3\text{H}$.

Ces deux observations montrent que les traînées radioactives au voisinage immédiat du pic actif sont directement en rapport avec la descente plus ou moins rapide du pic et représentent donc essentiellement des traînées de pic: sur colonne d'apiezon en effet, la descente du pic est plus rapide que sur colonne DEGS et, lorsqu'on augmente la quantité d'ester injectée, la largeur du pic augmente en même temps que le sommet se trouve légèrement retardé, si bien qu'en se plaçant dans les mêmes conditions de collecte, on recueille dans l'unité de temps qui suit immédiatement une partie plus importante de la traînée.

Des esters inactifs élués immédiatement après un pic de méthyl-stéarate- $9,10-^3\text{H}$ ne modifient absolument pas l'allure de la traînée radioactive laissée par le pic actif. MEINERTZ ET DOLE⁶ l'avaient déjà signalé pour le méthyl-palmitate- $1-^{14}\text{C}$. Nous retrouvons la même chose avec le méthyl-stéarate tritié et cela quelle que soit la phase stationnaire utilisée. A cet égard, le fait qu'il n'y ait aucune différence entre une phase apolaire et une phase polyester n'est pas en faveur d'une intervention importante des phénomènes de transestérification à l'origine de la traînée radioactive comme on l'a suggéré⁷.

Il est certain qu'il subsiste encore des traces de radioactivité longtemps après élution d'un pic actif. Peut-être s'agit-il d'une rétention d'esters sur la phase ou le support, suivie de réémission; quoi qu'il en soit, les contaminations par ces traînées radioactives sont, malgré tout, très minimes puisqu'elles s'abaissent déjà à 0.1 % environ dès la 4^{ème} ou 5^{ème} unité de temps après élution du pic actif pour diminuer progressivement ensuite. Quant à la radioactivité collectée avant le pic actif, elle est pratiquement inexistante lorsqu'il s'agit d'un ester déjà purifié par chromatographie gazeuse.

Nous terminerons par quelques conclusions pratiques. Nous dirons tout d'abord que les acides gras tritiés conviennent tout aussi bien que les acides gras marqués au carbone- 14 pour les expériences de collecte et de mesure d'activité des fractions éluées.

Lorsqu'il s'agit de deux esters fortement radioactifs, même élués consécutivement, la séparation est aussi bonne au point de vue masse que radioactivité (Fig. 5). L'activité spécifique est très facile à déterminer puisqu'on connaît l'activité totale du pic et l'aire enregistrée simultanément. La faible activité d'un ester ne pose pas de problème en soi puisqu'on peut répéter la collecte, augmenter la quantité d'esters injectée et effectuer la mesure de la radioactivité pendant un temps assez long pour obtenir des résultats statistiquement valables. Mais une difficulté se présente lorsque des esters de faible activité sont élués très tôt après les esters fortement actifs. Dans ce cas, il est indispensable de connaître l'importance de la traînée radioactive au moment d'élution de l'ester.

Des graphiques tels que ceux que nous produisons dans ce travail montrent que l'on peut aisément décider de la validité des résultats.

Enfin, il n'est pas sans intérêt de constater qu'il n'y a aucune augmentation des traînées radioactives lorsqu'une colonne a servi pendant trois semaines d'une façon ininterrompue; il est vraisemblable qu'il en est ainsi aussi longtemps que son pouvoir de résolution n'est pas modifié. On peut donc presque recommander d'utiliser les co-

lonnes pour chromatographie de matériel alternativement actif et inactif, les traces d'activité résiduelle se trouvant ainsi éliminées entre temps.

RÉSUMÉ

Les esters d'acides gras marqués au tritium peuvent être collectés après élution par chromatographie gaz-liquide dans les mêmes conditions que les esters d'acides gras $1-^{14}\text{C}$. L'étude comparée des traînées radioactives effectuée dans différentes conditions, donnent les mêmes résultats pour l'un et l'autre type d'acide gras marqué. On ne note pas de modifications dans les traînées radioactives en rapport avec la durée d'utilisation d'une colonne tant que son pouvoir de résolution est intact.

SUMMARY

Fatty acid esters labelled with tritium can be collected after gas-liquid chromatography under the same conditions as esters labelled with ^{14}C at C-1. Comparison of the radioactive tracings obtained under different conditions showed that the results were the same for both types of labelled fatty acid. The time during which a column is used has no effect, as long as the power of resolution remains intact.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ G. POPJAK, A. E. LOWE, D. MOORE, L. BROWN ET F. A. SMITH, *J. Lipid Res.*, 1 (1959) 29.
- ² A. T. JAMES ET E. A. PIPER, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 265.
- ³ L. H. MASON, H. J. DUTTON ET L. R. BAIR, *J. Chromatog.*, 2 (1959) 322.
- ⁴ A. KARMEN, L. GIUFFRIDA ET R. L. BOWMAN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 44.
- ⁵ A. K. HAJRA ET N. S. RADIN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 131.
- ⁶ M. MEINERTZ ET V. P. DOLE, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 140.
- ⁷ M. PASCAUD, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 125.
- ⁸ E. C. HORNING, E. A. MOSCATELLI ET C. C. SWEELEY, *Chem. Ind. (London)*, (1959) 751.

J. Chromatog., 14 (1964) 368-377