

Département de Microchimie de l'Université libre de Bruxelles.

Microdétermination des constantes physiques des acides aminés.

La température de fusion selon Kofler.

Par

Gh. Sommereyns.

(Reçu le 29 juin 1953.)

Les constantes physiques des acides aminés sont peu connues. La littérature ne fournit à ce sujet que très peu de renseignements. Il semble donc intéressant d'essayer de compléter cette lacune, d'autant plus que ces composés jouent un rôle si important dans la vie, l'agriculture et l'industrie. Leur étude est devenue un problème d'actualité.

Dans les publications les plus récentes¹ la préparation et la purification des acides aminés de synthèse sont données sans autre critère de pureté que les températures de fusion de certains dérivés.

Ces dérivés qui servent à l'identification des acides aminés sont nombreux. Cependant leur préparation demande une certaine quantité de matière et implique des manipulations qui consomment du temps. De plus, les renseignements recueillis dans la littérature au sujet des constantes physiques de ces dérivés présentent des lacunes, ne permettant pas toujours une identification certaine de l'acide aminé envisagé².

Il en est ainsi par exemple pour la citrulline I, la thyroxine dl, la thréonine d et l, la norleucine d, la créatine, la créatinine, la norvaline l dont la littérature ne mentionne presque pas, et dans certains cas même, pas de dérivés. Un autre exemple est donné par la β alanine et l'arginine dl, pour lesquels les températures de fusion de l'acide aminé et de ses dérivés sont très proches. De plus, les températures de fusion des dérivés ne sont pas toujours facilement accessibles, elles s'accompagnent souvent de décomposition. Citons à ce sujet les picolonates formés avec les acides aspartique et glutamique dl, avec la glycine et l'histidine l, les dérivés benzoylés de l'histidine l et dinitrobenzoylés du tryptophane l, de la cystine l.

Les températures de fusion considérées ci-dessus se trouvent dans le tableau suivant et sont tirées de l'ouvrage de *N. D. Cheronis* et *J. B. Entrikin*².

Le problème de la détermination des constantes à la fusion a été abordé ici avec l'idée de s'en servir pour l'identification des acides aminés et comme moyen d'investigation de mélanges de ceux-ci.

Il existe dans la littérature une grande confusion au sujet de ces constantes. Les acides aminés fondent très haut, se décomposent facilement au cours d'une élévation de température. Ces faits entraînent inévitablement un manque de netteté et de précision dans les déterminations.

Ainsi l'acide glutamique d fond avec décomposition à différentes températures variant de 198 à 225° C². L'intervalle de décomposition dépend de la vitesse de chauffe à laquelle est soumise la substance. Ainsi, la décomposition de la tyrosine l a lieu à 314—8° C au cours d'un chauffage rapide et de 290—5° C au cours d'un chauffage lent; la littérature signale aussi une décomposition à 344° C². La thyroxine, chauffée à raison de 10 degrés par minute fond à 250° C; chauffée à raison de 3 degrés par minute, elle fond à 230—5° C².

C'est pourquoi dans le présent travail le comportement des acides aminés à la fusion a été observé 1° au cours d'un chauffage progressif et 2° au cours d'un chauffage brutal.

De plus, jusqu'ici, il a été très difficile d'obtenir des acides aminés purs. Et c'est grâce à l'efficacité de la méthode chromatographique³ appliquée à la séparation de mélanges, à la purification de corps isolés, qu'un progrès a pu être réalisé. Des échantillons très purs d'acides aminés peuvent être obtenus, à présent.

D'autre part, les récentes méthodes microchimiques de *Kofler*, praticables sur de petites quantités de substances, même sur quelques cristaux, permettent de nouvelles investigations dans l'étude du comportement à la fusion. Elles rendent possible des modifications des conditions de chauffage des substances, apportent dans les observations des phénomènes plus de netteté, surtout dans le cas des substances fragiles.

Vu le comportement à la fusion des acides aminés, nous avons voulu préciser avec ces nouvelles méthodes, dans la mesure du possible, les données de la littérature au sujet des *températures de fusion* de ces substances. Nous avons aussi recherché les *eutectiques* que ces acides aminés pourraient former entre eux ou avec d'autres substances organiques. Ces eutectiques fondent à température plus basse que les substances mises en jeu et, par conséquent, font courir aux acides aminés moins de risques de décomposition au cours du chauffage. Il était à prévoir que les eutectiques seraient plus caractéristiques et conviendraient mieux à l'identification des acides aminés.

Étude du comportement des acides aminés à la fusion et de leurs possibilités de sublimation.

Les travaux se sont poursuivis d'une part au *microscope polarisant* à *plaque chauffante* décrit par L. et A. Kofler⁴.

L'échantillon peut être examiné en lumière ordinaire ou polarisée (nicols croisés). Dans ce dernier cas, les cristaux biréfringents rétablissent en partie la lumière et la fusion se marque par l'extinction du champ. Le comportement à la fusion, observé au microscope, a été étudié des deux manières suivantes:

—A la suite d'un chauffage progressif:

La préparation est déposée sur la plaque chauffante à environ 50° C. On élève la température à la vitesse de 4 degrés par minute jusqu'au moment où a lieu la fusion.

—A la suite d'un chauffage brutal:

La préparation est déposée sur la plaque chauffante dont la température est de 10 à 20° C plus basse que la température de fusion présumée de l'échantillon. La vitesse de chauffe est ensuite de 4 degrés par minute jusqu'au moment où a lieu la fusion.

Le début de fusion est la seule partie du phénomène qui ait un sens dans les déterminations faites avec des produits aussi facilement décomposables.

D'autre part, le *bloc chauffant*⁵ a été utilisé pour les mesures des températures de fusion. Il a servi aussi à la préparation des sublimés*: sublimés d'acides aminés, purification de certaines substances intervenant dans l'étude des eutectiques.

Des acides aminés d'origines différentes ont été comparés: produits Kodak, British Drug Houses (pureté chromatographique), Preston.

Les résultats obtenus sont ceux des tableaux ci-dessous où les acides sont classés dans l'ordre généralement adopté dans la littérature⁶.

Les remarques suivantes découlent de l'examen de ces tableaux:
—Les températures de fusion observées au microscope et au bloc chauffant sont en général très différentes de celles relevées dans la littérature.
—Des échantillons d'un même individu provenant de plusieurs sources présentent des différences de température de fusion. Cependant leurs eutectiques se sont révélés concordants, ce qui est en faveur d'une identité.
—Il se confirme que la facilité avec laquelle ces substances se décomposent empêche souvent la lecture exacte de la température de fusion, même avec le mode opératoire employé.

* Une plaque porte-objet est placée sur le bloc à une température inférieure d'une dizaine de degrés à la température de fusion de la substance à sublimer. A l'intérieur d'un petit anneau métallique déposé sur cette plaque, on introduit la substance. L'anneau est recouvert d'une lame porte-objet sur la surface inférieure de laquelle se dépose le sublimé.

Températures de fusion.

Acides aminés	Températures de fusion en ° C	Températures de début de fusion en ° C.		
		Bloc chauffant	Microscope	
			Ch. brutal	Ch. progressif
Glycocolle Kodak	247—57 déc. ⁴ /232 ² 233 (225—30) ⁷	déc. à partir de 235	240 déc.	240 déc.
β -Alanine Kodak	196 ² /196 déc. ⁷	régression* de 194 à 191	194 déc.	191 déc.
Valine dl Kodak	298 ² /298 (292) déc. ⁷	très sublimable	228	282? 232
Ac. ϵ -amino-ca- proïque Kodak	202—203 ³	215 déc.	205	205
Norleucine dl Kodak	327 ² /327 déc. ⁷	> 260	env. 250 déc.	
Leucine dl Kodak	332 ² /332 déc. (290) ⁷	très sublimable env. 230	242	242
Leucine l Preston	337 ² /295 ⁷	très sublimable env. 230	250	env. 240 déc.
Isoleucine dl Kodak	292 ² /292 déc. ⁷	très sublimable env. 230	225	235
idem B. D. H.	idem	très sublimable env. 230	240	env. 250 déc.
Ac. aspartique dl Kodak	280 ² 278—80 déc. ⁷	> 260	> 310 déc.	> 280
idem B. D. H.	idem	> 260	> 310 déc.	
idem Preston	idem	> 260	> 310 déc.	
Ac. glutamique l + Kodak	195—200 ⁴ /224 déc. ² /202 (198); 213 déc. ⁷	régression de 218 à 193	194	190
Méthionine dl Kodak	272 ² /281 ⁷	déc. vers 250	déc.	env. 220 déc.
Cystine l — Kodak	260 déc. ² /258— 61 déc. ⁷		> 275 déc.	> 275 déc.
β -Phénylalanine dl Kodak	318—20 déc. ⁷	très sublimable env. 250	220 déc.	210 déc.
Tyrosine l — Kodak	314—18 déc.; 290; 334 ² /295 déc. ⁷		245 déc.	250 déc.

* Régression: la limite solide/liquide régresse au cours de la détermination.

Etude des sublimés.

Acides aminés	Début de fusion en °C Microscope	Remarques Sublimés (au bloc chauffant)
Glycocolle Kodak	229/228,5/224	sublimation vers 140—45° grains et bâtonnets
β -Alanine Kodak	202/197/193	sublimation vers 180—90° macles
Valine dl Kodak	228/221,5/220/184?	sublimation vers 185° polygones, oursins
Ac. ε -amino-caproïque Kodak	201/200,5	sublimation vers 190—200°
Leucine dl Kodak	185/188/186	sublimation vers 185° oursins, aiguilles radiées
Isoleucine dl Kodak	210/200/210	sublimation vers 180°
Ac. aspartique dl Kodak		pas de sublimation
Ac. glutamique l + Kodak	198/197/198 déc.	sublimation vers 180—90°
Méthionine dl Kodak	220/213/216,5	sublimation vers 170° oursins
Cystine l — Kodak		pas de sublimation
β -Phénylalanine dl Kodak	189/187/223	sublimation vers 160—70° polygones
Tyrosine l — Kodak	240/245/240	sublimation vers 240° aiguilles radiées, en forme de fil barbelé

L'expérience acquise nous permettra peut-être d'apporter certaines améliorations à ce mode opératoire.

Jusqu'ici les indications relevées sur le comportement des sublimés ne constituent pas de critères meilleurs pour l'identification des acides étudiés. — Nous avons envisagé l'étude des eutectiques que les acides aminés et d'autres substances formeraient entre eux, dans le but de trouver de nouveaux critères de caractérisation.

Essais d'identification des acides aminés par la température de fusion de leurs eutectiques.

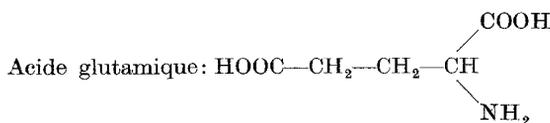
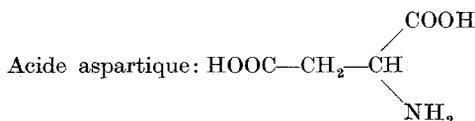
Les essais sont réalisés sur les acides aminés mélangés entre eux ou bien à des substances organiques de caractères fonctionnels différents. L'étude du comportement de ces mélanges à la fusion se réalise en mélangeant et broyant entre deux lames porte-objet des quantités égales des deux substances. Une petite portion de ce mélange est utilisée pour chaque mesure.

Les essais d'orientation se réalisent au *bloc chauffant*. Après avoir étalé la préparation sur un intervalle convenable, on note la température du début de fusion où coexistent les deux phases (limite solide-liquide/solide). C'est la température de fusion eutectique du mélange. Les résultats de ces mesures sont précisées au *microscope à plaque chauffante*. Une petite portion du mélange, placée entre lame et lamelle, est déposée sur la plaque chauffante qui se trouve à une température inférieure d'environ 50° C à la température présumée de l'eutectique, préalablement déterminée au bloc chauffant. La vitesse de chauffe adoptée alors est de 4 degrés par minute. On note la température du début de fusion. Les lectures se font en lumière ordinaire.

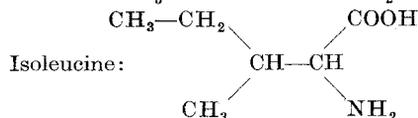
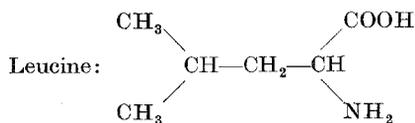
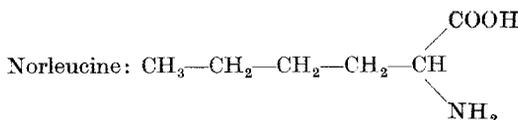
Un autre procédé est utilisé pour l'étude des eutectiques sous le microscope. C'est celui du contact, décrit dans l'ouvrage de *L. et A. Kofler*^A. Les observations se font alors en lumière polarisée, entre nicols croisés. La nécessité d'effectuer une fusion et recristallisation des deux substances, avant l'examen au microscope, ne permet pas l'application de ce dernier procédé dans le cas des acides aminés, décomposables à la fusion.

On a choisi pour l'examen des constantes les trois groupes suivants qui se retrouvent dans presque toutes les séparations. Ces acides à structure moléculaire très semblable se retrouvent en général groupés dans les hydrolysats. La méthode chromatographique a contribué fortement à leur séparation³.

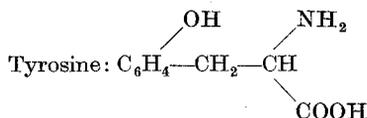
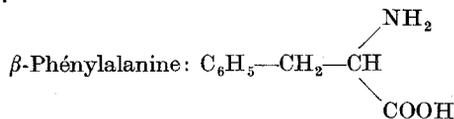
1er groupe:



2ème groupe:



3ème groupe:



Les trois tableaux ci-dessous donnent les résultats obtenus dans la recherche des eutectiques pour les trois groupes cités plus haut.

De l'examen du premier tableau, il ressort:

- Que les températures de fusion des eutectiques apparaissent plus typiques que les températures de fusion des acides aminés purs.
- Que les températures de fusion des eutectiques sont en général décelables à 1° C près.
- Qu'il y a moyen de caractériser les deux acides de ce 1er groupe par leurs *eutectiques binaires* avec les substances suivantes: β -alanine, hydroquinone, thiourée, salophène, acide hippurique, saccharine, atophan.
- Qu'une régression de la fusion au bloc chauffant s'observe souvent. Ceci étant dû à l'instabilité des acides aminés.

Il faut attirer l'attention sur le fait que la mesure faite au bloc chauffant est souvent plus élevée que celle faite au microscope. En conséquence, certains résultats obtenus au microscope peuvent échapper au bloc chauffant. Tels les eutectiques obtenus avec le salophène, la saccharine. Ceci met en évidence la nécessité de combiner les deux techniques.

De l'examen du deuxième tableau, il ressort:

- Qu'il y a moyen de caractériser les trois acides de ce 2ème groupe par leurs *eutectiques binaires*.
- Que les températures de fusion des eutectiques sont en général décelables à 1° C près.
- Que pour différencier les trois acides les uns des autres, on a à sa disposition les eutectiques formés avec les substances suivantes: urée, acide diiodohippurique, 2,4-dinitro-phénylhydrazine. Pour caractériser l'isoleucine on peut utiliser les eutectiques formés avec le mannitol et la thiourée.

Il est possible de combiner les renseignements recueillis dans ce tableau dans le but d'identifier un des trois acides de ce 2ème groupe.

De l'examen du troisième tableau, il ressort:

- Que les températures de fusion des eutectiques sont en général décelables à 1° C près.

Température de fusion des eutectiques.
Groupe acide aspartique dl (Kodak)-acide glutamique l + (Kodak).

Substances formant eutectiques binaires avec les ac. aminés T. F. ° C: bloc micr.	Acide aspartique dl T. F. ° C: bloc: > 260 micr.: > 310 eutect. binaires: T. F. ° C:		Acide glutamique l + T. F. ° C: bloc: 218—193 micr.: 194 eutect. binaires: T. F. ° C:	
	bloc	micr.	bloc	micr.
Ac. malonique 134,5 131—136	117/117	102/99/98/99	peu net env. 90/env. 96	accident au thermomètre
Ac. succinique 188 188	185/185	180/177/177	181/180/181	171/171/171
Ac. tartrique 171 164—171	150/149	142/143/141	141/140	135/135/135
Glycocolle déc. 240	régression et déc. 209/210	202/202/202,5 déc.	—	—
β -Alanine 194—191 194	régression de 165 à 155	156,5/156/ 155,5	régression de 190 à 170	164/163,5/ 163/163
Ac. ε -amino-caproïque 215 déc. 205	162/160/160	141/145/148 peu net	162/163/163	155/154,5/154
Hydroquinone 173 173	—	—	—	170/166/166/ 167/170/166/ 170
Ac. p-hydroxybenzoïque 217 214	—	—	—	187/184/182/ 182
Urée 134,5 135	129/129/129/ 128,5/129	126/126/126	128/130/130/ 130/130	126/126/126
Thiourée 179 174—178,5	—	—	—	168,5/170/169
Dicyandiamide 210 210—212	déc. et régression	172/171/170,5 171,5/168/169 169/168	déc. et régres- sion de 187 à 177	167/167,5/167 162?/déc. Kofler: 169
Salophène 190 190	—	—	—	187/187/187 187/ Kofler: 187
Ac. hippurique 190 184—190	—	—	183/183/184/ 184/185/185/ 185,5 peu net	175/175/174,5 175,5
Ac. diiodohippurique 222 209—218	—	—	régression de 220 à 185	187/191/188/ 189/185/peu net
Saccharine 228 228	—	222/218/219/ 218	—	187/186/185/ 185
Atophan 212 202—213	—	—	—	190/190/189/ 188,5/189,5
Diméthylglyoxime subl. 234	—	219? forte sublimation	—	198/190/191? forte sublim.

Température de fusions des eutectiques.
Groupe norleucine dl, leucine dl, isoleucine dl (Kodak).

Substances formant eutectiques binaires avec les ac. aminés T. F. ° C: bloc	Norleucine dl T. F. ° C: bloc: > 260 micr.: ± 250 déc. eut. bin. T. F. ° C:		Leucine dl T. F. ° C: bloc: subl. eut. bin. T. F. ° C:		Isoleucine dl T. F. ° C: bloc: subl. eut. bin. T. F. ° C:	
	bloc	micr.	bloc	micr.	bloc	micr.
Glucose 146		135		138/139		136/138
Lactose 201		165/166		162/164		164,5 163,5/163,5 164
Mannitol 168						
Ac. salicylique 154,5—157		145/144/141	152/152/152/ 151,5	145/140/135/ 134/146 peu net	149/149,5/ 148,5	131/140/140/ 140 peu net
Ac. p-hydroxybenzoïque 214		189	208/208,5 déc.	(189) 205 (189) 205	régression 212/ 212/213/213	—
Urée 134,5 135				123/123/123		126/126
Thiouée 174—178,5					174/174	168/168
Dicyandiamide 210—212	192	183/189	203/203/203,5/ 203,5	194/192/192	187/187/187/ 188/188,5/ 188,5	190/189 mesures incertaines
Salicylamide 135—141			134/135,5/ 135,5			—
Ac. hippurique 184—190	176	170	180/180/180/ 180,5/178,5	173/173/174	173/173/173/ 174/174/174,5	169/169/168
Ac. diiodohippurique 209—218	206	200/197/197	209/209/209	203/203/204	198/198/198	190/190/190/ 192
Chloracétamide 118—116 116			116 et régression	110/109/109 peu net	régression de 100 à 95	très peu net
Saccharine 228	192	186	207/207/207,5/ 208 régr. → 200	191/188/187/ 187,5	185/185/185/ 186/186/186 régr. → 181	175/172/172/ 171
Atophan 202—213					207/207/207,5/ 208	—
2,4-dinitrophénylhydrazine 195—202		179/175	200/200/201/ 201 pas net	189/185/187		184/184

Température de fusion des eutectiques.
Groupe β -phénylalanine dl (Kodak)-tyrosine l — (Kodak).

Substances formant eutectiques binaires avec les ac. aminés T. F. ° C: bloc micr.	β -Phénylalanine dl T. F. ° C: bloc: env. 250 micr.: 220 déc. eutect. binaires: T. F. ° C:		Tyrosine l — * T. F. ° C: bloc: micr.: 245 déc. eutect. binaires: T. F. ° C:	
	bloc	micr.	bloc	micr.
Ac. oxalique** 189		130/129/129	env. 94	72/69/69/71/ 70/68,5/69/71
Ac. malonique 134,5 131—136	102/100/99	105/105/103	124/125	121/119/119
Ac. succinique 188 188	163/163	159/158/158,5	—	182/185/182/ 183
Ac. tartrique 171 164—171	142/140	130/129/126/ 130	161/161	156/156
Ac. ascorbique 192 186—193	env. 160	159/159/160	env. 184	180/181/181
Ac. o-hydroxy- benzoïque 161 154,5—157	149/149/149,5/ 149,5/150	140/139/139	—	—
Ac. p-hydroxy- benzoïque 217 214	—	202/197/197/ 197	—	208/208/207
Urée 134,5 135	130/130	125/124/124	—	—
Thiourée 179 174—178,5	175/176/175	166/163/163	—	—
Dicyandiamide 210 210—212	régression de 200 à 195, déc.	183,5/183/183	—	201/201/200,5/ 199,5/déc.
Ac. hippurique 190 184—190	177/177/177/ 177/178/178	159/158/160	—	—
Ac. diiodohippurique 222 209—218	197/198/198	184/186/185	—	—
Saccharine 228 228	189/189/189/ 190/190/légère régression	176/172/172/ 172/peu net sublimation	—	215/217/216
Diiodoxyquinoléine > 310	env. 210	187/187/187	—	—
2,4-dinitrophényl- hydrazine 204 195—202	régression de 202 à 180	177/179/177/ 180/peu net	—	197/197/196

* Éviter le contact de l'humidité au cours des manipulations.

** Sublimier l'acide oxalique avant la préparation de l'eutectique.

—Qu'il y a moyen de caractériser les deux acides de ce 3ème groupe par leurs *eutectiques binaires* avec les substances suivantes: acides oxalique, malonique, succinique, tartrique, ascorbique, o et p-hydroxybenzoïque, urée, thiourée, acides hippurique et diiodhippurique, diiodoxyquinoléine.

Conclusions.

Ce travail est une première contribution à l'étude des *constantes physiques à la fusion* des acides aminés purs.

Plusieurs fonctions ont été opposées à quelques acides aminés dans le but d'obtenir des *eutectiques* permettant de les identifier.

Il ressort de l'examen des résultats, qu'il est possible de différencier des acides aminés d'un même groupe à l'aide de la température de fusion de leurs eutectiques lue au microscope et au bloc chauffant.

Ces résultats résolvent simplement et avec précision un problème de l'analyse fonctionnelle sans recourir à la formation de dérivés.

Les eutectiques signalés sont intéressants pour le contrôle de pureté de ces acides aminés.

Les résultats doivent être complétés par une investigation quantitative qui permettrait le dosage d'acides aminés en mélanges et le microdosage de contaminations d'acides entre eux.

Le travail se poursuit par l'étude des indices de réfraction à différentes températures et par l'étude des densités.

D'autres acides aminés seront examinés.

Remerciements.

Je tiens à remercier ici le Fonds National de la Recherche Scientifique pour les subsides qui m'ont été accordés et qui ont permis la réalisation de ce travail.

J'exprime ma gratitude à Mlle. *A. Lacourt*, Directrice du Service Universitaire de Microchimie de l'Université de Bruxelles, pour les facilités et les conseils qu'elle m'a donnés au cours de ces recherches, ainsi que pour le matériel et les produits qu'elle a mis à ma disposition.

Je remercie encore Mlle. *Claudine Francotte*, Licenciée en Chimie, Mlle. *Claire Dussart* et Mr. *Marcel Debrus*, étudiants en Pharmacie, pour leur collaboration.

La Compagnie Liebig d'Anvers a offert gracieusement quelques échantillons d'acides aminés; je l'en remercie.

Résumé.

Les constantes physiques à la fusion sont préconisées comme moyen d'identification des acides aminés.

Les méthodes microchimiques de *Kofler* ont permis d'obtenir des résultats. L'étude des températures de fusion des acides aminés purs

a révélé une amélioration des données de la littérature, sans toutefois permettre de préconiser cette constante comme moyen d'identification.

Les températures de fusion des eutectiques ont donné des résultats plus encourageants. Des valeurs définies ont été obtenues qui pourraient être utilisées pour l'identification de chaque individu. La netteté des lectures et la précision des mesures sont très satisfaisantes.

Zusammenfassung.

Die physikalischen Konstanten von Aminosäure-Schmelzen wurden zur Identifizierung dieser Substanzen vorgeschlagen. Mit Hilfe der *Koflerschen* Mikromethoden durchgeführte Untersuchungen der Schmelztemperaturen reiner Aminosäuren führten zwar zu einer Verbesserung der in der Literatur angegebenen Werte, ohne daß jedoch diese Kennzahlen zur Identifizierung solcher Verbindungen empfohlen werden könnten. Die Schmelzpunkte eutektischer Gemische geben besser verwertbare Resultate. Es konnten gut definierte Werte beobachtet werden, die sich zur Identifizierung jeder einzelnen Verbindung dieser Reihe verwenden lassen. Die Eindeutigkeit und Genauigkeit der Messungen ist durchaus befriedigend.

Summary.

Physical constants are recommended as means of identifying amino acids. With the micro *Kofler* methods the melting temperature of these compounds is more accessible than previously. Better, however, are the melting temperatures of eutectics to identify amino acids. The accuracy of the readings is very satisfactory.

Bibliographie.

- ¹ *L. Velluz*, Substances naturelles de synthèse. Paris: Masson et Cie. 1951.
- ² *N. D. Cheronis* et *J. B. Entrikin*, Semimicro Qualitative Organic Analysis. p. 271, 416. New York: Th. Crowell Co. 1947.
- ³ *L. Zechmeister*, Progress in Chromatography 1938—1947. p. 139. London: Chapman & Hall. 1950. *A. J. P. Martin*, Endeavour 6, 21 (1947).
- ⁴ *L. et A. Kofler*, Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Innsbruck: Wagner. 1948.
- ⁵ *A. Lacourt*, J. Pharmacie Belgique, n° 1 & 2, janvier-février 1952. Industrie chimique Belge 17, 217 (1952). Revue de médecine et de pharmacie (Belgique), Section de Pharmacie, n° 1, 1952.
- ⁶ *M. Polonovsky*, Biochimie médicale. p. 101. Paris: Masson et Cie. 1948.
- ⁷ *C. D. Hodgman*, Handbook of Chemistry and Physics. Cleveland, Ohio: 1947.
- ⁸ *S. Gabriel* et *Th. A. Maass*, Ber. dtsch. chem. Ges. 32, 1269 (1899).