

Über den alkalischen Abbau von Ligninsulfosäuren aus Freudenberg's DHP und Brauns Nativ-Lignin

Von

K. Kratzl und G. Hofbauer

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingelangt am 16. August 1956)

Es wurden *Brauns-Nativ-Lignin* (BNL) und ein Dehydrierungspolymerisat nach *Freudenberg* (DHP) — beide auch nach Sulfittierung — sowie Fichtenligninsulfosäure anaerob alkalisch hydrolysiert. Die gebildeten Carbonylverbindungen (Vanillin, Acetovanillon, Acetaldehyd, Formaldehyd) wurden quantitativ bestimmt und zwischen BNL und DHP bemerkenswerte Ähnlichkeit festgestellt. Diese Versuche im Mikromaßstab werden zu Untersuchungen an radioaktiven Implantaten verwendet.

Zu den wichtigsten Abbaureaktionen, welche die Ligninähnlichkeit eines Stoffes beweisen¹, zählt die von uns² gefundene spezifische Spaltbarkeit eines (allerdings kleinen) Teiles der Ligninsulfosäure zu Vanillin-Acetaldehyd und Acetovanillon-Formaldehyd mittels Alkali. Die Reaktion ist insoweit charakteristisch, als kein anderes Ligninderivat alle diese Abbauprodukte ergibt.

Die Vanillin-Acetaldehyd-Bildung erfolgt nach bereits früher publizierten Arbeiten² hauptsächlich dadurch, daß aus einer — infolge Maskierung — alkalistabilen Bindung durch den Sulfittierungsprozeß eine Sulfosäure vom reversibel spaltbaren Aldoltyp gebildet wird, aus der dann bei Behandlung mit starkem Alkali die Hauptmenge des Vanillins und Acetaldehyds entsteht. Unsulfittiertes Lignin enthält kleine Mengen freier (unmaskierter) Coniferylaldehydgruppen, die durch die *Wiesner-*

¹ K. Kratzl, Mikrochim. Acta (Wien) 1956, 159.

² K. Kratzl, Mh. Chem. 78, 173 (1948). — K. Kratzl und F. Rettenbacher, Mh. Chem. 80, 622 (1949).

sche Farbreaktion³ nachweisbar sind und mit schwachem Alkali³ in dem entsprechenden Ausmaß ebenfalls Vanillin-Acetaldehyd liefern. Aber auch Ligninsulfosäure, die an sich keine Färbung mit Phloroglucin-Salzsäure gibt, zeigt, nach wenigen Minuten schwach alkalischer Behandlung bei Zimmertemperatur, eine positive *Wiesner*-Reaktion³. Es wurden also durch die Lauge Coniferylaldehydgruppen regeneriert. *Adler*³ hat somit aus einem Ligninsulfosäurepräparat auf zwei Wegen Vanillin-Acetaldehyd erhalten: einerseits durch Behandlung mit verdünntem Alkali den (kleineren) Anteil, welcher den freien Coniferylaldehydgruppen entspricht, andererseits ein Mehrfaches an denselben Abbauprodukten durch stark alkalische Hydrolyse. Es ist wahrscheinlich, daß bei beiden Spaltungsvorgängen prinzipiell ähnliche Systeme (A, reversibler Aldoltyp der polymeren Hydroconiferylaldehydsulfosäure) erfaßt, bzw. durchlaufen werden, wenn auch deren eindeutige Formulierung durch Reaktionsgleichungen noch offen bleibt.

A



Nach den Vorstellungen *Freudenbergs*⁴ wird Lignin durch enzymatische Dehydrierung des Coniferylalkohols gebildet. In vitro führt dies zu einem „Dehydrierungspolymerisat“ (DHP), wobei als Zwischenprodukte (von obigem Autor isoliert) Verbindungen einer höheren Oxydationsstufe des Coniferylalkohols auftreten. In vivo muß ebenfalls eine solche Oxydation (wahrscheinlich zum Guajacylglycerintyp, *Freudenbergs* Verbindung III⁴) stattfinden, wie unsere Versuche mit ¹⁴C-Coniferinimplantaten beweisen⁵. Ein anderes dieser Oxydationsprodukte, der Coniferylaldehyd (Typ IV der Reihe *Freudenbergs*⁴), ist mittels Farbreaktion noch im Endprodukt (DHP) qualitativ nachweisbar (Endgruppe?).

In der vorliegenden Arbeit haben wir nun diese Gruppen durch alkalische Spaltung bestimmt und außerdem, wie beim Lignin, nach Sulfittierung eine Zunahme der Ausbeute der Spaltprodukte auf ein

³ *E. Adler*, *K. T. Björkquist* und *S. Häggroth*, *Acta Chem. Scand.* **2**, 93 (1948). — *E. Adler* und *S. Häggroth*, ebenda **3**, 86 (1949). — *E. Adler*, XIIth Inter. Congress of Pure and Applied Chemistry, Referatenband, S. 614. New York. 1951.

⁴ *K. Freudenberg*, *Angew. Chem.* **68**, 84 (1956). — *K. Freudenberg* und *H. Schlüter*, *Chem. Ber.* **88**, 617 (1955).

⁵ *K. Kratzl*, *G. Billek* und *W. Schweers*, XIV. Inter. Kongreß für reine und angewandte Chemie, Referatenband, S. 377. Zürich. 1955. — *K. Kratzl*, *G. Billek*, *W. Schweers*, *A. Graf*, *G. Hofbauer*, *K. Buchtela* und *E. Klein*, *Angew. Chem.* **68**, 384 (1956).

Mehrfaches festgestellt. Zum Vergleich wurde außer der bereits untersuchten Ligninsulfosäure (Chinolinfällung aus technischer Ablauge) auch BNL herangezogen, das, wie andere ungeformte Lignine (Aceton-, Dioxanlignin usw.), ein DHP-ähnliches Produkt darstellt. Eine genaue Übereinstimmung der analytischen Werte war allerdings nicht zu erwarten, denn einerseits gleicht das DHP nicht ganz dem Lignin (Doppelbindungen, Phenolgruppen), andererseits enthält BNL bedeutende Mengen Hydroxymatairesinol, ein Lignan, das im DHP zu fehlen scheint⁶. Auch ist die Darstellung der Präparate schwer zu normen. Die Ausbeuten an Spaltprodukten sind aber recht gut reproduzierbar und zeigen, daß DHP bei der Alkalibehandlung in sulfitiertem und unsulfitiertem Zustand Acetaldehyd- und Vanillinmengen derselben Größenordnung wie sulfitiertes⁷ und unsulfitiertes BNL ergibt (vgl. Tabelle 1, a und b).

Tabelle 1

	% der Einwaage				mg Acetaldehyd zu mg Formaldehyd	mg Vanillin zum Acetovanillon
	Acetaldehyd	Vanillin	Formaldehyd	Acetovanillon		
	a	b	c	d		
500 mg Ligninsulfosäure:						
(11,9% OCH ₃) I	1,21	4,20	0,034	0,23	36 : 1	18,5 : 1
(11,9% „) II	1,19	4,16	0,029	0,24	40 : 1	17,2 : 1
500 mg Brauns-Nativ-Lignin:						
(14,9% OCH ₃)	0,14	1,49	0,039	0,12	3,4 : 1	13,0 : 1
(14,9% „) sulfitiert I .	0,96	5,18	0,029	0,33	34 : 1	15,7 : 1
(14,9% „) „ II .	1,02	5,30	0,034	0,28	30 : 1	10,2 : 1
500 mg DHP:						
(16,7% OCH ₃)	0,21	1,64	0,023	0,10	9,0 : 1	16,8 : 1
(16,7% „) sulfitiert I .	0,87	5,38	0,022	0,15	39 : 1	35,3 : 1
(16,7% „) „ II .	0,92	5,70	0,025	0,17	36 : 1	33,3 : 1

Im weiteren wurde der Nachweis erbracht, daß bei der alkalischen Hydrolyse dieser Stoffe auch Acetovanillon und Formaldehyd gebildet werden. Die Abspaltung von Acetovanillon aus Ligninsulfosäure wurde erstmalig von *Hibbert*⁸, der gleichzeitig auftretende Formaldehyd von uns⁹ nachgewiesen. Nach Modellversuchen¹⁰ ist diese Reaktion möglicherweise auf endständige Sulfo- bzw. Hydroxygruppen rückführbar (B).

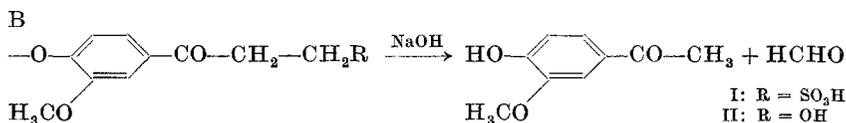
⁶ K. Freudenberg, Privatmitteilung.

⁷ K. Kratzl und I. Keller, Mh. Chem. 83, 197, 205 (1952).

⁸ H. Hibbert und F. Leger, J. Amer. Chem. Soc. 60, 565 (1938).

⁹ K. Kratzl, Mh. Chem. 80, 314 (1949).

¹⁰ Dissertation I. Keller, Universität Wien (1950).



Trotz der vermutlichen Zusammengehörigkeit von Formaldehyd und Acetovanillon ist eine stöchiometrische Übereinstimmung natürlich genau so wenig wie bei den Vanillin-Acetaldehyd-Ausbeuten zu erwarten, da die Bildungsreaktionen in stark alkalischem Medium stattfinden und daher nur eine konventionelle Bestimmung erlauben. Bemerkenswert ist, daß BNL und DHP auch in unsulfitiertem Zustand kleine Mengen Acetovanillon und Formaldehyd ergeben (vgl. Tabelle 1, c und d). Man könnte hier an endständige Ketoalkohole (B, II) denken. Durch Sulfitierung steigt nur bei BNL die Ausbeute an Acetovanillon auf das Dreifache. Die Formaldehydwerte bleiben ungefähr gleich. Die Ligninsulfosäure ergibt größere Mengen dieser Spaltprodukte, die aber auch hier an die allgemein viel höheren Vanillin-Acetaldehydausbeuten^{2, 10} nicht heranreichen (vgl. Tabelle 1, e und f). Durch den großen Vanillinüberschuß werden die Acetovanillonwerte etwas unsicher (siehe exper. Teil).

Trotz dieser Einschränkung machen die aufgefundenen Mengenverhältnisse eine Zusammengehörigkeit von Acetovanillon und Formaldehyd wahrscheinlich. Es dürfte also nicht nur das Vanillin-Acetaldehyd-liefernde System in BNL und DHP gleichartig sein, sondern auch das Acetovanillon-Formaldehyd bildende.

Ähnliche Versuche mit radioaktiven Implantaten, die unter anderem den Übergang von ¹⁴C-Coniferylalkohol in eine höhere ligninartige Oxydationsstufe beweisen sollen, sind in Arbeit.

Experimenteller Teil

In Hinblick auf weitere Arbeiten wurden solche Methoden zur Bestimmung von Acetaldehyd, Formaldehyd, Vanillin und Acetovanillon gewählt, die beim Einsatz von höchstens 0,5 g Ausgangsmaterial noch Werte von befriedigender Genauigkeit geben.

Zur Verwendung kamen dialysierte chinolingefällte¹¹ Ligninsulfosäure (11,9% OCH₃) aus technischer Sulfitablauge, *Brauns*-Lignin (BNL) (14,9% OCH₃)¹² und selbst hergestelltes DHP (16,7% OCH₃). Die beiden letzteren wurden zunächst in völlig gleicher Weise sulfitiert.

Sulfitierung

0,5 g BNL oder DHP wurden mit 0,7 g NaOH in 50 ml Wasser gelöst, 2,5 g SO₂ eingeleitet und im Einschlußrohr über Nacht stehen gelassen. In einem Luftthermostaten wurde unter Schütteln innerhalb von 2 Stdn. die Temperatur auf 130° ansteigen gelassen. Die (meist schon klare) Lösung

¹¹ K. Freudenberg und F. Sohns, Ber. dtsch. chem. Ges. **66**, 262 (1933).

¹² Wir danken Herrn Prof. Brauns für die Überlassung des Präparats.

wurde weitere 3 Stdn. bei der angegebenen Temperatur bewegt. Durch diese Variante der früher beschriebenen Methode⁷ wurden Zusammenballungen vermieden und dadurch die Reaktionszeit um zwei Drittel herabgesetzt. DHP reagiert etwas rascher als BNL. Beide Stoffe geben klare honiggelbe Lösungen, aus denen man mit Stickstoff den SO₂-Überschuß vertreibt. Nach Neutralisation werden noch 12 g NaOH zugegeben und sofort hydrolysiert.

Die Hydrolyse

Die verwendete Apparatur entspricht im wesentlichen der bei *K. Kratzl* und *F. Rettenbacher* angegebenen². Das Destillat wird in einem 50-ml-Meßkolben aufgefangen, der Gasstrom (reiner N₂) noch durch 2 Waschvorlagen mit je 30 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (2,5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 50 ml konz. H₂SO₄ in 1 l Wasser) geleitet.

In völlig gleicher Weise wurden hydrolysiert: Je 0,5 g Ligninsulfosäure, BNL und DHP mit je 12 g NaOH in 50 ml Wasser, ferner die oben beschriebenen sulfitierten BNL- und DHP-Lösungen. Nach Spülen der Apparatur mit Stickstoff und Erhitzen auf 140° Badtemperatur wird der Gasstrom so eingestellt, daß in je 2 Stdn. genau 50 ml abdestillieren. Konstanthaltung von Destillationsgeschwindigkeit und Flüssigkeitsniveau im Reaktionskolben sind wichtig, da ja bei der Gewinnung aliphatischer Aldehyde aus der alkalischen Lösung Bildungs- und Kondensationsgeschwindigkeit miteinander konkurrieren. In 8 Stdn. werden 4mal 50 ml Destillat gewonnen, sodann die Hydrolyse abgebrochen. Von den 2,4-Dinitrophenylhydrazinvorlagen zeigte nur die 1. eine Fällung.

Aufarbeitung der Vorlagen: Bei obigen Bedingungen ist die Hauptmenge des Acetaldehyds neben der *gesamten* (geringen) Formaldehydausbeute in den Meßkolbenvorlagen; der Acetaldehydrest in der ersten 2,4-Dinitrophenylhydrazinvorlage. Diese Tatsache wurde durch einige Versuche überprüft:

1. Die papierchromatographische Trennung der 2,4-Dinitrophenylhydrazinfällung mit methanolgesättigtem Heptan (wasserfrei)¹³ zeigte keinen Formaldehyd. Wie eine Versuchsreihe ergab, ist bei dieser Methode noch 1 Teil Formaldehydhydrazon neben 25 Teilen Acetaldehydhydrazon sichtbar.

2. Zwischen Meßkolben und Waschvorlage wurden zwei mit flüssiger Luft gekühlte Kühlfallen eingeschaltet und 8 Stdn. hydrolysiert. Die Waschvorlagen zeigten keine Fällung, im Kühlfalleninhalt konnte mit Chromotropsäure kein Formaldehyd festgestellt werden.

3. Wurde nach dem Meßkolben eine Waschflasche mit Chromotropsäurelösung vorgelegt, so trat während der 8stünd. Hydrolyse nur allmählich Braunfärbung auf.

Fängt man das Destillat in einer mit Wasser beschickten Waschflasche auf und läßt den Gasstrom durchperlen, so erhält man in einer anschließenden Chromotropsäurevorlage eine schwach violettbraune Färbung.

Die obigen Ergebnisse finden ihre Erklärung wohl darin, daß Formaldehyd wasserlöslicher als Acetaldehyd ist, und bei den äußerst geringen Formaldehydmengen die Mitführung durch den Gasstrom bei der gewählten Versuchsanordnung keine Rolle spielt.

¹³ *D. F. Meigh*, Nature **170**, 579 (1952).

Formaldehydbestimmung

Die Chromotropsäuremethode¹⁴ eignet sich für sehr verdünnte Lösungen mit überwiegender Acetaldehydgehalt erst in folgender Abänderung: Je 10 ml Destillat werden aus dem 50-ml-Meßkolben in eine Lösung von 110 mg chromotropsaurem Natrium in 5 ml Wasser pipettiert, und diese Mischung unter gutem Schwenken in ein kaltes Gemisch von 60 ml Schwefelsäure ($D = 1,84$) und 25 ml Wasser einfließen gelassen. Anschließend wurde in einem siedenden Wasserbad 30 Min. erhitzt, abgekühlt und in einem Meßkolben auf 100 ml aufgefüllt. Die Extinktion wurde bei 20° in einer 100-ml-Küvette (34,20 mm Schichtdicke) mittels eines *Lange*-Kolorimeters bei 578 $m\mu$ gegen Wasser gemessen. Die Aufnahme von Eichkurven folgte in analoger Art nach Messungen an verdünnten Formaldehyd- und Acetaldehydlösungen, deren Gehalt man mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin gravimetrisch bestimmt hatte. Bei der verwendeten gelben Quecksilberlinie beeinflusst der zu erwartende Acetaldehydgehalt den Blindwert der reinen Chromotropsäure-Schwefelsäurelösung fast nicht. (Ergebnisse in Tabelle 2.)

Tabelle 2

	γ Formaldehyd in je 2 Stunden				Formaldehyd in 8 Stunden		
	0.—2.	2.—4.	4.—6.	6.—8.	mg	10^{-5} M	% Ald. bez. auf Ges. OCH_3
500 mg Ligninsulfosäure:							
(11,9% OCH_3) I	99	48	17	5	0,169	0,56	0,28
(11,9% „) II	88	42	12	5	0,147	0,49	0,25
500 mg <i>Brauns</i> -Nativ-Lignin:							
(14,9% OCH_3)	146	37	15	0	0,198	0,66	0,27
(14,9% „) sulfitiert I	113	22	8	0	0,143	0,48	0,19
(14,9% „) „ II	125	31	14	0	0,170	0,57	0,23
500 mg DHP:							
(16,7% OCH_3)	76	24	15	0	0,115	0,38	0,14
(16,7% „) sulfitiert I	69	31	12	0	0,112	0,37	0,13
(16,7% „) „ II	97	21	8	0	0,126	0,42	0,15

Acetaldehydbestimmung

Die Aldehyde in den restlichen 40 ml jedes Meßkolbens wurden als 2,4-Dinitrophenylhydrazone gravimetrisch bestimmt, auf 50 ml umgerechnet, die Summe zur Ausbeute der Waschvorlage addiert und der als Hydrazon berechnete Formaldehyd abgezogen. Eine Berechnung der in je 2 Stdn. übergehenden Acetaldehydmenge war hier natürlich nicht möglich, da die Waschvorlage wegen der zu geringen Fällung während der gesamten Hydrolysendauer nicht gewechselt wurde (Tabelle 3).

¹⁴ C. F. Bricker und H. R. Johnson, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. 17, 400 (1945). — C. N. Satterfield, P. E. Wilson, D. M. Le Clair und R. C. Reid, Analyt. Chemistry 26, 1792 (1954).

Tabelle 3

	Acetaldehyd in 8 Stunden		
	mg	10 ⁻⁵ M	% Ald. bez. auf Ges. OCH ₃
500 mg Ligninsulfosäure:			
(11,9% OCH ₃) I	6,06	13,8	10,18
(11,9% „) II	5,93	13,5	9,97
500 mg Brauns-Nativ-Lignin:			
(14,9% OCH ₃)	0,68	1,55	0,91
(14,9% „) sulfitiert I	4,81	10,9	6,46
(14,9% „) „ II	5,12	11,6	6,87
500 mg DHP:			
(16,7% OCH ₃)	1,04	2,36	1,25
(16,7% „) sulfitiert I	4,34	9,9	5,20
(16,7% „) „ II	4,59	10,4	5,50

Vanillinbestimmung

Die alkalische Lösung im Reaktionskolben wurde mit Salzsäure neutralisiert, bikarbonatalkalisch gemacht und 36 Stdn. mit Äther extrahiert. Der Extrakt wurde auf 25 ml aufgefüllt. Für die Vanillinbestimmung wurden 10 ml verwendet. Das Pipettieren der Ätherlösung gelingt ohne nachweisbaren Verlust, wenn man einen Schliffhahn an die Pipette ansetzt und dadurch diese nicht mehr berühren muß. Nach Vertreiben des Äthers wird mit 5 ml Wasser aufgenommen und 50 mg m-Nitrobenzhydrazid¹⁵, in 5 ml heißem

Tabelle 4

	Vanillin			Acetovanillon		
	mg	10 ⁻⁵ M	% OCH ₃ bez. auf Ges. OCH ₃	mg	10 ⁻⁵ M	% OCH ₃ bez. auf Ges. OCH ₃
500 mg Ligninsulfosäure:						
(11,9% OCH ₃) I	21,0	13,8	7,19	1,137	0,69	0,36
(11,9% „) II	20,8	13,7	7,13	1,212	0,73	0,38
500 mg Brauns-Nativ-Lignin:						
(14,9% OCH ₃)	7,5	4,9	2,05	0,575	0,35	0,14
(14,9% „) sulfitiert I	25,9	17,0	7,09	1,650	0,99	0,41
(14,9% „) „ II	26,5	17,4	7,25	1,400	0,84	0,35
500 mg DHP:						
(16,7% OCH ₃)	8,2	5,4	2,00	0,488	0,29	0,11
(16,7% „) sulfitiert I	26,9	17,7	6,57	0,745	0,45	0,17
(16,7% „) „ II	28,5	18,8	6,96	0,855	0,52	0,19

¹⁵ K. Kratzl, V. Schuller-Götzburg und H. Silbernagel, Mh. Chem. 86, 251 (1955).

Wasser gelöst, hinzugegeben und mit 1 Tropfen Essigsäure angesäuert (pH = 6). Nach 12 Stdn. wird abgesaugt und gewogen. Ergebnisse in Tabelle 4.

Acetovanillonbestimmung

Der *qualitative Acetovanillonnachweis* erfolgte papierchromatographisch. Nach der Methode von Bland und Stamp¹⁶ wurde Schleicher & Schüll-Papier 2043 b mit 0,05 m Boraxlösung imprägniert, getrocknet und eine Probe der Ätherlösung aufgetragen. Nach Sättigung in einer Wasserdampf-atmosphäre wurde absteigend 5 Stdn. mit Methanol: Benzol: Wasser 7: 7: 10 entwickelt und die Vanillin-Acetovanillon-Trennung durch die Fluoreszenz im UV sichtbar gemacht.

Die *quantitative Acetovanillonbestimmung* ist der von Reaville und Shreve¹⁷ angegebenen ähnlich. 2 ml des Ätherextrakts werden in ein Glasröhrchen pipettiert, das mit seiner kapillaren Spitze auf dem Startpunkt eines Chromatographierpapiers (Schleicher & Schüll 2043 b) steht. Nach 10 Min. war das Röhrchen leer und wurde mit etwas Äther gespült. In 2,5 cm Entfernung von der so aufgetragenen Substanz wurde (senkrecht zur Laufrichtung) ein 1 cm breiter Streifen gezeichnet und auf diesem mit einem Pinsel eine heiß gesättigte Kaliummetabisulfitlösung aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde das Papier mit Längsschlitz versehen, die von der Startlinie bis fast zum Papierrand reichten und so die Laufbahnen trennten. Nun wurde genau 30 Min. über Wasser gesättigt und 4,5 Stdn. absteigend mit wassergesättigtem Di-n-butyläther entwickelt, getrocknet, mit Ammoniak beblasen und im UV der Acetovanillonfleck angezeichnet. Das Vanillin wird von der Kaliummetabisulfitbarriere zurückgehalten. Zum Eluieren mit Phosphatpufferlösung (pH 7,5) hat sich folgende Anordnung bewährt: Ein hakenförmig gebogenes Glasplättchen (3 × 5 cm), mit Chromatographierpapier belegt, hängt mit einem Ende in die Pufferlösung, und wirkt als Docht. Am anderen Ende wird mittels eines schmalen Glassteiges und 2 Klammern der ausgeschnittene Acetovanillonfleck so angeklemt, daß in der vom Glas bedeckten Überlappungszone noch keine eluierbare Substanz enthalten ist. Das Eluat läuft in einen 5-ml-Meßkolben. Das Ganze ist in einer wassergesättigten Atmosphäre. In 1 Std. ist der Kolben voll. Die Prüfung im UV auf Acetovanillonreste war danach stets negativ. Die Extinktion des Eluats wurde in einem Beckmann-DU-UV-Spektrophotometer bei 277 m μ gegen eine papierchromatographisch gewonnene Blindprobe gemessen. Die Eichwerte wurden nach derselben Methode festgelegt.

Die Acetovanillonwerte (Tabelle 4) sind noch etwas unsicher, da die Wirksamkeit der Kaliummetabisulfitbarriere nie völlig gleich ist, was bei dem vorhandenen großen Vanillinüberschuß zu Fehlern führen kann.

Der Österreichischen Gesellschaft für Holzforschung, die die Mittel für diese Arbeit bereitstellte, sei auch hier bestens gedankt.

¹⁶ D. E. Bland und C. Stamps, Austral. J. Appl. Sci. 6, 353 (1955).

¹⁷ E. T. Reaville und G. W. Shreve, Analyt. Chemistry 27, 565 (1955).