

S. ŠILHARD MIHALJEVIĆ,
B. ĐAKOVIĆ,
Z. RAMLJAK

ODREĐIVANJE UDJELA SLOBODNIH KARBOKSILNIH KISELINA I FENOLNO — LAKTAMSKIH SPOJEVA U NAFTOM ONEČIŠĆENOM OBRADIVOM TLU

Ispitana su dva uzorka tla onečišćena uzorkovana na poljoprivrednim površinama PIK Vinkovci. Uzorak 1 uzet je s dubine 0 — 30 cm, a uzorak 2 s dubine 180 — 200 cm.

Ekstrakcijom je iz uzoraka odvojena nafta u kojoj su određene slobodne karboksilne kiseline i fenolno — laktamske komponente. Dobivene frakcije okarakterizirane su infracrvenom spektrometrijom.

Nađeno je da uzorak 1 sadrži 0,6887 g kiselih **komponenata** na 1 kilogram izvornog tla, a uzorak 2 sadrži 0,0025 g kiselih **komponenata** na 1 kilogram izvornog tla.

DETERMINATION OF FREE CARBOXYLIC ACIDS AND PHENOLIC- LACTAMIC COMPONENTS FROM SOIL SAMPLES POLUTED BY PETROLEUM

Two samples of soil that has been polluted by petroleum were taken out of agriculture area PIK Vinkovci and examined. Sample No. 1 was taken from the depth of 0 — 30 cm and sample No 2 from the depth 180 — 200 cm.

In petroleum that was separated from the samples by method of extraction free carboxylic acids and phenolic-lactamic type components were determined and characterized by infrared spectroscopy.

It has been found that sample No 1 contained 0,6887 g acid components per kg of the original soil sample, and sample No 2 contained 0,0025 g acid components per kg of the original soil sample.

Sonja ŠILHARD-MIHALJEVIĆ, dipl. inž. kemije

Dr Zdravko RAMLJAK
Građevinski institut, J. Rakuše 1, 41000 Zagreb

Dr Branko ĐAKOVIĆ
Poljoprivredni institut, Kačićeva 9, 41000 Zagreb

Zna se da tlo ima visoki stupanj asimilacije i razgradnje različitih ostataka organskog porijekla koji mogu sadržavati i toksične komponente, jer tlo sadrži na milijune mikroorganizama u gramu tla (1), a naročito mnogo u oraničnom sloju. Prisustvo bilo kakvih organskih materija ili ostataka i toksičnih komponenata podliježe neminovno razgradnji kad se nađe u tlu.

Nafta i proizvodi nafte postaju sve češći agensi zagađivanja tla, iako postoje strogi propisi i mjere predostrožnosti da se tome izbjegne.

Zbog visoke molekularne težine, viskoziteta i kristaliničnosti ugljikovodika nafte, degradacija i biološka oksidacija ugljikovodika koji su ravnočlani, razgranati ili ciklički alkalni i aromatski spojevi, kad dođu u dodir s tlom, pokazuju izrazitu otpornost i izazivaju drastične promjene u mikrobiološkim, fizikalnim i kemijskim svojstvima tla. Rast vegetacije obično je spriječen, jer nafta istiskuje kisik iz pora tla i čini tlo anaerobnim.

Zagađivanja naftom i prirodnim plinom događa se u blizini naftnih izvora i poljoprivrednih površina preko kojih prolazi naftovod. Kad nafta zamijeni kisik u atmosferi tla rezultira snažna mikrobiološka aktivnost koja se očituje u proizvodnji supstance u reduciranom stanju. Od anorganskih elemenata to se odnosi na Fe i Mn koji prelaze u Fe (II) i Mn (II).

J. Rivière i C. Gatellier (2) ustanovili su da tla zagađena naftom pokazuju veću respiratornu aktivnost i dehidrogenizaciju. Populacija mikroba ne varira, ali nije ista, jer se povećava broj bakterija koje koriste ugljikovodične spojeve. To su bakterije roda *Pseudomonas*, a to je potvrđeno i laboratorijskim pokusima. Ove bakterije koriste N iz tla zagađenog naftom. Iza njih dolaze aerobni fiksatori koji koriste ugljikovodične spojeve kao izvor C i energije. To su bakterije roda *Arthrobacter*.

Postoje međutim satojci nafte koji se teško metaboliziraju, i dugotrajni su. To objašnjava sporu pojavu aktinomiceta, posebno iz roda *Nocardia*.

Ellis i Adams (3) utvrdili su da 60% oksidatora u tlu su vrste roda *Pseudomonas*, koje mogu rasti u širokom rasponu uvjeta i najčešće ih se nađe tamo gdje ima naftnih proizvoda.

Ch. Baldwin (3) ustanovio je također da bakterije, plijesni i gljive koje normalno pokazuju sposobnost da napadaju ugljikovodične spojeve, razvijaju tu sposobnost nakon duže kultivacije na hranjivom supstratu u prisustvu mineralnih ulja.

Na poljoprivrednim površinama PIK Vinkovci, dogodio se slučaj zagađivanja naftom na proizvodnoj površini. Na tom lokalitetu je neposredno poslije zagađivanja, izvršeno determiniranje intenziteta zagađenosti plošno i do dubine od 200 cm. Ujedno su uzeti uzorci tla iz dubine 0 — 30 cm i 180 — 200 cm. U tim uzorcima izvršeno je istraživanje udjela slobodnih karboksilnih kiselina i fenolno-laktamskih komponenata.

U Z O R C I

Uzorak 1: Naftom onečišćeni uzorak uzrokovan na obradivim površinama PIK Vinkovci. Uzorak je uzet na prosječnoj dubini od 0 — do 30 cm, a tamnosive je boje.

Uzorak 2: Naftom onečišćeni uzorak uzrokovan na obradivim površinama PIK Vinkovci. Uzorak je uzet na prosječnoj dubini od 180 do 200 cm, a sivožute je boje.

S H E M A I S P I T I V A N J A N A F T O M O N E Č I Š Ć E N O G U Z O R K A T L A

Nakon pregleda uzoraka i preliminarnih ispitivanja odlučeno je da se uzorci ispituju prema postupcima pokazanih na slici 1.

Postupak ispitivanja opisan shemom na slici 1 sastoji se od slijedećeg:

Sušenje izvornog uzorka tla

Izvorni uzorak (600 g) suši se na temperaturi 110°C kroz 3 sata. Usporednom težina prije i poslije sušenja dođe se do udjela vlage u izvornom uzorku. Ovaj korak je potrebno učiniti radi kvantitativnog određivanja vode, a isto tako i radi daljnjeg postupka ekstrakcije nafte iz tla jer taj postupak zahtijeva potpuno suhi uzorak tla.

Mljevenje suhog uzorka tla

Postupak ekstrakcije naftnog materijala iz onečišćenog uzorka tla zahtijeva da se uzorak prije ekstrakcije samelje na određenu granulaciju zrnja (0—0,09 mm). Iz tog razloga suhi uzorak tla je samljeven u kugličnom mlinu do navedene granulacije.

Ekstrakcija naftnog materijala iz suhog onečišćenog uzorka

Suhi onečišćeni uzorak podvrgnut je ekstrakciji kloroformom u Soxlet aparatu kroz 48 sati. Tim postupkom dobije se naftni ekstrakt i čisto suho tlo.

Određivanje slobodnih karboksilnih kiselina i fenolno-laktamskih komponenta u uzorku ekstrahirane nafte.

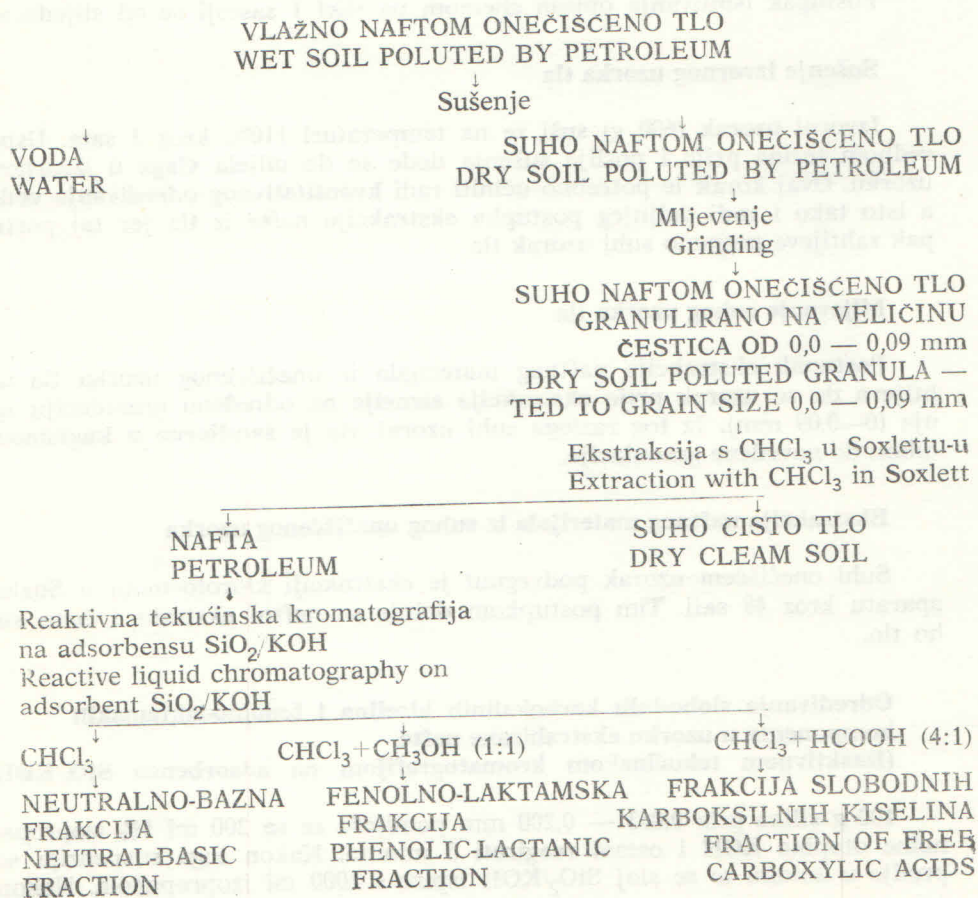
(Reaktivnom tekućinskom kromatografijom na adsorbensu SiO_2/KOH)

100 g silika gela 0,063 — 0,200 mm pomiješa se sa 200 ml 5% izopropanolne otopine KOH i ostavi reagirati 5 minuta. Nakon toga suspenzija se prelije u kolonu te se sloj SiO_2/KOH ispiri s 1000 ml izopropanola. Nakon

toga SiO_2/KOH se istrese iz kolone na stakleni poklopac, suši i reaktivira u sušioniku na temperaturi od 120°C tokom 2 sata. 20 g dobivenog adsorbensa stavi se u kolonu promjera 20 mm i visine 800 mm koja je snabdjevena sinter pločicom i ventilom za regulaciju protoka (5ml/min).

Uzorak nafte (30 g) otopi se u 50 ml CHCl_3 i stavi na vrh kolone. Neutralno-bazna frakcija se eluira s 300 ml CHCl_3 , fenolno-laktamske komponente s 200 ml CHCl_3 — metanol (1:1), a frakcija slobodnih karboksilnih kiselina se eluira s 200 ml 20% HCOOH u kloroformu.

Slika 1 — Postupak ekstrakcije naftnog materijala iz uzorka onečišćenog tla i njegova daljnja separacija u svrhu određivanja kiselih komponenata.
 Figure 1 — Method of extraction of the petroleum material gained from polluted soil samples and its further separation in purpose to determine the samples of extracted petroleum and of original soil samples acid components.



Infracrvena spektrometrija

IR spektri snimljeni su na instrumentu Perkin Elmer model 277 u području od 4000 do 625 cm^{-1} . Spektri su načinjeni za otopine nepoznatih koncentracija u CCl_4 u NaCl ćelijama širine 0,2 mm uz kompenzaciju otapala.

REZULTATI I DISKUSIJA

U Građevinskom institutu Zagreb razrađena je metoda (5—9) za kvantitativno određivanje i kvalitativnu analizu kiselih komponenata nafte ili naftnih derivata. Prema toj metodi naftu ili neki derivat nafte moguće je separirati u tri frakcije:

neutralno-baznu frakciju, fenolno-laktamsku frakciju i frakciju slobodnih karboksilnih kiselina reaktivnom tekućinskom kromatografijom na adsorbentu SiO_2/KOH (drugi dio sheme na slici 1). Navedene komponente moguće je odrediti u čistim uzorcima nafte ili naftnih derivata, no ukoliko to nije slučaj potrebno je iz izvornog uzorka na neki način odvojiti čistu naftu ili naftni derivat.

Proces odvajanja čiste nafte ili naftnog derivata ovisi o prirodi izvornog uzorka, a također o prirodi nafte u tom uzorku. Iz tog razloga potrebno je u potpunosti poznavati originalni uzorak da bi se moglo razraditi adekvatan proces odvajanja nafte u kojoj se nakon toga mogu odrediti slobodne karboksilne kiseline i fenolno-laktamske komponente(5,9).

U uzorcima naftom onečišćenog tla određen je udio vode s tim da su srednje vrijednosti rezultata od dva usporedna određivanja načinjena za svaki od uzoraka prikazane u tablici 1.

Tabela 1 — Rezultati određivanja vlage u uzorku naftom onečišćenog tla
Table 1 — Results of moisture content determination in soil sample polluted by petroleum

UZORAK BR. 1 SAMPLE No. 1			UZORAK BR. 2 SAMPLE No. 2		
g uzorka g of sam- ple	g vode g of mois- ture	% vode % of mois- ture	g uzorka g of sam- ple	g vode g of mois- ture	% vode % of mois- ture
600	95,64	15,94	600	101,64	16,95

Suhi uzorci onečišćenog tla su samljeveni na veličinu čestica od 0,0 do 0,09 mm te povrgnuti ekstrakciji kloroformom u aparatu po Soxlettu kroz 48 sati. Srednje vrijednosti od dva usporedna određivanja sadržaja nafte u oba ispitana uzorka prikazane su u tablici 2.

Tabela 2 — Ekstrakcija naftnog materijala iz suhog naftom onečišćenog uzorka tla
 Table 2 — Extraction of petroleum material from dry soil sample polluted by petroleum

g suhog uzorka g of dry sample	UZORAK BR. 1 SAMPLE No. 1		UZORAK BR. 2 SAMPLE No. 2		% nafte u izv. uz. % of petro- leum in dry original sample		
	g nafte u suh. uz. % of pe- troleum in dry sample	% nafte u izv. uz. % of pe- troleum in origi- nal sample	g suhog uzorka g of dry sample	g nafte g of pe- troleum sample			
400	65,94	16,49	13,86	400	0,29	0,070	0,058

Tabela 3 — Rezultati određivanja slobodnih karboksilnih kiselina i fenolno-lakta mskih komponenata u uzorcima ekstrahirane nafte i izvornim uzorcima tla

Table 3 — The results of determination of free carboxylic acids and phenolic-lact tamic components gained out of

UZORAK EKSTRAHIRANE NAFTE BR—1 SAMPLE OF EXTRACTED PETROLEUM No. 1		UZORAK EKSTRAHIRANE NAFTE BR—2 SAMPLE OF EXTRACTED PETROLEUM No. 2			
g nafte g of petroleum	fenolno-lak. komponente phenolic-lact. components g %	slob. karb. kiseline free carbox. acids g %	g nafte g of petroleum	fenolno-lak. komponente phenolic-lact. components g %	slob. karb. kiseline free carbox. acids g %
30,00	0,1454 0,485	0,0037 0,012	30,00	0,0012 0,413	0,00 0,00
IZVORNI UZORAK BR—1 ORIGINAL SAMPLE No. 1		IZVORNI UZORAK BR—2 ORIGINAL SAMPLE No. 2			
g uzorka g of sample	fenolno-lak. komponente phenolic-lact. components g %	slob. karb. kiseline free carbox. acid g %	g uzorka g of sample	fenolno-lak. komponente phenolic-lact. components g %	slob. karb. kiseline free carbox. acid g %
400	0,4030 0,0672	0,0102 0,0017	600	0,0015 0,00025	0,000 0,000

Specifična težina ekstrahiranog naftnog materijala iz uzorka br. 1 iznosi $0,816 \text{ g/cm}^3$, a iz uzorka br. 2 $0,822 \text{ g/cm}^3$.

Postupkom separacije (opisanom u eksperimentalnom dijelu) u uzorcima ekstrahirane nafte određeni su kvantitativni udjeli slabih kiselina fenolno-laktamskog tipa i slobodnih karboksilnih kiselina. Rezultati tog određivanja prikazani su u tablici 3.

Navedeni rezultati su srednje vrijednosti od dva usporedna mjerenja načinjena za svaki od uzoraka.

Za frakcije slobodnih karboksilnih kiselina i fenolno-laktamske frakcije separirane iz uzoraka nafte (uzorak 1 i 2) načinjeni su IR spektri (slike 2 i 3). Potrebno je spomenuti da nema kvalitativne razlike među spektrima odgovarajućih frakcija odvojenih iz dva uzorka nafte te će iz tog razloga biti komentirani samo po jedan IR spektar od frakcije slobodnih karboksilnih kiselina i fenolno-laktamske frakcije.

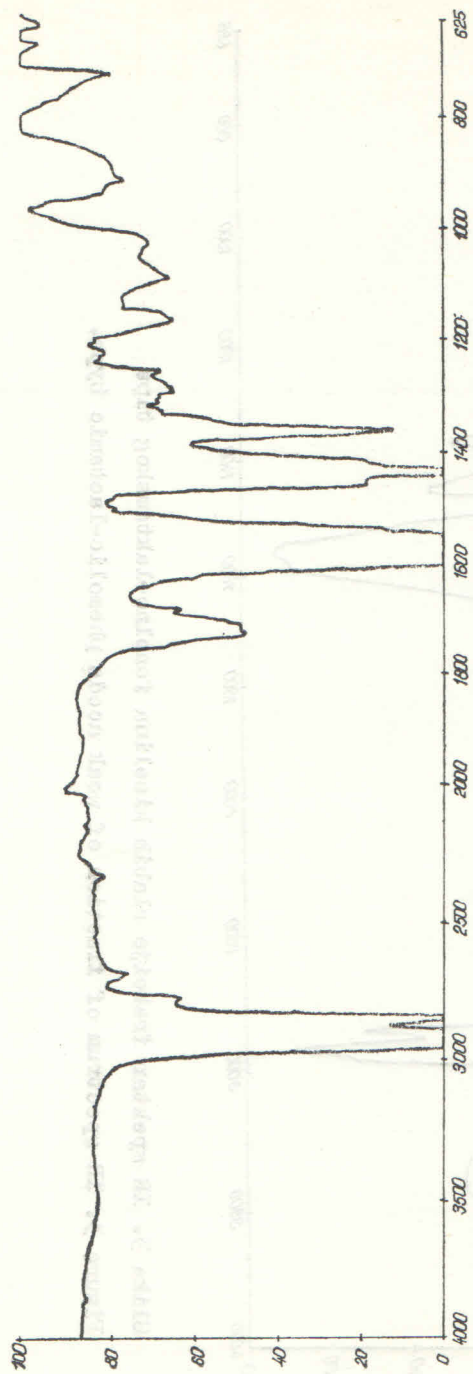
Prema IR spektru na slici 2 može se ustanoviti da je frakcija slobodnih karboksilnih kiselina stvarno frakcija koja sadrži pretežno —COOH grupu i to prema karakterističnim apsorpcijama u području od 2800 do 2500 cm^{-1} što je karakteristično za slobodne karboksilne kiseline asociirane u dimere(^{10a}) i polimere preko vodikovih mostova. Naime, ove apsorpcije karakterističnog i poznatog oblika uzrokovane su vibracijama rastezanja veza —OH skupine koja participira u vodikovim vezama.

Daljnja potvrda da se stvarno radi o slobodnim karboksilnim kiselinama je apsorpcija u području $1800 \text{ — } 1650 \text{ cm}^{-1}$ što je također karakteristična apsorpcija za slobodne karboksilne kiseline a posljedica je vibracija rastezanja $\text{C} = \text{O}$ veze u funkcionalnoj grupi —COOH (^{10b}).

Ostale apsorpcije uglavnom govore o ugljikovodičnom skeletu na kojem je vezana —COOH grupa. Tako izrazito jaka apsorpcija u području od 1650 do 1500 cm^{-1} govori o jakoj aromatičnosti kiselina. Naime ta apsorpcija je izazvana vibracijama aromatskog skeleta u ravnini $\text{C} = \text{C}$ veze(^{10c}). Apсорpcije locirane između 3000 i 2800 cm^{-1} i 1480 i 1320 cm^{-1} karakteristične su za zasićene supstituente na aromatu ili pak za čiste ravnolančane strukture na koje je vezana —COOH grupa. Osnovni zaključak o kemijskoj strukturi frakcije slobodnih karboksilnih kiselina prema IR spektru bio bi da se frakcija sastoji od slobodnih karboksilnih kiselina izrazito aromatskog tipa s mogućim ravnolančanim supstituentima na osnovnom aromatskom sistemu. Također je moguća prisutnost ravnolančanih slobodnih karboksilnih kiselina.

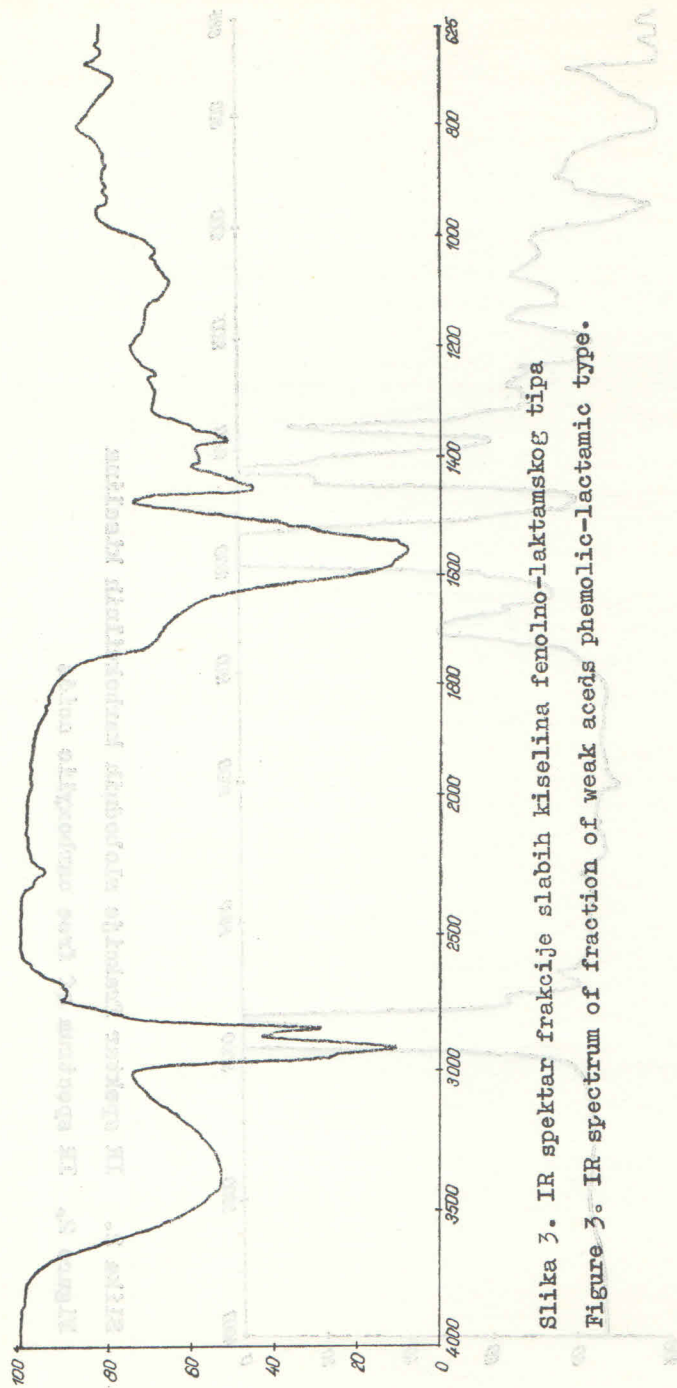
Osim opisanih sastojaka postoji i mogućnost prisutnosti anhidrida dikarbonskih kiselina. Posljednja tvrdnja bazira se na relativno slabo izraženim apsorpcijama lociranim na 1760 i 1730 cm^{-1} što prema nekim autorima možemo uzeti kao dokaz prisutnosti anhidrida dikarboksilnih kiselina(^{11,12}).

IR spektar (slika 3) frakcija slabih kiselina fenolno-laktamskog tipa pokazuje karakteristične apsorpcije za —OH i NH skupine ($3700 \text{ — } 3100 \text{ cm}^{-1}$) prisutne u vodikovim vezama (^{10d}). Uz to pokazuje i izrazitu apsorpciju od 1800 do 1700 cm^{-1} preklaplenu s apsorpcijom od 1700 do 1500 cm^{-1} . Ta apsorpcija predstavlja međusobno preklapljene aromatične apsorpcije(^{10c}) i vjerojatno apsorpcije laktamskih karbonila (^{10c'} ¹³).



Slika 2. IR spektar frakcije slobodnih karboksilnih kiselina

Figure 2. IR spectrum of free carboxylic acids



Slika 3. IR spektar frakcije slabih kiselina fenolno-laktamskog tipa

Figure 3. IR spectrum of fraction of weak acids phenolic-lactamic type.

Nadalje, apsorpcije predstavljene s dvije izrazite vrpce na 1340 i 1400 cm^{-1} mogu se uzeti kao tipične za frakciju slabih kiselina fenolno-laktamskog tipa separiranih iz nafte ili frakcije nafte⁽⁵⁾.

Osnovni zaključak o kemijskoj strukturi fenolno-laktamske frakcije prema IR spektru bio bi da su prevladavajuće funkcionalne grupe u toj frakciji —OH i —NH s time da su vezane ili uklopljene u aromatski sistem. Aromatski sistem pretpostavlja se da sadrži ravnolančane supstituente za što nam govore apsorpcije u IR spektru locirane između 3000 i 2800 cm^{-1} te apsorpcije na 1480 i 1370 cm^{-1} .

Iz rezultata prikazanih u tablici 3 izračunati su udjeli slobodnih karbonskih kiselina i fenolno-laktamskih komponenata u suhom i izvornom, naftom onečišćenom uzorku, a izraženi su kao ukupni sadržaj kiselih komponenata u gramima na kilogram suhog ili izvornog uzorka tla:

Uzorak br. 1 sadrži 0,8193 g kiselih komponenata na 1 kilogram suhog tla.

Uzorak br. 1 sadrži 0,6887 g kiselih komponenata na 1 kilogram izvornog tla.

Uzorak br. 2 sadrži 0,0030 g kiselih komponenata na 1 kilogram suhog tla.

Uzorak br. 2 sadrži 0,0025 g kiselih komponenata na 1 kilogram izvornog tla.

Dobiveni rezultati mogu se objasniti prosječnom dubinom na kojoj su uzorkovani uzorci. Uzorak br. 1 koji je uzet s dubine od 0 — 30 cm sadrži 0,6887 g kiselih komponenata na 1 kilogram izvornog tla, dok uzorak br. 2 uzet s dubine od 180 do 200 cm sadrži 0,0025 g kiselih komponenata na 1 kilogram izvornog tla.

Problem razgradnje zagađenog tla i potrebnim vremenom za njegovu razgradnju bavilo se više autora ^(2,4), pa je to tako razrađena biološka metodologija za ubrzanje obnove tla zagađenog naftom⁽²⁾.

Ubrzanje bakterijske razgradnje nafte i njenih ostataka u tlu postiže se povećanom aeracijom tla. Dakle, potrebno je uzgajati takve kulture koje imaju razgranat korijenov sistem i proizvode mnogo zelene mase. Najbolje se u te svrhe pokazala lucerna kojom se dodaje potrebni N mikroflori tla a koja koristi ugljikovodične spojeve i ubrzava povećanje postotka štapićastih Gram negativnih bakterija. Pored toga, lucerna poništava stimulaciju sulfatne redukcije i denitrifikaciju za koje znamo da nepovoljno djeluje na mikrobiološku ravnotežu tla.

ZAKLJUČAK

Ispitivana su dva uzorka tla onečišćena naftom uzorkovana na poljoprivrednim površinama PIK Vinkovci. Uzorak br. 1 uzorkovan je na prosječnoj dubini 0 — 30 cm, a uzorak br. 2 na prosječnoj dubini 180 — 200 cm.

U uzorcima naftom onečišćenog tla određen je udio vode i ustanovljeno je da kod uzorka br. 1 udio vode iznosi 15,94%, a kod uzorka br. 2 16,94%.

U uzorcima naftom onečišćenog tla određen je udio nafte koji iznosi kod uzorka br. 1 13,86%, a kod uzorka br. 2 0,058%.

U ekstrakcijom dobivenim uzorcima nafte određene su slobodne karboksilne kiseline i fenolno-laktamske komponente. Udjeli slobodnih karboksilnih kiselina i fenolno-laktamskih komponenata u naftom onečišćenom uzorku izraženi su kao ukupan sadržaj kiselih komponenata u gramima na kilogramu uzorka tla. Nađeno je da uzorak br. 1 uzet s dubine 0 — 30 cm sadrži 0,6887 g kiselih komponenata na kilogram izvornog tla, dok uzorak br. 2 uzet s dubine 180 — 200 cm sadrži 0,0025 g kiselih komponenata na kilogram izvornog tla.

SUMMARY

Two samples of soil that has been polluted by petroleum were taken out of agriculture area PIK Vinkovci and examined. Sample No. 1 was taken from the depth of 0 — 30 cm and sample No 2 from the depth 180 — 200 cm.

In samples polluted by petroleum moisture content was determined and it was found out that sample No. 1 contained 15,94% and sample No. 2 16,94% moisture.

In the examined samples petroleum content was determined and its part sample No. 1 was 13,86% and in sample No. 2 0,058%.

In petroleum that was separated from the samples by method of extraction free carboxylic acids and phenolic-lactamic type components were determined. Parts of free carboxylic acids and phenolic-lactamic components in soil samples polluted by petroleum were expressed as total content of acid components in gr/kg of original soil sample. It has been found that sample No. 1 (taken from the depth of 0 — 30 cm) contained 0,6887 g acid components per kg of the original soil sample, and sample No. 2 (taken from the depth 180 — 200 cm) contained 0,0025 acid components per kg of the original soil sample.

Bacterial decomposition of petroleum and its residue in polluted soil is gained by increased soil aeration.

For that reason cultures that have spread root's system that produce much green should be grown.

LITERATURA

1. **R. F. Cooper, H. G. Hedrick**, *Soil Sci.* **122** (1976) 331.
2. **J. Rivière, C. Gatellier**, *Ann. agron.* **27** (1976) 85.
3. **R. Ellis, R. Adams**, *Adv. agron.* **13** (1961) 197.
4. **V. A. Medvedev, V. D. Davydov et al**, *Počvovedenie* (1975 (6) 128.
5. **Z. Ramljak**, *Određivanje kemijske strukture komponenata bitumena*, Disertacija, Zagreb, 1977.
6. **Z. Ramljak, A. Šolc**, *Separacija slobodnih karboksilnih kiselina iz bitumena*, sastanak kemičara Hrvatske, Zagreb 1977, str. 230.
7. **Z. Ramljak, A. Šolc, P. Arpino, J. M. Schmitter, G. Guiochon**, *Separation of Acids from Asphalts*, *Anal. Chem.* **49** (1977) 1222.
8. **Z. Ramljak, S. Šilhard-Mihaljević**, *Separacija slobodnih karboksilnih i fenolno-laktamskih kiselina iz visokovrelišnih ostataka destilacije nafte*, XVI kongres SJL, Vrnjačka Banja, studeni 1978.
9. **Z. Ramljak, N. Adler, K. Simić**, *Određivanje sadržaja topljivog organskog materijala u uljnim škriljavcima s nalazišta Kratovo i njegova daljnja separacija na neutralne, kisele i bazne komponente*, I. Jugoslavenski simpozij o bitumenu, Poreč, travanj 1978.
10. **L. J. Bellamy**, *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, Methuen and Co. LTD, London, John Willey and Sons, Inc, New York, N. Y 1966.
a) str 162 b) str 165 c) str 71 d) str 99 e) str 213.
11. **J. C. Petersen, F. A. Barbour, S. M. Dorrence**, *Anal. Chem.* **47** (1975) 107.
12. **J. C. Petersen**, *Anal. Chem.* **47** (1975) 112.
13. **J. C. Peterson, R. V. Barbour, S. M. Dorrence, F. A. Barbour, R. V. Helm**, *Anal. Chem.* **43** (1971) 1491.