

Acertannin의 化學構造

禹 麟 根

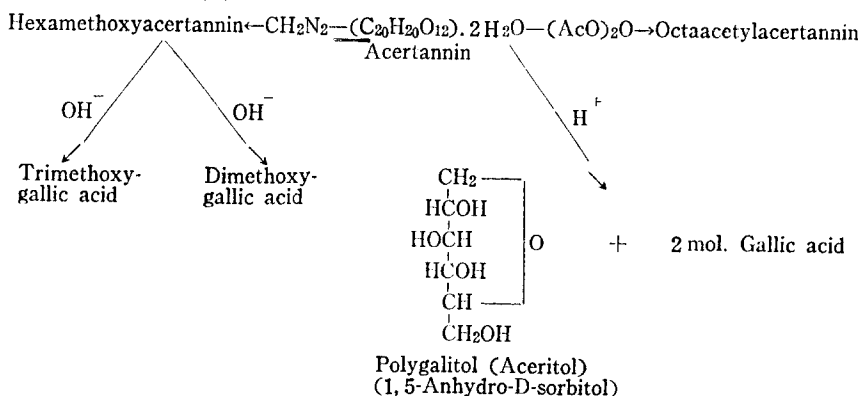
Lin Keun Woo*; The Chemical Structure of Acertannin.

(*Drug Research Institute, Seoul National University)

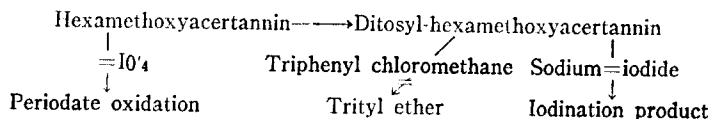
The position of galloyl groups in acertannin, as 3,6-digalloylpolygalitol, has been established by well-defined processes. In the courses of the processes eight new compounds, octamethoxyacertannin, 2,4-dimethoxy-1,5-anhydro-D-sorbitol, 2,4-dimethoxy-6-tosyl-3-benzoylpolygalitol, 2,4-dimethoxy-3,6-anhydro-1,5-anhydro-D-sorbitol, 6-tosylpolygalitol, 2,3,4-tri-benzoyl-6-tosylpolygalitol, 3,6-anhydro-1,5-anhydro-D-sorbitol, and 2,4-ditosyl-3,6-anhydro-1,5-anhydro-D-sorbitol, have been characterized.

(Received February 10, 1962)

Perkin 및 協作者¹⁾는 *Acer ginnala* Max.의 잎에서 單離한 tannin 樣物質, acertannin $C_{20}H_{20}O_{12}$ (無水物)을 diazomethane 으로 methyl 化하여 hexamethoxyacertannin 을 얻었고, acetyl 化하여서는 octaacetylacertannin 을 얻었으며 또한 acertannin 을 酸으로 加水分解하여서는 gallic acid 2 mol. 와 構造 未知인 aceritol, $C_6H_{12}O_5$, 1 mol. 을 얻었고, hexamethoxyacertannin 을 加水分解할 때는 dimethoxygallic acid 는 生成하지 않고 trimethoxygallic acid 만이 生成함을 觀察하였다. 그後 Freudenberg 氏等²⁾에 依하여 aceritol 은 이미 *Polygala* 屬 植物에서 發見된 polygalitol^{3,4)}와 一致함이 證明되었고, 그 構造는 Shinoda 氏等⁵⁾을 爲始한 여러 著者^{2,6-10)}에 依하여 1,5-anhydro-D-sorbitol 임이 決定되었다. 따라서 acertannin 의 構造 問題에는 두 개의 gallic acid 가 結合되고 있는 polygalitol 의 水酸基 位置 決定만이 남게 되었다. 前述한 acertannin 의 研究結果를 綜合하면 다음과 같다.



最近 N. Kutani 氏¹¹⁾는 acertannin 의 構造를 追究코자 gallic acid 가 結合하고 있는 polygalitol 의 水酸基 位置를 論하였다. 即 hexamethoxyacertannin 이 triphenyl chloromethane 과 反應하여 trityl ether 를 生成치 않는 點, 또는 ditosyl-hexamethoxyacertannin (N. Kutani¹¹⁾ 氏誘導)이 sodium iodide 에 依하여 iodination 을 일으키지 않는 點은 acertannin 構造에는 第一級水酸基가 存在하지 않는 證據라고 前提하고 hexamethoxyacertannin 이 periodate oxidation 을 받지 않는 實驗 結果에 立脚하여 acertannin 의 構造는 3,6-digalloyl-1,5-anhydro-D-sorbitol 이 라야 한다고 提唱하였다. N. Kutani 氏의 實驗 結果를 綜合하면 다음과 같다.

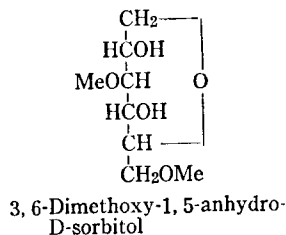
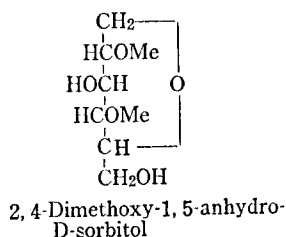


Kutani 氏가 驅使한 第一級 水酸基와 第二級 水酸基의 區別鑑識法, 即 trityl ether의 生成¹²⁾ 및 tosyl 基의 sodium iodide에 의한 iodination¹³⁾法은 特히 carbohydrate 構造決定에 應用하여 왔으나 여러 著者들의 再檢討에 의하여 構造未知物에는 適用할 수 없다는 實驗의 根據를 提示하고 있다.

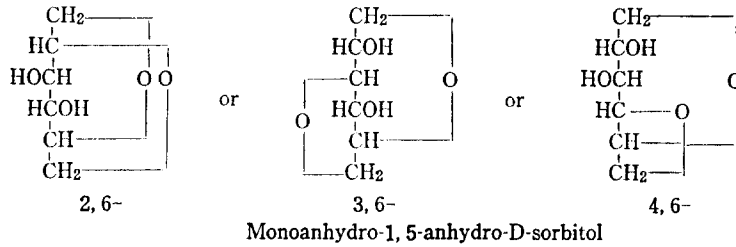
Hockett 氏等¹⁴⁾은 第二級 水酸基만이 存在하는 α -methyl-L-fucoside에서 trityl ether가 生成함을 指摘하여 이 方法은 構造未知物에 適用할 수 없음을 警告하였고, Hockett 氏等은 β -methyl-D-xyloside^{15,16)}, isosorbide¹⁷⁾와 1,2:5,6-diisopropylidene-D-glucofuranoside의 第二級 水酸基에서도 trityl ether 生成을 證明하였으며, Heuser¹⁸⁾, Malm¹⁹⁾氏等은 cellulose의 第二級 tosyl 基가 sodium iodide에 의하여 iodination을 일으키는 點을 指摘하여 이 方法은 第一級 水酸基의 特異的 鑑識法이 될 수 없음을 立證하였고, Levene 氏等²⁰⁾은 3-tosyl-xylopyranose에서, Levene²¹⁾, Hess 氏等은²²⁾ tritosyl-glucose에서, Tipson 氏等은 tetratosyl-erythritol²³⁾ 및 isopropyl alcohol의 tosylate²⁴⁾에서, Hockett 氏等¹⁷⁾은 2,5-ditosyl-sorbitol 誘導體에서 第二級 tosyl 基가 sodium iodide에 의하여 iodination을 일으키는 事實을 立證하였다. 또한 著者는 ditosyl-hexamethoxyacetannin을 acetic anhydride에 溶解하고 sodium iodide를 加하여 140°C에서 30分間 加熱할 때 旋光度가 變化함을 觀察하였고 이 處理溶液을 물에 注加할 때 生成하는 樹脂樣物에서 Clark²⁵⁾法에 의하여 iodine을 測定할 수 있었으며, hexamethoxyacetannin의 pyridine溶液에 triphenyl chloromethane을 溶解시키고 室溫에 放置할 때 時間經過에 따라 旋光度가 變化함을 觀察하였다. 따라서 accertannin의 構造는 經路가 明確한 合成 또는 分解法에 依하여 再檢討함으로써 確定될 問題이다.

이러한 問題點에 立脚하여 著者는 accertannin의 材料 植物을 容易하게 入手할 수 있는 特惠的 立場에 있음을 契機로 하여 여러 研究者들의 關心의 對象이 되어 있는 accertannin의 構造를 確認코자 本 研究를 試圖하였다.

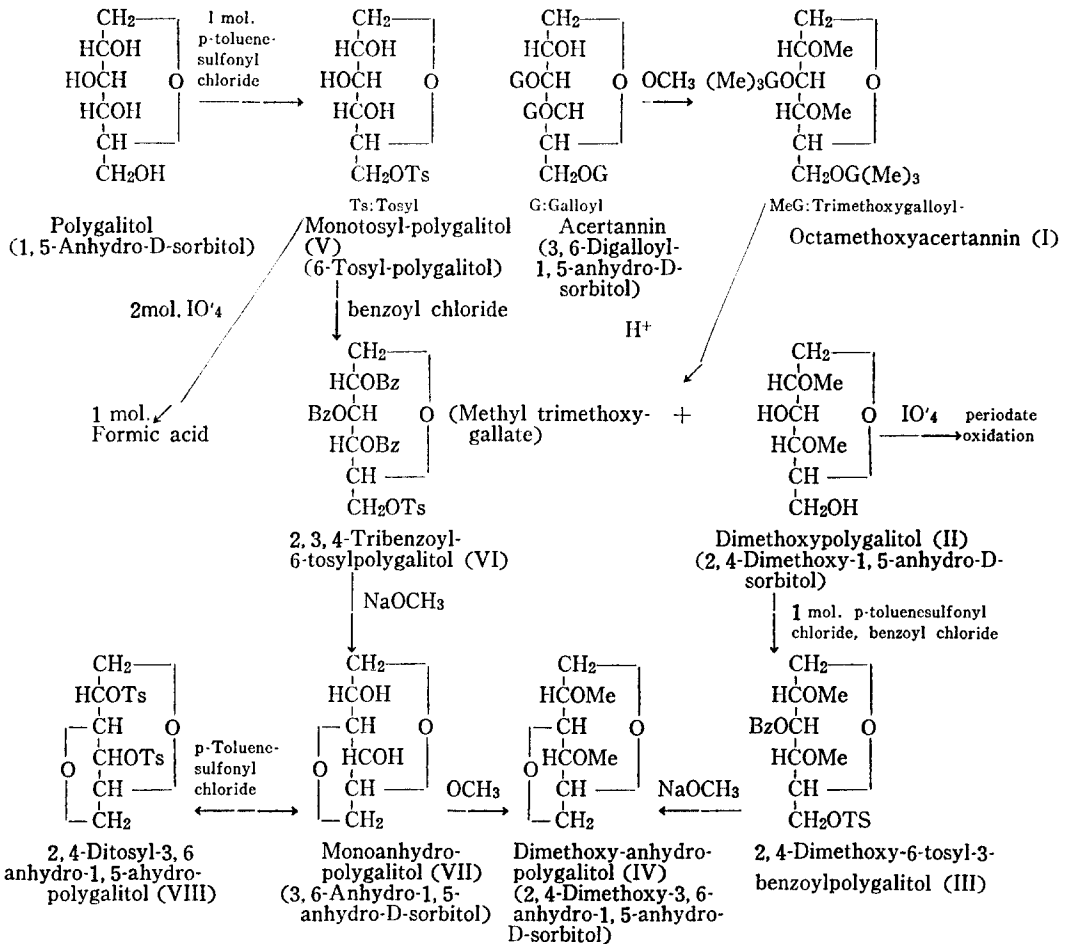
實驗部의 記載와 같이 accertannin을 dioxane溶液에서 Purdi法으로 permethylation하여 octamethoxyacetannin(I)을 얻었고 이를 methanol溶液에서 酸으로 加水分解하여 methyl trimethoxygallate와 dimethoxypolygalitol(II)을 捕捉하였으며 (II)의 構造가 決定됨에 따라 polygalitol에 結合하는 gallic acid의 位置가 決定되게 되었다. (II)는 periodate oxidation을 받지 않음으로 α -glycol型的 化合物이 아니라는 것이 證明되었고 또한 hexamethoxyacetannin이 periodate oxidation을 받지 않음을 再確證하였으므로 그 可能式은 다음 兩 構造式에 局限하게 된다.



(II)가 2,4-dimethoxy-1,5-anhydro-D-sorbitol 構造에 該當한다면 第一級 水酸基만을 選擇하므로 tosyl 化할 수 있을 것임으로 (II)을 pyridine에 溶解하고, 1 mol. 制限量의 p-toluenesulfonyl chloride을 加하여 室溫에서 24時間 反應시켜서 選擇的 tosylation을 試圖한 다음 過剩의 benzoyl chloride을 作用시킨 結果, dimethoxy-monotosyl-monobenzoylpolygalitol (III)가 얻어졌다. 따라서 (III)은 2,4-dimethoxy-3-benzoyl-6-tosylpolygalitol이고, (II)는 2,4-dimethoxy-3,6-anhydro-1,5-anhydro-D-sorbitol임을 示唆하는 것이며, 이를 直接으로 證明키 爲하여 (III)을 sodium methylate로 鹼化해서 tosyl group와 benzoyl group位置에서 anhydridization을 일으켜, dimethoxy-anhydro-polygalitol (IV)를 얻었고, 이 構造는 polygalitol에서 明確한 過程에 依하여 誘導한 2,4-dimethoxy-3,6-anhydro-1,5-anhydro-D-sorbitol와 一致함을 確證하였다. 即 polygalitol을 pyridine溶液에서 1 mol. 制限量의 p-toluenesulfonyl chloride을 作用시켜 monotosyl-polygalitol (V)을 얻었으며, (V)는 periodate oxidation에 의하여 2 mol.의 oxidant를 消費하고, 1 mol.의 formic acid를 生成하므로 6-tosyl-polygalitol임이 證明되었고, (V)를 benzoylation하여 2,3,4-tribenzoylpolygalitol (VI)을 誘導하였으며 이를 sodium methylate로 鹼化하면 anhydridization을 일으켜 monoanhydro-polygalitol (VII)을 얻게 되었다. (VII)의 可能式은 다음 3式이 成立되나, (VII)가 periodate oxidation을받지 않음으로 그 構造는 3,6-anhydro-1,5-anhydro-D-sorbitol임이 證明되었고 (이를 tosylation하면 2,4-ditosyl-3,6-anhydro-1,5-anhydro-D-sorbitol (VIII)을 生成한다)



(VII)을 dioxane 溶液中에서 Purdi 法으로 methylation 하여 2,4-dimethoxy-3,6-anhydro-1,5-anhydro-D-sorbitol 을 얻었으며 이것이 accertannin 으로부터 誘導한 (IV)와 一致함을 確證함으로써 accertannin 의 構造는 3,6-digalloyl-1,5-anhydro-D-sorbitol 임이 確定되었다. 以上の 過程을 要約하면 다음과 같다.



本研究에 多大한 關心을 기우려주신 韓龜東, 李南淳, 洪文和 教授, 實驗에 協力하여 주신 金濟勳講師와 研究費를 支援하여 주신 서울大學校 研究委員會當局에 謝意를 表하며 元素分析을 알선하여 주신 梁忠鎬教授와 李龍均先生께 感謝한다.

實 驗

Ditosyl-hexamethoxyacertannin: Hexamethoxyacertannin 5 g. 을 無水 pyridine 27 ml. 에 溶解하고, 0°C 에서 p-toluenesulfonyl chloride 5.5 g. 을 少量씩 加하여 溶解시키고, 5 時間冷室에 放置하였다 다음에 室溫

에서 (28~29°C) 67時間 放置한다.

反應溶液을 多量의 氷水에 注加하여 沈澱되는 樹脂狀物을 ethyl ether 에 移溶시키고, ether 層을 分離하여 蒸溜한 殘留物을 數回 ethyl alcohol 에서 再結晶하여 m.p. 176°, (N. Kutani 氏는 分解點 85°C 로 報告하였다). $[\alpha]_D^{20} + 60^\circ$ (C, 0.2 in ethyl alcohol)의 結晶을 얻었다.

Anal. Calcd. for $C_{40}H_{44}O_{17}S_2$: C, 55.81; H, 5.12.

Found: C, 55.88; H, 5.37.

Iodination of ditosyl-hexamethoxyacertannin with sodium iodide: Ditosyl-hexamethoxyacertannin 0.17 g., sodium iodide 0.1 g. 을 acetic anhydride 30 ml. 에 溶解시킨 直後 旋光度를 測定하고, 140°C 에 達하였을 때부터 15分後, 30分後의 旋光度를 觀察하였다. 30分以上이 經過하던 暗褐色으로 變하여 旋光度測定이 不可能하였다. 매번 sodium iodate 단을 加하지 않은 同濃度の 檢體를 acetic anhydride 에 溶解시킨 溶液을 control 로 하여 比較하였다. 旋光度를 測定한 反應液은 氷水에 注加하고 生成하는 樹脂樣物質을 ethyl ether 에 移溶시킨 다음 ether 을 蒸溜한 殘留物 約 0.1 g.을 Clark²⁵⁾法에 의하여 iodine 을 滴定하였다.

After heat at 140°C Min.	Ditosylhexamethoxyacertannin(0.17g.) Nal (0.1g) and Acetic anhydride (30 ml.) Rotation in 2 dm.	Ditosylhexamethoxyacertannin(0.17g.) and acetic anhydride (30 ml.) (17-19°C)
0	0.67±0.016	0.67±0.03
15	0.92±0.023	—
30	1.099±0.04	0.67±0.057
	0.42	$I_2(-\frac{N}{10}-Na_2S_2O_3ml)$ 0.0

Reaction of hexamethoxyacertannin with triphenyl chloromethane: Hexamethoxyacertannin 0.5 g. 을 無水 pyridine 40 ml. 에 溶解하고 triphenylchloromethane (CaCl₂ 乾燥器에 貯藏) 1.2 g. 을 溶解시킨 直後의 旋光度와 24時間마다의 旋光度를 測定하고, 同濃度 hexamethylacertannin 의 pyridine 溶液 과 比較하였으며, 反應生成物은 直接捕捉치 못하였다.

Duration hrs.	Hexamethoxyacertannin (0.5g.) and Triphenyl chloromethane(1.2g.) in pyridine (40 ml) α in 2 dm. (19-20°C)	Hexamethoxyacertannin (0.5g.) in Pyridine (40 ml.)
0	5.24±0.012	5.21±0.072
24	5.24±0.034	5.21±0.011
48	5.26±0.042	5.21±0.067
72	5.28±0.037	5.21±0.013
116	5.30±0.016	5.21±0.005
140	5.37±0.031	5.21±0.033

Octamethoxyacertannin (I): 無水 acertannin 15 g. 을 dioxane 70 ml. 에 溶解하고 methyl iodide 40 ml. silver oxide 50 g. 을 加한 다음 密栓하고 室溫에서 4日間 振盪한 後 濾過한 濾液을 減壓 濃縮하여 얻은 殘留物을 同一한 處理法으로 4回反復하여 그 反應液을 濾過하고 濾液을 減壓濃縮한다. 濃縮한 殘留物을 다시 acetone 에 溶解하고 活性炭 層을 通하며 濾過한 다음 減壓濃縮하여 ethyl ether 에 難溶, methanol 에 可溶 acetone 에 易溶性인 透明한 syrup 狀 物質을 얻었다.

Anal. Calcd. for $C_{20}H_{12}O_5(OCH_3)_8 : OCH_3$, 42.75.

Found: OCH_3 , 42.46.

2,4-Dimethoxy-1,5-anhydro-D-sorbitol (II): Octamethoxyacertannin 7 g. 을 10% 無水 methanol 性 鹽酸溶液 100 ml. 에 溶解하고 水浴上에서 旋光度가 一定值에 이르도록 (約 19時間) 加溫한 다음 10% NaOH 水溶液을 加하여 中和하고 減壓下에서 溶媒를 溜去한 다음 蒸溜水를 加하여 100 ml. 로 하고 ethyl ether 로 振盪하여 ether 層을 分離 蒸溜하면 methyl trimethoxygallate 를 얻게된다. ether 層을 分離한 Ether 飽和水層은 水浴上에서 蒸發 乾涸하고 acetone 으로 處理하여 그 可溶部를 水浴上에서 蒸溜하고 殘留物을 160°C 에서 減壓 蒸溜하여 濃稠 syrup 狀 物質을 얻었다. 本物質은 (V)의 periodate oxidation 과 同一한 條件下에 酸

化를 試圖하였으나 (V)는 27時間에 酸化가 完結함에 反하여 本化合物은 13日間 放置하여도 oxidant 를 消費하지 않았다.

Anal. Calcd. for $C_6H_{10}O_3(OCH_3)_2 : OCH_3$, 32.29.

Found: OCH_3 , 32.08.

2,4-Dimethoxy-6-monotosyl-3-monobenzoylpolygalitol (III): 2,4-dimethoxy-1,5-anhydro-D-sorbitol 1.52g.(0.01 mol.)을 無水 pyridine 30 ml.에 溶解하고 여기에 p-toluenesulfonyl chloride 2.2 g.(0.012 mol.)을 $0^\circ C$ 에서 加하고 室溫에서 24時間 放置한 後 다시 $0^\circ C$ 로 冷却한 다음 benzoyl chloride 7g.을 加하고 다시 室溫에서 24時間 放置한 後 氷水에 注加하여 沈降하는 油狀物質을 數回 水洗한 다음 水蒸氣 蒸溜한 殘留物을 50% methanol 에 溶解하여 冷却, 放置하여 融點이 不明確한 semisolid 을 얻었다.

Anal. Calcd. for $C_{20}H_{20}O_6S(OCH_3)_2 : C$, 58.66; H, 5.77; OCH_3 , 13.77.

Found: C, 58.43; H, 5.91; OCH_3 , 13.52.

2,4-Dimethoxy-3,6-anhydro-1,6-anhydro-sorbitol (IV):

a) From (III). Dimethoxy-monotosyl-monobenzoylpolygalitol 2g.을 Na 0.4g.을 溶解시킨 無水 methanol 30 ml.에 溶解하고 $25^\circ C$ 에서 7日間 放置한 다음 methanolic sulfuric acid 로 中和 濾過하고 濾液을 蒸溜 乾燥하여 다시 無水 acetone 에 溶解시킨 다음 溶媒를 溜去해서 syrup 狀物質을 얻게된다. 이것을 다시 methanol 에 溶解시켜 活性炭層을 通하여 濾過한 다음 溶媒를 溜去하고 그 殘留物을 $170^\circ C$, 減壓下에서 蒸溜하여 透明한 syrup 을 얻었다.

Anal. Calcd. for $C_6H_8O_2(OCH_3)_2 : OCH_3$, 35.63.

Found: OCH_3 , 35.32.

b) From (VII): 3,6-Anhydro-1,5-anhydro-D-sorbitol 4g.을 dioxane 30 ml.에 溶解하고, silver oxide 12g.과 methyl iodide 20 ml.을 加하여 密栓한 다음 室溫에서 3日間 振盪하여 濾過한 濾液을 減壓下에서 蒸溜하고, 同一한 方法으로 4回 反復 處理하고 反應液을 活性炭層을 通하여 濾過한 다음 溶媒를 溜去하고 $170^\circ C$ 에서 蒸溜하여 透明한 syrup 을 얻었다.

Anal. Calcd. for $C_6H_8O_2(OCH_3)_2 : OCH_3$, 35.63.

Found: OCH_3 , 35.37.

6-Tosylpolygalitol. (V): Polygalitol 7.6 g (0.04 mol.)을 pyridine 76 ml.에 溶解하고 9.50g.(0.049 mol.)의 p-toluenesulfonyl chloride 9.50 g.(0.049 mol.)을 $0^\circ C$ 에서 加하고 室溫에서 5時間 放置한 後 氷水에 注加한다. 이 懸濁液을 ether 로 振盪하고 水層을 分離하여 濃縮하면 微細結晶이 析出한다. 이것을 濾集하고 물에서 再結晶하여 m. p. 172° 의 結晶을 얻었다.

Anal. Calcd. for $C_6H_{12}O_5(C_7H_7SO_2) : C$, 49.05; H, 5.66.

Found: C, 49.09; H, 6.02.

2,3,4-Tribenzoyl-6-tosylpolygalitol (VI): 6-Tosylpolygalitol 21 g.을 pyridine 100 ml.에 溶解하여 冷却시킨 後 benzoyl chloride 48 g.(0.51 mol)을 加하고 $25^\circ C$ 에서 24時間 放置한다. 이 反應物을 acetic acid 로 弱酸性으로 한 氷水에 注加하고 生成한 沈降物을 chloroform 에 溶解시켜서 活性炭으로 脫色 濾過하고 溶媒를 減壓下에서 溜去한 다음 ethyl alcohol 로 數回 再結晶하여 m. p. 125° 의 結晶을 얻었다.

Anal. Calcd. for $C_{27}H_{26}O_9S : C$, 61.59; H, 4.94.

Fund: C, 61.59; H, 5.15.

periodate oxidation of 6-tosylpolygalitol (V): 6-tosylpolygalitol 0.101 g.(3.16×10^{-4} mol.), sodium periodate 0.4g.을 蒸溜水 25 ml.에 加하고 $35^\circ C$ 에서 暗所에 放置하여 最終旋光度 $+0.8$ 에 達하였을 때 (27時間 經過) 消費한 IO_4^- 를 測定 하였다.

a) 未反應의 IO_4^- : 反應液 1 ml.을 取하여 여기에 sodium bicarbonate 溶液 10 ml., 0.1 N sodium arsenite 10 ml., 20% potassium iodide 2ml.을 加하고 15分後에 過剩의 sodium arsenite 를 0.1 N iodine 으로 逆滴定한다. 同一 條件下에서 oxidant 가 들어 있는 對照溶液의 未反應 IO_4^- 를 同一 方法에 依하여 測定하고 이들의 差를 酸化劑消費量으로 算定하였다.

b) 生成된 Formic acid 의 測定: 上記 反應液 1 ml.을 取하여 0.2 N NaOH 로 滴定하였으되, 同一 條件下에서 對照 溶液 滴定值와의 差를 formic acid 量으로 算定하였다. 指示藥: methyl red.

Cal cd. for α -Triol: Oxidant, 2 mol. $HCOOH$, 1 mol.

Found: Oxidant, 2.2 mol.; $HDOOH$, 0.9 mol.

3,6-anhydro-1,5-anhydro-D-sorbitol (VII): 2,3,4-Tribenzoyl-6-tosylpolygalitol 20 g.을 chloroform

58 ml. 에 溶解하고 Na 3 g. 을 溶解시킨 無水 methanol 200 ml. 을 加하여 25°C에서 7日間 放置한後 methanolic sulfuric acid 로 中和한다. 이 中和液을 水浴上에서 蒸溜, 乾燥한 다음 ethyl acetate 로 抽出하고 溶媒를 溜去하여서 얻은 syrup 는 右旋性이며 (V)의 periodate oxidation 과 同一한 條件下에 酸化를 試圖하였으나 oxidant 을 消費하지 않았다. 本 syrup 狀 物質은 水溶性이며 下記 實驗 記載와 같이 그 ditosylate 를 얻어 組成을 決定하였다.

2,4-Ditosyl-3,6-anhydro-1,5-anhydro-D-Sorbitol (VIII).: Syrup 狀 anhydropolygalitol 5.3 g. 을 pyridine 50 ml. 에 溶解하고 여기에 p-toluenesulfonyl chloride 20 g. (0.0105 mol.)을 少量씩 加한후 室溫에서 一夜 放置하고 氷水에 注加하여 chloroform 으로 抽出하고 KHCO₃, acetic acid, 蒸溜水 順으로 洗滌한 다음 無水 sodium sulfate 로 脫水하여 濃縮하던 syrup 을 얻게 되고 methanol 에서 再結晶하여 m.p. 117°C의 結晶을 얻었다.

Anal. Calcd. for C₂₀H₂₂O₈S₂: C, 52.86; H, 4.84.

Found: C, 52.71; H, 4.97.

(서울大學校 生藥研究所)

文 獻

1. A. G. Perkin and Y. Uyeda, J. Chem. Soc., **121**, 66(1922).
2. W. Frudenberg and Rogers, J. Am. Chem. Soc., **59**, 1602(1937).
3. Chodat, Arch. Sci. Phys. (3)18, 228(1887).
4. Picard, Bull. Sci. Chim, Biol., **9**, 692(1927).
5. Shinoda, Sato and Sato, B., **65**, 1219(1932).
6. L. Zervas, *ibid.*, **63**, 1989(1937).
7. L. Zervas and Papdimition, *ibid.*, **73**, 173(1950).
8. W. Freudenberg and Sheehan, J. Am. Chem. Soc., **62**, 558(1940).
9. N. K. Richtmer and C.S. Hudson, *ibid.*, **65**, 64(1943).
10. N.K. Richtmer, C. Jelleff Carr and C.S. Hudson, *ibid.*, **65**, 1477(1943).
11. N. Kutani, Chem. Pharm. Bull. Jap., **8**, 72(1960).
12. Helferich, Ann. **440**, 1(1924); B., **58**, 872(1925).
13. J. W. Oldham and J.K. Rutherford, J. Am. Chem. Soc., **54**, 366(1932).
14. R.C. Hockett and C.S. Hudson, *ibid.*, **56**, 945(1934).
15. R.C. Hockett and C.S. Hudson, *ibid.*, **53**, 446(1931).
16. Jackson, R.C. Hockett and C.S. Hudson, *ibid.*, **53**, 947(1934).
17. R.C. Hockett, H.G. Fletcher, JR., Elizabeth L. Shelfield and R. Max. Coepp. JR., *ibid.*, **68**, 927(1946).
18. Emil Heuser, Merle Heath and Wm. H. Shockley, *ibid.*, **72**, 670(1950).
19. Malm, Tanghe and Laird, *ibid.*, **70**, 2740(1948).
20. Levene and Raymond, J. Biol. Chem., **102**, 317(1933).
21. P.A. Levene and C.L. Mehlretter, Enzymologia, II, 232(1937).
22. K. Hess, O. Littaman and Pfleger, Ann. **507**, 55(1933).
23. R.S. Tipson and L.H. Cretcher, J. Org. Chem. **8**, 96(1943).
24. R.S. Tipton, M.A. Clapp, L.H. Cretcher, *ibid.*, **12**, 133(1947).
25. E.P. Clark, "Sem-micro Quantitative organic Analysis" Academic Press, Inc., New York, N. Y. 1943, p. 62.