葉 お よ び 種 子 の 脂 質 (第5報)

成熟中のヒマ種子グリセリド組成の変動

野田万次郎, 山田 幸一
(京都府立大学農学部農芸化学科)

昭和 46 年 2 月 15 日 受 理

Lipids of Leaves and Seeds Part V. Changes in the Glyceride Composition of Castor Bean during Maturation

By Manjiro NODA and Koichi YAMADA
*Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
Kyoto Prefectural University, Kyoto*

The glyceride composition of castor bean has been analyzed by thin-layer and gas-liquid chromatographies in relation to the changes of the lipid composition and lipase activity during maturation. A marked change in the lipid composition occurred between 13 and 28 days after flowering. The triglyceride content rapidly increased during this period, accompanied with the noticeable formation of ricinoleic acid and the increasing lipase activity, while proportions of free fatty acids and polar lipids decreased. Considerable amounts of triglycerides containing ricinoleic acid were formed between 13 and 21 days after flowering, and with proceeding maturation, the percentages of monoricinoleo-triglycerides and triglycerides containing only *n*-fatty acids decreased with increasing proportions of diricinoleo-triglycerides and triricinolein. Glyceride distribution analyses of mature castor bean triglycerides by lipolysis and thin-layer chromatography showed that the major components were triricinolein and secondly diricinoleo-triglycerides which contained ricinoleic acid at the 1- and 3-positions. (Received February 15, 1971)

緒 言

成熟期におけるヒマ (*Ricinus communis*) 種子油およびその構成脂肪酸の変化については, 近年, 三原⁽¹⁾, 山田ら⁽²⁾, 竹内, 櫛笥ら⁽³⁻⁵⁾ の諸研究によって種々の事実が明らかにされてきた。

しかし, この種子のグリセリド組成については, グリセリド型分布やグリセリド構造の研究が容易になった現在においても, まだほとんど触れられていない。これは, 本グリセリドがリシンノール酸を主とするオキシ酸を含むため, グリセリド分子中の構成オキシ酸の数によって, トリグリセリド自体でも極性の著しく異なったものができ, それらの分析が複雑化することの一原因があるものと思われる。たとえば, 一般植物油脂の薄層クロマトグ

ラフィーでは, トリグリセリドは通常単一スポットとして検出分離できるが, ヒマシ油では数個のスポットに分かれる。したがって, これらをリパーゼ分解して得たモノおよびジグリセリドのクロマトグラムはさらに複雑となり, グリセリド構造の研究は非常に困難となる。

この報告は, ヒマ種子の成熟期における脂質の生合成の問題を, この期間に急激に増加するグリセリドの組成の面からとらえようとしたもので, 同時に, グリセリド組成の変化に関連性をもつ脂肪酸組成と, 種子中のリパーゼ活性の成熟期における変化をもあわせて調査した。

実 験 方 法

1. 試料の調製 実験に供したヒマ種子は, 観賞用の園芸品種, 紅ヒマの種子 (昭和 41 年千葉県産) であ

る。これを昭和42年4月24日に京都府立大学付属農場で播種育成し、8月8日前後に開花した花が蒴果となって成熟するまで、日を追って3~7日ごとに種子を採取した。開花日は、総状花序をなす一群の花のうちの最初の雄花が咲いた日と定めた。

採集した種子は、粒数と重量を測定後磨砕し、これにクロロホルム-メタノール(2:1, 容量比, 以下すべて容量比)を加え、ホモジナイズして、常法により脂質を反復抽出した。なお種子重量および含油量は、種子100粒についての値からの平均値である。

リパーゼ分解の基質としてのヒマ種子トリグリセリドは、抽出脂質中の遊離酸を水酸化カリウムで中和後水洗して脱酸し、この脱酸脂質をシリカゲルカラムにかけ、最初 κ -ヘキサン、ついでエーテルで溶出し、このエーテル溶出区分から回収して得た。

2. 薄層クロマトグラフィー シリカゲルGプレート(薄層の厚さ0.25mm)を使用し、試料脂質はエーテル溶液として着点した。ヒマ種子グリセリドの分離を目的とする展開溶媒としては、石油エーテル-エーテル-酢酸(一般に50:50:1, また場合により70:30:1, 30:70:1など)が適当である。スポットは50%硫酸を噴霧後、加熱して検出した。

またプレート上で分離した脂質を回収する場合は、0.2% 2',7'-ジクロロフルオレセイン-エタノール溶液を噴霧後、紫外光下でスポットを検出し、それぞれのスポットの部分をかき取り、これから脂質をエーテルまたはクロロホルム-メタノール(2:1)で抽出した。

3. ガスクロマトグラフィー グリセリドその他のエステル型脂質からは、ナトリウムメチラートを触媒とするメタノリシス法⁽⁶⁾で、遊離脂肪酸からは三フッ化ホウ素を触媒とするエステル化法⁽⁷⁾で、それぞれ構成脂肪酸のメチルエステルを調製し、ガスクロマトグラフィーの試料とした。また、それぞれのメチルエステル試料の一部(10mg以下)をとって、ビリジン0.5ml、ヘキサメチルジシラザン0.2ml、トリメチルクロロシラン0.1mlを加え、常法によって含有オキシ酸メチルをトリメチルシリル(TMS)化し、得られたTMS化脂肪酸メチルエステルと、もとの脂肪酸メチルエステルを別々にガスクロマトグラフ分析した。両者のクロマトグラムを比較して、オキシ酸を含む全脂肪酸の検出と定量を行なった。

分析条件は、島津GC-2B型(熱伝導検出器付)使用、

カラム内径4mm, 長さ3m, 固定液相コハク酸ジエチレングリコール・ポリエステル(15%), 担体Shimalite C, カラム温度210°C, キャリヤーガスはヘリウム, 流速64ml/minであった。

4. 各種分析法 赤外線吸収スペクトルは薄膜法により、酸価は常法によって測定した。

エステル結合の測定およびグリセリドの定量は、第3報記載のヒドロキサム酸法^(8,9)によった。この際、検量線用の標準試料としては、パルミチン酸メチルエステルを使用した。グリセリンは、グリセリド(10mg以下)を0.5N水酸化カリウム-エタノール溶液1mlとともに1時間還流加熱ケン化後、エタノールを減圧留去し、これに0.5N硫酸2mlを加えて酸性とし、以下Hanahan法⁽¹⁰⁾に従って比色定量した。

5. リパーゼ活性の測定 開花後13日以後の種子についてリパーゼ活性の測定を行なった。磨砕種子2g(約6粒分)に対し、種子の含有脂質量も含め、全脂質量が0.9gとなるように成熟ヒマ種子抽出脂質を添加調整し、これに0.02Mリン酸塩緩衝液(pH7.0)10mlを加えてホモジナイズする。反応に当っては、この液に0.005M塩化カルシウム液0.5mlを加え、さらに0.2M酢酸塩緩衝液(pH4.5)を加えて全容を50mlとし、1分間ホモジナイズした後、35°Cで40分間はげしく振りまぜ反応させた。

この際、反応前後の液から各2mlをとり、それぞれ99%エタノールを加えて10mlの定容とし、この2mlを24×200mmの試験管に入れ、これにアルカリ性ヒドロキシルアミン2mlを加え、以下ヒドロキサム酸法^(8,9)によって残留エステル結合量を比色定量した。なお濃度が濃い場合は、さらにエタノールで希釈して比色した。加水分解率は本定量法によるエステル結合の減少量で測定することができる。

6. すい臓リパーゼによる分解 すい臓リパーゼ(EC3.1.1.3)としてはNutritional Biochemicals社製のものを精製、脱脂して使用した。上記ヒマ種子トリグリセリド0.5gをMattsonらの方法⁽¹¹⁾に準じ、40°Cで30分間酵素分解した。ただしpH7.6で行ない、分解率は60%以内にとどめた。反応後、液を塩酸で微酸性とし、クロロホルム-メタノール(2:1)を加えて脂質を抽出した。

抽出脂質をアルコール-エーテル(1:2)溶液とし、これを0.2N水酸化カリウム-アルコール溶液で中和後、

水を加えてエーテル層と水層とに分層させた。エーテル層を水洗後、脱水、溶媒留去してグリセリド混合物が得られた。水層および洗液を合わせて酸性とし、エーテル抽出して遊離脂肪酸を得た。

これらの混合グリセリドおよび脂肪酸は、それぞれ上記2記載の方法で、石油エーテル-エーテル-酢酸 (50:50:1, 70:30:1, または 30:70:1) を展開溶媒として、薄層クロマトグラフィーで分けられ分離したスポットから、それぞれの脂質が抽出回収されて分析に供せられた。

7. グリセリド型分布の検討 上記のように、ヒマ成熟種子トリグリセリドを、すい臓リパーゼによって分解し、得られたグリセリド混合物を薄層クロマトグラフィーで分離した。モノグリセリドに相当するスポットの部分を作りとり、これから回収したモノグリセリドの構成脂肪酸をガスクロマトグラフィーで分析した。この脂肪酸組成と、もとのトリグリセリドの脂肪酸組成とから、Vander Wal の方法⁽¹²⁾によって、オキシ酸と *n*-脂肪酸との組合せに重点をおいたトリグリセリド型分布を算出した。

別に、同じヒマ種子トリグリセリドを、上記2の項記載の薄層クロマトグラフィーで分別し、各スポットを抽出回収して、それぞれをヒドロキサム酸法^(8,9)で定量し、*n*-脂肪酸だけのグリセリド、モノ-, ジ-, トリ-リノレオグリセリドの4種の型のトリグリセリドの含有比率を求め、Vander Wal 法による算出値と比較した。

実験結果と考察

1. 種子および種子成分の全般的な変化

実験の対象とした8月8日前後に開花したものは、開花後約2週間で蒴果および種子は急速に肥大し、3週間で種皮が黒くなりはじめた。以後種子の内容も充実し、6週間でヒマ種子独特の種皮のしまが現われはじめ、7週間で蒴が乾燥して枯れ、種子も水分含量が減少して軽くなり、ほぼ成熟した。

成熟期間中、特に開花後2~4週間の間で種子成分の上で最も大きな変動が見られ、Fig. 1のように、遊離酸は約1/10に

激減し、同時に成熟種子の脂質量の約半量がこの期間中に生成した。リパーゼ活性も、この期間中に脂質量の増加と平行して急増し、開花後3週間で成熟種子の約80%の活性を持つようになり、45日で活性は最高に達した (Fig. 1)。

Fig. 2 は開花後13日以後成熟に至るまでの種子の全エステル型脂質の脂肪酸組成の変化であって、開花後13日ではほとんど存在しなかったエステル型リノール酸が、開花後4週間までに成熟時の半分以上の含有比率になることを示している。これに対しリノール酸、パルミチン酸の含有比率が低下していることが目立ち、この期間に、*n*-脂肪酸を主とする脂質からリノール酸を主とする脂質へと、脂質組成の大きな変動が起こっていることを示唆している。

開花後13日の脂質の赤外線吸収スペクトルは、Fig. 3に見られるように、1220, 1055 cm^{-1} に主として P=O または P-O-C に基づく強い吸収があり、また 1650 および 1550 cm^{-1} 付近のアミド吸収帯もあって、リン脂質、糖脂質などの複合脂質を主とする組成であることがわかる。しかるに開花後21日以後になると、2970~2850, 1460, 1380, 730 cm^{-1} 付近にメチルまたはメチレンによる強い吸収、1740, 1170 cm^{-1} 付近にエステル結合によ

Fig. 1. Changes in Weight of Seed, Lipid Content, Acid Value of Lipids and Lipase Activity during Maturation.

Fig. 2. Changes in Fatty Acid Composition of Castor Bean Lipids during Maturation.

The abbreviation, *h*-18:1, indicates ricinoleic acid, including minor proportions of other hydroxy acids.

る強い吸収が現われ、典型的なトリグリセリドの吸収スペクトルを示す。ただしリシノール酸を含むトリグリセリドであるため、 3500 cm^{-1} 付近の水酸基の吸収は最後まで消失しない。以上の事実から、開花後 13 日以後、数日の間にトリグリセリドが急速に生成されてくることがわかる。

2. エステル型脂質の組成変化

成熟の各段階におけるヒマ種子脂質の薄層クロマトグラムを Fig. 4 に例示したが、おもなスポット (スポット番号 1~7) につき、成熟種子の脂質を試料として各スポットの定性を行なった。

試料脂質溶液をシリカゲル G プレートの原線上に帯状に着色し、石油エーテル-エーテル-酢酸で展開し、 $2'$, $7'$ -ジクロロフルオレセイン溶液の噴霧によって検出した。各スポットに相当する分離脂質帯から、それぞれの脂質を抽出回収し、それらの脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで、またエステル結合とグリセリンとのモル

Fig. 3. Changes in Infrared Spectra (Thin Film) of Castor Bean Lipids during Maturation.

Curve numbers represent days after flowering.

比を両者の比色定量値から求めた (Table I)。

その結果から Table I のように、スポット 1 は *n*-脂肪酸だけからなるトリグリセリド、2 はモノリシノレオトリグリセリド、3 はジリシノレオトリグリセリド、4 はトリリシノレイン、7 はグリセリン脂質ならびに糖脂質を主とする極性脂質であると判定された。スポット 5, 6 はモノグリセリドで、脂肪酸組成の異なるものと考えられるが、それ以外の脂質のスポットとも若干重なっていた。なお遊離の *n*-脂肪酸はスポット 3 付近、ステリン、*n*-脂肪酸のジグリセリド、遊離リシノール酸はスポット 4 付近にそれぞれスポットが現われる。ただし成熟種子では、これらの混在はわずかであるうえに、ナトリウムメチレート触媒によるメタノリシスを行なって分析しているので、これらの脂質の存在がグリセリドの脂肪酸組成の測定値に影響を与えるおそれはない。

以上の結果によって Fig. 4 を見ると、開花後 2 週間前後では、細胞内の機能脂質である極性脂質が大半を占め、そのほかに少量の遊離酸やステリンが認められる

Fig. 4. Thin-layer Chromatograms of Castor Bean Lipids at Different Ripening Stages.

Plate: Silica Gel G plate, solvent: petroleum ether-ethyl ether-acetic acid (50:50:1), spray reagent: 50% sulfuric acid. Spot numbers correspond to those in Table I.

が、トリグリセリド、特にオキシ酸を含むトリグリセリドは非常に少ない。しかし開花3週間後では、明らかにリシノレオトリグリセリドの相当量が生成していることが認められる。また極性脂質の存在比率は、グリセリドの蓄積とともに急激に低下する。したがって、これらの観察は、上記赤外線吸収スペクトルの観察結果とも一致した。

Fig. 5. Changes in the Distribution of Ester-type Lipids in Castor Bean during Maturation.

Numbers refer to the spot numbers in Fig. 4 and Table I.

さらに各成熟段階の脂質を薄層クロマトグラフ分離後、各スポット相当部からそれぞれの脂質を抽出回収し、そのエステル結合を定量して、各エステル型脂質の含有比の変動をみたのが Fig. 5 である。このように、開花後2週間から4週間までの間で、極性脂質の比率は急減し、リシノレオトリグリセリドは著増する。以後成熟とともに、*n*-脂肪酸だけのグリセリドやモノリシノレオトリグリセリドの比率が漸減し、トリリシノレインがことに顕著に増加してくることが認められる。

Table I. Component Glycerides of Spots Separated on Thin-layer Chromatogram

Spot No.*	Lipid class	Triglyceride type**	Ester: glycerol (molar ratio)	Fatty acid composition (mole %)	
				<i>n</i> -Acids	Hydroxy acids
1	triglyceride and others	NNN	2.71 : 1	97.4	2.6
2	triglyceride	NNR	2.86 : 1	68.0	32.0
3	triglyceride	NRR	2.99 : 1	33.8	66.2
4	triglyceride	RRR	3.04 : 1	0.1	99.9
5	monoglyceride	—	0.98 : 1	98.7	1.3
6	monoglyceride and others	—	1.22 : 1	42.4	57.6
7	polar lipids	—	1.95 : 1	89.5	10.5

* Spot numbers correspond to those in Figs. 4 and 5.

** The combinations of fatty acid moieties (N: *n*-acids, R: ricinoleic and other hydroxy acids) are indicated without regard to the positional isomerism.

以上の諸結果から, グリセリドの蓄積は開花後約 2 週間以後から急速にはじまり, 成熟するにしたがって, リシノール酸をより多く含むトリグリセリドの増加が著しくなることがわかった。

3. 酵素加水分解生成グリセリド

トリグリセリド分子中で, 各脂肪酸がグリセリル基のどの位置でエステル結合しているかという問題に関しては, 一般種子油では, すい臓リパーゼ分解を利用する分析法^(11,12)で概略の知見が得られる。しかしヒマ種子グリセリドでは, この方法ではオキシ酸を含んだ多種類のグリセリドも生成するので, 一般の場合のように, 薄層クロマトグラム上で少数の明確なスポットとしてモノおよびジグリセリドを分別することはできず, Fig. 6 のように, 酵素加水分解物は多くのスポットとなって分離する。したがって, まずこれらのスポットの定性を行なう必要があった。

成熟ヒマ種子トリグリセリドを, 上記実験方法 6 記載のとおり, すい臓リパーゼで部分加水分解し, 生成したグリセリドと遊離酸とを薄層クロマトグラフィーで分離した結果を Fig. 6 に例示する。遊離酸としては少量の *n*-脂肪酸と多量のリシノール酸の生成が認められたにすぎなかったが, グリセリド部は多数のスポット (スポット a~k) に分かれたので, 展開溶媒の混合比率を種々に変えて薄層クロマトグラフィーを行ない, 2',7'-ジクロロフルオレセインで検出, 各スポット相当部を削りと, 溶媒で抽出してそれぞれ脂質を回収した。

これらの脂質の脂肪酸組成, エステル結合とグリセリンとのモル比等を測定した結果, Table II のように各

Fig. 6. Thin-layer Chromatogram of Enzymic Hydrolyzates of Castor Bean Triglycerides by Pancreatic Lipase.

The conditions of thin-layer chromatography were the same as in Fig. 4. A : liberated fatty acids, B : remaining glyceride fraction. The spots a~k correspond to those listed in Table II.

スポットを定性することができた。ジグリセリドの場合も, リシノール酸を多く含むものほど *Rf* 値が低い。なお, この分析では位置異性体を区別し得なかったが, 一般のジグリセリドの場合と同様に, 一对のリシノレオジグリセリドのうち, *Rf* 値の高いものが 1,3-, 低いものが 1,2- (または 2,3-) ジグリセリドであろうと推定され

Table II. Enzymic Hydrolyzates Separated on Thin-layer Chromatogram

Spot*	Component	Glyceride type**	Ester : glycerol (molar ratio)	Fatty acid composition (mole %)	
				<i>n</i> -Acids	Hydroxy acids
a	diglyceride	NN	2.05 : 1	100.0	0.0
b	diglyceride	NN	2.09 : 1	98.1	1.9
c	triglyceride (unchanged)	NRR	2.96 : 1	35.2	64.8
d	fatty acid (unremovable)	—	—	0.3	99.7
e	triglyceride (unchanged)	RRR	3.01 : 1	0.2	99.8
f	diglyceride	NR	2.06 : 1	47.4	52.6
g	diglyceride	NR	1.92 : 1	51.8	48.2
h	diglyceride	RR	1.94 : 1	0.0	100.0
i	diglyceride	RR	2.02 : 1	1.7	98.3
j	monoglyceride	N	0.99 : 1	97.4	2.6
k	monoglyceride	R	1.10 : 1	3.3	96.7

* The spots a~k correspond to those of the glyceride fraction (B) in Fig. 6.

** Abbreviations indicate glyceride types without positional isomerism.

N : *n*-acid, R : ricinoleic and other hydroxy acid moieties of glycerides.

る。1,3-異性体のスポットが, 反応初期にはほとんど現われないところからみて, すい臓リパーゼで位置特異的に1,3-位のエステル結合が切られ, その後次第に酸根移動を起こして, 1,3-異性体が生成してくるものと見られる。

4. ヒマ種子におけるグリセリド型分布

上記のすい臓リパーゼ分解結果を利用して, 酵素分解生成グリセリドの薄層クロマトグラム上より, モノグリセリド相当部を分離回収した。このものと, もとの成熟ヒマ種子トリグリセリドのそれぞれの脂肪酸組成から, Vander Wal の方法⁽¹²⁾によって算出したトリグリセリド型分布を Table III に示す。この値はまた, 薄層クロマトグラフィーでトリグリセリドを直接分離, 定量して得た値とも大体一致している。

Table III. Glyceride-type Distribution in Mature Castor Bean Triglycerides (mole %)

Glyceride type*	Calcd.**	Found***
NNN	0.2	0.4
NNR	5.4	4.7
NRN	0.4	
NRR	9.7	41.6
RNR	30.1	
RRR	54.2	53.3

* N: *n*-acid, R: ricinoleic and other hydroxy acid moieties of triglycerides.

** Calculated by the method of Vander Wal⁽¹²⁾ on the basis of the following pancreatic lipolysis data: proportions (mole %) of *n*-acids (N) to hydroxy acids (R) are 8.2 to 91.8 on the positions 1 and 3, and 35.7 to 64.3 on the position 2, respectively.

*** Estimated by the ester bond determination of triglycerides separated on a thin-layer chromatogram.

Table III のように, ヒマ成熟種子トリグリセリドでは, トリリシノレインが過半量を占め, ついでリノール酸を主体とした *n*-脂肪酸を2位に持つジリシノレオトリグリセリドが多いことが注目される。

もちろんこの問題は, 正確には立体特異分析⁽¹³⁾の結果によって論ぜらるべき問題ではあるが, Brockerhoff ら⁽¹⁴⁾の立体特異分析結果によると, 一般に植物油脂では, 1,3 位の脂肪酸組成が近似しているといわれているので, 1,3 ランダム, 2 ランダム分布として計算した Table III の値も, 真実に近い値を示しているのではないかと考えられる。

要 約

(1) ヒマ種子の成熟期におけるグリセリドの生成とその組成変化について, 複合脂質量, 脂肪酸組成, 種子中のリパーゼ活性などの変動とも関連して調査した。

(2) 開花後13日以後28日までの間に, 脂質組成の大きな変動が起こり, トリグリセリドが急激に増加し, これと平行してリシノール酸含量およびリパーゼ活性も急増する。これに対し, 遊離酸は減少し, 複合脂質の含有比率も著しく低下する。リシノール酸を含むトリグリセリドは, 開花後21日でかなりの量の蓄積が認められたが, 成熟とともに *n*-脂肪酸だけのトリグリセリドやモノリシノレオトリグリセリドの含有比率は漸減し, リシノール酸を多く含むトリグリセリド, 特にトリリシノレインが顕著に増加した。

(3) ヒマ種子トリグリセリドの, すい臓リパーゼによる加水分解生成物を薄層クロマトグラフィーで分離, 定性し, その結果を利用して, 酵素分析法によるヒマ種子のグリセリド型分布測定を行なった。その結果, ヒマ成熟種子では, トリリシノレインが過半量を占め, ついで1,3-ジリシノレオトリグリセリドが多いことを知った。

この報告の概要は昭和43年4月, 日本農芸化学学会大会, および昭和43年6月, 第10回脂質生化学研究会で講演した。

- (1) 三原一幸: 日化, **79**, 7, 11 (1958).
- (2) M. Yamada and P. K. Stumpf: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 165 (1964).
- (3) 竹内芳一, 柳筈隆弘, 野口知雄, 高良 忠, 岩狭与三郎: 農化, **41**, 276 (1967).
- (4) 竹内芳一, 柳筈隆弘, 野口知雄, 渥美 功, 岩狭与三郎: 農化, **42**, 601 (1968).
- (5) 柳筈隆弘, 加藤文彦, 竹内芳一: 農化, **44**, 317 (1970).
- (6) F. E. Luddy, R. A. Barford and R. W. Riemenschneider: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37**, 447 (1960).
- (7) L. D. Metcalfe and A. A. Schmitz: *Anal. Chem.*, **33**, 363 (1961).
- (8) 野田万次郎, 小林 克: 農化, **42**, 574 (1968).
- (9) F. Snyder and N. Stephens: *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 244 (1959).
- (10) D. J. Hanahan and J. N. Olley: *J. Biol. Chem.*, **231**, 813 (1958).
- (11) F. H. Mattson and R. A. Volpenhein: *J. Lipid*

- Res.*, 2, 58 (1961).
- (12) R. J. Vander Wal: "Advances in Lipid Research," Vol. II, ed. by R. Paoletti and D. Kritchevsky, Academic Press Inc., New York, 1964, p. 1.
- (13) H. Brockerhoff: *J. Lipid Res.*, 6, 10 (1965); 8, 167 (1967).
- (14) H. Brockerhoff and M. Yurkowski: *ibid.*, 7, 62 (1966).
-