β-オキシ脂肪酸類のガスクロマトグラフィー

加多木豊之, 宮川壽代,^{1a)} 平本 実, 岡田幸蔵, 永井外夫^{1b)}

武庫川女子大学薬学部,^{1a)} 金沢大学薬学部^{1b)}

Gas Chromatography of β-Hydroxy Alkanoic Acids

TOYOSHI KATAGI, HISAYO MIYAKAWA,^{1a)} MINORU HIRAMOTO,

KOZO OKADA and SOTOO NAGAI^{1b)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa University^{1a)} and Faculty
of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University^{1b)}

(Received June 18, 1970)

Gas chromatographic separation of the derivatives of β-hydroxyalkanoic acids ranging from C₆ to C₁₈ was investigated. Separation into each member of the trimethylsiloxy-trimethylsilyl esters, the trimethylsiloxy-methyl esters, or the hydroxy-methyl esters was attempted by using a series of commercially available stationary phases with a hydrogen flame ionization detector system. As methyl esters, α- and β-hydroxyalkanoic and n-alkanoic acids were well separated from each other on a 3% HI-EFF 8B column. Further, a mixture of methyl β-hydroxyalkanoates ranging from C₆ to C₁₈ was successfully separated by a programmed temperature gas chromatography.

天然より多数のオキシ脂肪酸が遊離形あるいは結合形で単離されている。これらの中でも特に α-あるいは β-オキシ脂肪酸が動植物や微生物の脂質構成成分や代謝産物として存在することが多い。²⁾ たとえば D-β-hydroxyhexadecanoic acid と D-β-hydroxyoctadecanoic acid が *Rhodotulula* 属の菌体外脂質中に見出され,³⁾ D-β-hydroxyhexanoic acid と D-β-hydroxyoctanoic acid は *Pseudomonas aeruginosa* および *Ps. pyocyaneus* の糖脂質中に存在し⁴⁾ またそれらの L-isomer が *Ustilago zeae* の糖脂質の構成成分であり⁵⁾ wool fat 中に C₁₀—C₁₈ の α-オキシ脂肪酸が存在し,⁶⁾ 牛の脊髄 cerebroside 中に hydroxyoctadecanoic acid が認められる⁷⁾ ことなどが報告されている。また D-β-hydroxytetradecanoic acid はマウスに対する抗腫瘍性ならびに出血因子として *E. coli* から分離されたリン脂質中に存在する。⁸⁾ このほか炭素数 4—22 の α-および β-オキシ脂肪酸は cyclic depsipeptide 型抗生物質や glycopeptidolipide の脂肪酸部分を構成し、特異な生理活性の発現に関与している⁹⁾ ことが近年明らかにされている。⁹⁾ これら天然物におけるオキシ脂肪酸の多くは多量の試料を処理して化学的に単離し確認されているのが大部分である。しかしオキシ脂肪酸の検出にガスクロマトグラフィーを利用した報告もいくつかあり¹⁰⁾ たとえば α-hydroxynervonic acid などのオキシ脂肪酸がラット脳より取り出されてメトキシカルボン酸として検出され,¹¹⁾ また人脳中の炭素数 16—26 の α-オキシ脂肪酸がメチルエステルとして,¹²⁾ あるいは

1) Location: a) Edagawa-4, Nishinomiya, Hyogo; b) Takaramachi-13, Kanazawa.

2) F.H. Stodola, M.H. Deinema, J.F.T. Spencer, *Bacterial Rev.*, **31**, 194 (1967); C.E. Park, L.R. Berger, *J. Bacteriol.*, **93**, 230 (1967); T.J. de Pascual, J.B. Bermejo, *Anales Real. Soc. Espa. Fis. Quim.*, **62B**, 569 (1966); *C.A.*, **66**, 43 (1967).

3) A.P. Tullock, J.F.T. Spencer, *Can. J. Chem.*, **42**, 830 (1964).

4) S. Bergström, H. Theorell, H. Davide, *Arch. Biochem.*, **10**, 165 (1946); F.G. Jarvis, M.J. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 4124 (1949).

5) R.V. Lemieux, *Can. J. Chem.*, **29**, 415 (1951).

6) D.H.S. Horn, F.W. Hougen, E. von Rudloff, D.A. Sutton, *J. Chem. Soc.*, **1954**, 177.

7) V.P. Skipski, S. M. Arfin, M.M. Rapport, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 487 (1959).

8) M. Ikawa, J.B. Koepfli, S.G. Mudd, C. Niemann, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1035 (1953).

9) D.W. Russell, *Quart. Rev. Chem. Soc.*, **20**, 559 (1966); E. Vilkas, C. Gros, J.C. Massot, *C. R. Acad. Sci.*, **266**, Ser. C, 37 (1968).

10) T.H. Applewhite, *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **42**, 321 (1965).

はウシ血漿やラットの諸臓器中の α -オキシ脂肪酸類 (C_{11-26}) がアセトキシカルボン酸メチルとして測定された。¹³⁾ そのほか微生物からは 3-hydroxy-13-methyl-tetradecanoic acid などデプシペプチドの一構成成分として見出し、¹⁴⁾ また Kaneshiro と Marr は *Azotobacter agilis* の結合脂質より β -hydroxydecanoic, β -hydroxydodecanoic, α -hydroxydodecanoic acid の存在をガスクロマトグラフィーで確認した。¹⁵⁾ また植物種子油中の hydroxyhexadecenoic, hydroxyoctadecenoic および hydroxyeicosenoic acid などオキシ脂肪酸の分析がなされている。¹⁶⁾ また malic, tartaric や citric acid などの hydroxypolycarboxylic acid¹⁷⁾ あるいは mono-, di-, tri- および tetrahydroxystearic acid methyl ester¹⁸⁾ などは trimethylsilyl 化して分析されている。また炭素数 14—26 の α -オキシ脂肪酸メチルをアセチル化してガスクロマトグラフィーを行ない detector response は 50% 以下であるが 98.7% の recovery で測定できることが示された。¹⁹⁾

以上のようにオキシ脂肪酸のガスクロマトグラフィーはいくつか報告されているが、まだ β -オキシ脂肪酸類についての系統的な分析を含む基礎的研究は行なわれていない。そこで今回われわれは天然物中に存在する微量のオキシ脂肪酸をガスクロマトグラフィーにより検出確認するための基礎研究として C_6 — C_{18} の一連の β -オキシカルボン酸を用いて、それらのガスクロマトグラフ上の挙動を調べそれぞれのオキシカルボン酸を容易に分離確認しうることを明らかにした。

オキシ脂肪酸は methyl hydroxyalkanoate, methyl trimethylsiloxyalkanoate および trimethylsilyl trimethylsiloxyalkanoate の三種の誘導体によってガスクロマトグラフィーを行なった。高級脂肪酸エステル分析に使用される液相は SE-30, QF-1, DC-550 silicone oil, DEGA, DEGS, NGS, NGA など種々用いられているが今回は極性の小さい SE-30, XF-1105 のほかニトリルシリコンとして XE-60, XF-1150, ECNSS-S, ポリエチレングリコールとして PEG 20M, ポリエステルとして NGS, HI-EFF 8B, EGSS-X, DEGS, などを 3% film になるようコーティングしたものを用いた。

液相の種類と α - および β -オキシ脂肪酸誘導体の Equivalent Chain Length (ECL)^{16,20)} との関係

液相の種類と α - および β -オキシ脂肪酸の ECL 値との関係をみるため β -オキシ脂肪酸 (C_6 — C_{18})²¹⁾ のほかに

TABLE I. Equivalent Chain Length of Derivatives of Hydroxydodecanoic Acids

Phase	$C_{11}H_{22}(OH)^a)$ —CO ₂ CH ₃		$C_{11}H_{22}(OTMS)^a)$ —CO ₂ CH ₃		$C_{11}H_{22}(OTMS)^b)$ —CO ₂ TMS	
	α -OH	β -OH	α -OTMS	β -OTMS	α -OTMS	β -OTMS
SE-30 ^{c)}	13.28	13.52	14.32	14.29	13.92	14.08
XF-1105 ^{c)}	13.36	13.78	14.30	14.30	14.73	15.00
XE-60 ^{c)}	14.02	14.66	14.04	14.01	13.65	13.82
ECNSS-S ^{d)}	14.29	15.00	14.04	14.13		
XF-1150 ^{c)}	14.44	15.22	13.83	13.78	14.66	15.26
PEG 20M ^{c)}	14.17	14.70	14.06	14.03		
NGS ^{c)}	14.30	14.91	13.84	13.85		
EGSS-X ^{d)}	14.91	15.70	13.85	13.88		
HI-EFF 8B ^{c)}	14.70	15.43	13.64	13.69		
DEGS ^{c)}	16.34	17.34	13.77	13.87		

a) standard: methyl *n*-dodecanoate, *n*-tetradecanoate and *n*-hexadecanoate: ECL=12, 14 and 16, respectively

b) standard: trimethylsilyl *n*-dodecanoate, *n*-tetradecanoate and *n*-hexadecanoate

c) column temperature: 140°

d) column temperature: 130°

- 11) Y. Kishimoto, N.S. Radin, *J. Lipid Res.*, **1**, 72 (1959).
- 12) L.F. Eng, B. Gerstl, R.B. Hayman, Y.L. Lee, R.N. Tietz, J.K. Smith, *J. Lipid Res.*, **6**, 135 (1965).
- 13) Y. Kishimoto, N.S. Radin, *J. Lipid Res.*, **4**, 130, 139 (1963).
- 14) A. Kakinuma, H. Sugino, M. Isono, G. Tamura, K. Arima, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 973 (1969).
- 15) T. Kaneshiro, A.G. Marr, *Biochem. Biophys. Acta*, **70**, 271 (1963).
- 16) T.K. Miwa, K.L. Mikolajczak, F.R. Earle, I.A. Wolff, *Anal. Chem.*, **32**, 1739 (1960).
- 17) G.E. Martin, J.S. Swinehart, *J. Gas Chromatog.*, **6**, 533 (1968).
- 18) R.D. Wood, P.K. Raju, R. Reiser, *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **42**, 81 (1965).
- 19) J.S. O'Brien, G. Rousser, *Anal. Biochem.*, **7**, 288 (1964).
- 20) T.K. Miwa, *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **40**, 309 (1963).

α -オキシン脂肪酸 (C_8, C_{10}, C_{12})²²⁾ を常法により調製し, そのうち α - および β -hydroxydodecanoic acid 誘導体を各種液相により分析した. このばあい hydroxy- および trimethylsiloxy-methyl ester では直鎖脂肪酸メチルエステルを, また trimethylsiloxy-trimethylsilyl ester では直鎖脂肪酸の trimethylsilyl ester を標準とし, それらの保持時間の対数より相当する ECL 価を求めた (Table I).

Trimethylsilyl trimethylsiloxydodecanoate のごとく水酸基とカルボキシル基を共に silyl 化すると SE-30 や XF-1105 などの極性の小さいカラムではシャープなピークを与えるが α -OTMS 体と β -OTMS 体との分離は良くなかった. XF-1150 カラムでは若干 tailing が認められ α -体と β -体の分離も不良でありほかの ECNSS-S や PEG 20M およびポリエステルカラムでは tailing がはなはだしくピークの形がくずれて分析には不適當であると思われる. 次にメチルエステル化したのち silyl 化して得られる methyl trimethylsiloxydodecanoate はシャープで対称の良いピークを与えるが α -OTMS 体と β -OTMS 体との分離が悪く個々に分析するとやや異なった保持時間を与え, SE-30 やニトリルシリコン (XE-60, XF-1150) では β -OTMS 体のごくわずかに早く流出するがポリエステルカラムでは逆転する. その差が僅少なため α -OTMS 体と β -OTMS 体の混合物を注入すると一本のピークになる. この誘導体の ECL 価は液相の極性が増すほど小さくなりポリエステルカラムなどでは methyl hydroxydodecanoate の ECL 価より小さいが SE-30, XF-1105 などの極性の小さいカラムを用いた時は相対的に大きな ECL 価を示した. Silyl 化処理をしない methyl hydroxydodecanoate のガスクロマトグラフィーでは α -OH 体と β -OH 体の分離は一般に良好で液相の極性が大きくなるにつれて分離がよくなる傾向を示した. 極性の小さい液相の場合には methyl *n*-dodecanoate より約 1.5 大きい ECL 価を与えたが極性の大きい液相ではその差が 2.0 以上になり, 特に DEGS を用いた場合には 5.0 以上の差を示して流出の遅れが著しくなった. SE-30 を用いた場合は α -OH 体と β -OH 体の分離が完全でなく XE-60 はシャープで対称の良いピークを与え α -OH 体と β -OH 体の分離は良いが炭素数 n の α -オキシン脂肪酸メチルはその直前に流出する炭素数 $n+2$ の脂肪酸メチルのピークと全く重なることがわかった. そのほか ECNSS-S, EGSS-X, NGS などにおいても直鎖脂肪酸エステル間との分離で難点があった. カラム効率の点では XF-1105, XE-60 などのニトリルシリコンおよび NGS がすぐれているが α - と β -OH 体の分離および直鎖脂肪酸との分離性を総合すると methyl hydroxyalkanoate の分析には HI-EFF 8B が最も適しているものと思われる.

Fig. 1. Gas Chromatographic Separation of a Mixture of Methyl Hydroxyalkanoates and Methyl *n*-Alkanoates on 3% SE-30 Column at 130°

1: C_8 2: α -OH C_8 3: β -OH C_8 4: C_{10} 5: α -OH C_{10}
6: β -OH C_{10} 7: C_{12} 8: α -OH C_{12} 9: β -OH C_{12}
10: C_{14}

Fig. 2. Gas Chromatographic Separation of a Mixture of Methyl Hydroxyalkanoates and Methyl *n*-Alkanoates on 3% HI-EFF 8B Column at 130°

1: C_{10} 2: α -OH C_8 3: β -OH C_8 4: C_{12} 5: α -OH C_{10}
6: β -OH C_{10} 7: C_{14} 8: α -OH C_{12} 9: β -OH C_{12}
10: C_{16}

- 21) F. Adickes, G. Anderson, *Ann.*, **555**, 46 (1944); H. Tharer, G. Geist, *Biochem. Z.*, **302**, 374 (1939); P.A. Levene, H.L. Haller, *J. Biol. Chem.*, **63**, 670 (1925).
- 22) D.H.S. Horn, F.W. Hougén, E. von Rudloff, D.A. Futton, *J. Chem. Soc.*, **1954**, 177; D.H.S. Horn, Miss. Y.Y. Tretorius, *ibid.*, **1954**, 1460; H.R. LeSueur, *J. Chem. Soc.*, **87**, 1888 (1905).

TABLE II. Equivalent Chain Length of Methyl Esters of α - and β -Hydroxyoctanoic, Hydroxydecanoic and Hydroxydodecanoic Acids

Me ester	SE-30	HI-EFF 8B
α -OH C ₈	9.14	10.60
β -OH C ₈	9.36	11.28
α -OH C ₁₀	11.14	12.60
β -OH C ₁₀	11.40	13.32
α -OH C ₁₂	13.14	14.60
β -OH C ₁₂	13.42	15.34

column temperature 130°, flow rate of gaseous nitrogen 60 ml/min

Fig. 3. Relationship between Retention Times and Number of Carbon Atoms of Methyl Hydroxyalkanoates with 3% SE-30 Column

- 1: methyl *n*-alkanoate
2: methyl α -hydroxyalkanoate
3: methyl β -hydroxyalkanoate

Fig. 1, Fig. 2 に極性の小さい液相として SE-30 を、ポリエステルとして HI-EFF 8B を用いて α - および β -hydroxyoctanoic, hydroxydecanoic, hydroxydodecanoic-acid methyl ester および octanoic, decanoic, dodecanoic, tetradecanoic, hexadecanoic acid methyl ester の混合物の 130° でのガスクロマトグラムを示す。SE-30 では α -体と β -体との分離が不充分であり XF-1150 は HI-EFF 8B とほぼ同じパターンを示すが HI-EFF 8B の方が分離の良いことがわかった。 α - および β -オキシ脂肪酸メチルエステルの 130° での ECL 価をみると SE-30 カラムでは α -OH 体は相当する直鎖脂肪酸メチルより 1.1, β -OH 体は 1.4 大きくなり HI-EFF 8B カラムでは α -OH 体で 2.6, β -OH 体で 3.3 大きい価を与える (Table II)。

一般にたて軸に保持時間の対数を取り、よこ軸に炭素数をとると同系列物質内では直線関係が成立することはよく知られているが、 α - および β -オキシ脂肪酸の場合にも Fig. 3 に見られるように直鎖脂肪酸メチルに平行な二つの直線が得られた (Fig. 3)。

昇温ガスクロマトグラフィー

SE-30, XE-60 および HI-EFF 8B などのカラム (1.8 m × 4 mm) を用いて 110° より 4°/min の率で昇温ガスクロマトグラフィーを行なうことにより C₆—C₁₈ までの β -オキシ脂肪酸と直鎖脂肪酸メチルエステルの分析を行なった (Table III, Fig. 4, Fig. 5)。XE-60 と HI-EFF 8B とでは C₁₂ と β -(OH)C₉, C₁₄ と β -(OH)C₁₁, C₁₆ と β -(OH)C₁₃ の間で流出順序の逆転がみられた。ここで

TABLE III. Relative Retention Times of Methyl Esters of β -Hydroxyalkanoic and *n*-Alkanoic Acids in Programmed Temperature Gas Chromatography^{a)}

Acid	SE-30	XE-60	HI-EFF 8B	Acid	SE-30	XE-60	HI-EFF 8B
β -OH C ₆	0.11	0.18	0.22	β -OH C ₁₂	0.90	1.12	1.27
C ₈	0.15	0.14	0.12	C ₁₄	1.00 ^{b)}	1.00 ^{c)}	1.00 ^{d)}
β -OH C ₈	0.28	0.42	0.49	β -OH C ₁₃	1.07	1.30	1.47
C ₁₀	0.37	0.34	0.30	β -OH C ₁₄	1.23	1.48	1.65
β -OH C ₉	0.42	0.58	0.68	C ₁₆	1.32	1.37	1.39
β -OH C ₁₀	0.57	0.75	0.87	β -OH C ₁₆	1.54	1.82	2.02
C ₁₂	0.68	0.64	0.61	C ₁₈	1.61	1.71	1.76
β -OH C ₁₁	0.74	0.93	1.07	β -OH C ₁₈	1.80	2.13	2.35

a) starting temperature: 110°, heating rate: 4°/min, flow rate of carrier gas: 60 ml/min

b), c), d) Retention times of methyl myristate were 15.5, 12.0 and 11.3 min, respectively

Fig. 4. Separation of a Mixture of Methyl β -Hydroxyalkanoates and Methyl n -Alkanoates ranging from C_6 to C_{18} on 3% HI-EFF 8B Column in a Programmed Temperature Gas Chromatography from 110° at $4^\circ/\text{min}$

1: C_6 2: $\beta\text{-OH } C_6$ 3: C_{10} 4: $\beta\text{-OH } C_8$ 5: C_{12} 6: $\beta\text{-OH } C_9$ 7: $\beta\text{-OH } C_{10}$ 8: C_{14} 9: $\beta\text{-OH } C_{11}$ 10: $\beta\text{-OH } C_{12}$ 11: C_{16} 12: $\beta\text{-OH } C_{13}$ 13: $\beta\text{-OH } C_{14}$ 14: C_{18} 15: $\beta\text{-OH } C_{15}$ 16: $\beta\text{-OH } C_{18}$

Fig. 5. Separation of a Mixture of Methyl β -Hydroxyalkanoates and Methyl n -Alkanoates ranging from C_6 to C_{18} on 3% XE-60 Column in a Programmed Temperature Gas Chromatography from 110° at $4^\circ/\text{min}$

1: C_6 2: $\beta\text{-OH } C_6$ 3: C_{10} 4: $\beta\text{-OH } C_8$ 5: $\beta\text{-OH } C_9$ 6: C_{12} 7: $\beta\text{-OH } C_{10}$ 8: $\beta\text{-OH } C_{11}$ 9: C_{14} 10: $\beta\text{-OH } C_{12}$ 11: $\beta\text{-OH } C_{13}$ 12: C_{16} 13: $\beta\text{-OH } C_{14}$ 14: C_{18} 15: $\beta\text{-OH } C_{16}$ 16: $\beta\text{-OH } C_{18}$

methyl tetradecanoate を標準にしてそれぞれの β -オキシ脂肪酸メチルエステルの相対保持時間を求め炭素数との関係を図示すると Fig. 6 のごとくである。すなわち炭素数の小さいところではカーブを呈するが大きいところではほぼ直線に近い関係が成立するようである。一般に液相が極性をおびる程この曲線の勾配は大きくなる傾向を示した。

Fig. 6. Relative Retention Times of Methyl β -Hydroxyalkanoates ranging from C_6 to C_{18} in a Programmed Temperature Gas Chromatography from 110° at $4^\circ/\text{min}$

1: 3% HI-EFF 8B 2: 3% XE-60 3: 3% SE-30

Fig. 7. Calibration Curve for Methyl β -Hydroxydecanoate

1: $\beta\text{-OH } C_{10}$ /methyl tetradecanoate
2: $\beta\text{-OH } C_{10}$ /methyl dodecanoate
Column: 3% HI-EFF 8B

オキシ脂肪酸メチルの直鎖脂肪酸メチルに対する相対感度

Methyl β -hydroxydecanoate を例にとり、この物質の前後に流出してくる methyl dodecanoate および methyl tetradecanoate に対する相対感度を求めると Fig. 7 のような良好な直線関係を得た。液相としては最も分離の良い HI-EFF 8B (1.8 m $\times$ 4 mm) を用いカラム温度 140°, キャリアガス流速 60 ml/min で分析したところ明らかに試料の重量比とピーク面積との間に直線関係が成立するので直鎖脂肪酸を標準物質として β -オキシ脂肪酸の定量が可能である。

以上の結果から HI-EFF 8B カラムを使用するガスクロマトグラフィーによって β -オキシ脂肪酸の定性ならびに定量が可能であることが結論された。

実 験 の 部

試料の調製 C_8 , C_{10} , C_{12} の三種の α -オキシ脂肪酸,²²⁾ C_6 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{16} , C_{18} の十種の β -オキシ脂肪酸²¹⁾ をそれぞれ文献により調製した。一部を文献に従い trimethylsilyl 化²³⁾ して trimethylsiloxy-trimethylsilyl ester として分析した。またメチルエステルはジアゾメタンにより作り、生成した hydroxy-methyl ester はジオキサンに溶解してカラムに注入する。メチルエステルの一部は trimethylsilyl 化して trimethylsiloxy-methyl ester として分析に供した。

ガスクロマトグラフィー 用いた装置は島津 GC-1C 型 (水素炎イオン化検出器ならびに質量流量調節弁付) である。カラムはガラス製 U 型の長さ 2.6 m および 1.8 m で内径 4 mm のものを用い、充填剤は Gas Chrom. P (60—80 メッシュ) を dimethyldichlorosilane ついで無水メタノールで処理乾燥したものに SE-30, XF-1105, XF-1150, XE-60, ECNSS-S, PEG 20M, NGS, EGSS-X, HI-EFF 8B および DEGS をそれぞれ 3% 薄膜になるようコーティングしたものを用いた。カラムの操作温度は 130°, または 140°, 昇温クロマトグラフィーの場合は 110° より 4°/min で行なった。クロマトグラムにおける空気のピークの位置は Hansen, Andresen²⁴⁾ の方法により決定した。

検量線の作成 Dodecanoic, tetradecanoic および β -hydroxydecanoic acid の夫々 5—20 mg を種々の割合 (重量比 0.5—2.0) で混合し、ジアゾメタンでメチル化したのち無水ジオキサン溶液とし 3% HI-EFF 8B カラム (140°) に注入する。ピークの面積は [ピークの高さ $\times$ 半値幅] で測定し、たて軸に面積比よこ軸に重量比をとりプロットした。

23) Z. Horii, M. Makita, T. Tamura, *Chem. Ind. (London)*, **1965**, 1494; L. Birkofer, M. Donike, *J. Chromatog.*, **26**, 270 (1967); C.E. Dalglish, E.C. Horning, M.G. Horning, K.L. Knox, K. Yarger, *Biochem. J.*, **101**, 270 (1967).

24) H.L. Hansen, K. Andresen, *J. Chromatog.*, **34**, 246 (1968).