

## BIOSYNTHESE DE L'ACIDE LINOLENIQUE DANS LA FEUILLE DE POIS

A. TRÉMOLIÈRES

Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée, Physiologie cellulaire, 12 rue Cuvier, Paris 5, France

(Reçu le 29 mars 1972. Accepté le 8 juin 1972)

**Key Word Index**—*Pisum sativum*; Leguminosae; pea leaves; linolenic acid biosynthesis; effect of age and light.

**Résumé**—Au cours du développement des plantules de pois à l'obscurité, ou en régime de jours courts, la capacité de la biosynthèse de l'acide linoléinique dans les feuilles atteint un maximum environ 7 jours après le début de la germination. A tous les stades du développement la lumière augmente considérablement et spécifiquement l'incorporation de l'acétate  $1\text{-}^{14}\text{C}$  dans l'acide linoléinique, la multipliant jusqu'à 20 fois par rapport à l'incorporation à l'obscurité. L'évolution de la capacité de biosynthèse de l'acide linoléinique est très parallèle à l'évolution de la capacité de production de la chlorophylle. Les premières analyses montrent que les biosynthèses de l'acide linoléinique observées se produisent spécifiquement dans les galactolipides.

**Abstract**—During the development of pea seedlings in complete darkness or under a short-day photoperiod, the capacity of linolenic acid biosynthesis reaches a maximum about 7 days after germination. At all stages of development the light markedly and specifically increases the incorporation of  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetate into the linolenic acid, causing a 20-fold increase in the labelling at the maximum as compared with dark incubation. The evolution of the capacity of linolenic acid biosynthesis in leaves follows strictly the ability to produce chlorophyll under light. First analysis shows that the linolenic acid biosynthesis observed occurs specifically into the galactolipids.

### INTRODUCTION

L'ACIDE  $\alpha$ -linoléinique intégré dans des molécules de galactolipides est l'acide gras majeur de tous les tissus photosynthétiques des plantes supérieures.<sup>1</sup> Dans les algues vertes la quantité d'acide linoléinique semble généralement en relation, quoique d'une façon encore controversée, avec la présence de chlorophylle et l'activité photosynthétique.<sup>2-4</sup> On doit, cependant, signaler la présence abondante dans des tissus non photosynthétiques de plantes supérieures de cet acide linoléinique: inflorescence de chou-fleur,<sup>5</sup> racine de lupin,<sup>6</sup> graine de lin.<sup>7</sup>

On possède peu de données précises sur les voies et régulations de la biosynthèse de cet acide. Dans la feuille adulte, il présente un renouvellement extrêmement lent qui contraste avec le renouvellement rapide des radicaux mono ou digalactosylglycérol qui lui sont associés.<sup>8</sup> On a bien observé, dans des feuilles étiolées mises à verdier, une importante

<sup>1</sup> A. T. JAMES et B. W. NICHOLS, *Nature, Lond.* **210**, 372 (1966).

<sup>2</sup> B. W. NICHOLS, *Biochem. Biophys. Acta* **106**, 274 (1965).

<sup>3</sup> A. ROSENBERG, *Science* **157**, 1191 (1967).

<sup>4</sup> M. KATAMAYA et A. A. BENSON, *Plant Physiol.* **42**, 308, (1967).

<sup>5</sup> P. MAZLIAK, communication personnelle.

<sup>6</sup> A. THIBAUDIN-OURSEL, communication personnelle.

<sup>7</sup> H. J. DUTTON et T. L. MOUNTS, *J. Lipid Res.* **7**, 221 (1966).

<sup>8</sup> A. TREMOLIERES, *Compt. Rend.* **272**, 2777 (1971).

augmentation en pourcentage et surtout en masse de l'acide linoléique des galactolipides.<sup>9-11</sup> Mais une incorporation majeure et spécifique dans l'acide linoléique des galactolipides au moment du verdissement n'a pas été obtenue jusqu'ici, à notre connaissance;<sup>12</sup> on n'a donc pu étudier jusqu'à présent la régulation de la biosynthèse de cet acide de façon satisfaisante.

Nous avons obtenu des biosynthèses très importantes de l'acide linoléique en déposant directement des microgouttes d'acétate radioactif sur de jeunes feuilles de pois, ou en exposant les jeunes feuilles vertes à une atmosphère contenant du CO<sub>2</sub> radioactif.

Nous avons donc pu, à l'aide de ces méthodes, entreprendre l'étude de la régulation de la biosynthèse de l'acide linoléique au cours du développement de la feuille de pois.

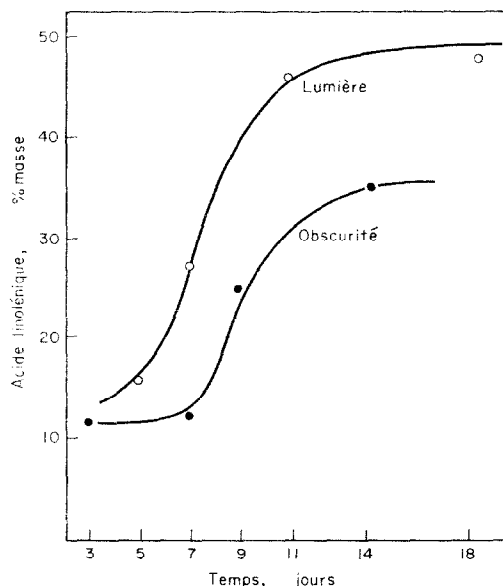


FIG. 1. EVOLUTION DU POURCENTAGE DE L'ACIDE LINOLÉIQUE DANS LA FEUILLE DES PLANTULES CULTIVÉES SOIT À L'OBSCURITÉ, SOIT EN RÉGIME DE JOURS COURTS (LUMIÈRE DU JOUR, PHOTOPÉRIODE DE 9 hr).

## RESULTATS

### *Evolution du Pourcentage de l'Acide Linoléique dans les Feuilles Vertes et dans les Feuilles Étiolées*

Dans les plantules se développant normalement à la lumière (lumière du jour, photopériode de 9 hr), les feuilles s'enrichissent simultanément en acide linoléique et en chlorophylle. Quand le développement des plantules a lieu à l'obscurité, les feuilles restent totalement dépourvues de chlorophylle, mais s'enrichissent néanmoins en acide linoléique

<sup>9</sup> B. W. NICHOLS, J. M. STUBBS et A. T. JAMES, *Biochemistry of Chloroplast*, Vol. 1, p. 677, Academic Press, London (1966).

<sup>10</sup> A. TRÉMOLIÈRES et P. MAZLIAK, *Physiol. Veg.* **8**, 135 (1970).

<sup>11</sup> A. TRÉMOLIÈRES et M. LEPAGE, *Plant Physiol.* **47**, 329 (1971).

<sup>12</sup> L. A. APPELQVIST, J. E. BOYNTON, P. K. STUMPF et D. VON WETTSTEIN, *J. Lipid Res.* **9**, 425 (1968).

(Fig. 1). Dans ces deux conditions de développement, le pourcentage de l'acide linoléique croît avec une vitesse maximum entre le septième et le quatorzième jour. Cependant, le pourcentage de l'acide linoléique croît de façon plus importante quand la feuille se développe à la lumière. La lumière a donc une action quantitative sur la biosynthèse de l'acide linoléique dans les feuilles.

*Biosynthèse de l'Acide Linoléique durant le Développement des Plantules en 'Jours Courts' (Photopériode de 9 hr, Éclairement Naturel)*

A différents stades du développement des plantules en régime de jours courts, on les expose pendant 20 hr, soit à une lumière blanche artificielle (environ 50 n Einstein  $\text{cm}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ), soit à l'obscurité totale, en déposant de l'acétate-1- $^{14}\text{C}$  sur les feuilles au début de l'exposition; on observe: (a) Une accroissement de la capacité de biosynthèse de l'acide linoléique jusqu'à 7 jours, puis une diminution de cette capacité (Fig. 2 et Tableau 1). La masse d'acide linoléique apparue et le pourcentage de la radioactivité incorporée dans cet acide en vingt heures, présentent un maximum au même moment. (b) A tous les stades de développement, une stimulation très importante de la biosynthèse de l'acide linoléique se produit à la lumière (Tableau 1). Cette stimulation touche spécifiquement l'acide linoléique et aucunement les autres acides gras (Tableau 2). Cette spécificité est absolue jusqu'au septième jour; à partir du onzième jour, on observe, en plus, une stimulation générale de l'incorporation dans tous les acides gras (ainsi, au onzième jour, l'incorporation de l'acétate dans l'acide linoléique est supérieure en valeur absolue mais inférieure en pourcentage à ce qu'elle était au septième jour). (c) L'évolution de la capacité de production de la chlorophylle (mesurée par la quantité de chlorophylle apparue dans dix feuilles pendant les 20 hr d'éclairement), est très parallèle à celle de la capacité de biosynthèse de l'acide linoléique, quoique, cependant, cette dernière demeure relativement importante au dix-huitième jour, alors que la capacité de production de la chlorophylle a beaucoup régressée (Fig. 2).

TABLEAU 1. STIMULATION DE L'INCORPORATION DE L'ACÉTATE-1- $^{14}\text{C}$  DANS L'ACIDE LINOLÉIQUE DE LA FEUILLE VERTE EN DÉVELOPPEMENT

Jours après le début de la germination	% de la radio-activité des acides gras totaux dans l'acide linoléique		cpm dans l'acide linoléique de 10 feuilles	
	Obscurité	Lumière	Obscurité ( $\times 10^3$ )	Lumière ( $\times 10^3$ )
5	15	16	80	160
7	13	40	62	270
11	6	29	44	820
18	1	19	1	130

L'incorporation de l'acétate-1- $^{14}\text{C}$  est mesurée 20 hr après le dépôt du précurseur sur la feuille.

TABLEAU 2. STIMULATION DE L'INCORPORATION DE L'ACÉTATE-1- $^{14}\text{C}$  DANS L'ACIDE LINOLÉIQUE DE LA FEUILLE ÉTIOLÉE EN DÉVELOPPEMENT (20 hr EN PRÉSENCE DU PRÉCURSEUR)

Jours après le début de la germination	% de la radio-activité des acides gras totaux dans l'acide linoléique		cpm dans l'acide linoléique de 10 feuilles	
	Obscurité	Lumière	Obscurité ( $\times 10^3$ )	Lumière ( $\times 10^3$ )
3	1	5	1	34
7	5	30	34	270
9	6	39	60	400
14	1	6	1	30

*Biosynthèse de l'Acide Linoléique au cours du Développement des Plantules à l'Obscurité*

Si, à différents stades de développement on expose les plantules étiolées pendant vingt heures, soit à l'obscurité, soit à la lumière, après avoir déposé de l'acétate-1- $^{14}\text{C}$  sur les

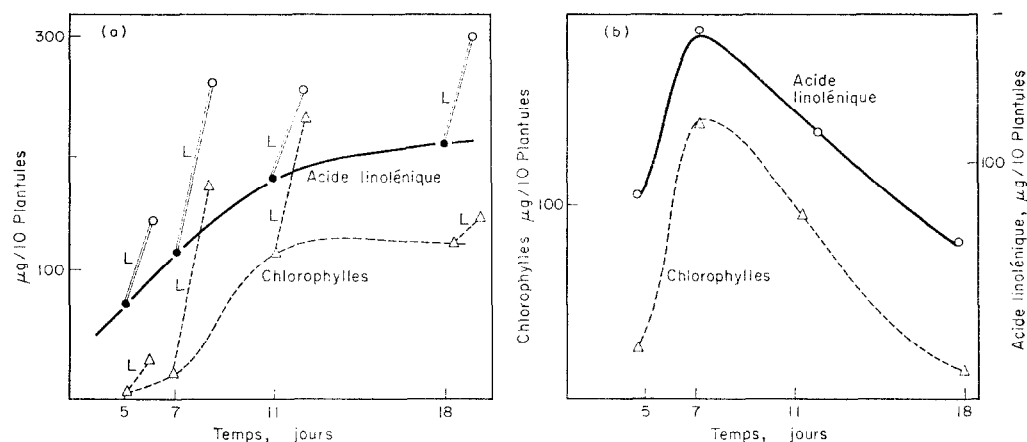


FIG. 2. SYNTHÈSE DE L'ACIDE LINOLÉNIQUE ET DES CHLOROPHYLLES DURANT LE DÉVELOPPEMENT DE LA FEUILLE DE POIS EN RÉGIME DE JOURS COURTS.

(a) Evolution des teneurs en acide linoléniqne et en chlorophylles: variations des teneurs en acide linoléniqne et en chlorophylles provoquées par un éclaircment continu de 24 hr (L) à différents stades de développement. (b) Evolution de la capacité de synthèse: des chlorophylles (mesurée par la masse de chlorophylles apparue en 20 hr d'éclaircment); de l'acide linoléniqne (mesurée par la masse d'acide linoléniqne apparue en 20 hr d'éclaircment).

feuilles, de la même façon que précédemment, on observe: (a) Une évolution bien parallèle des capacités de biosynthèse de l'acide linoléniqne et de la chlorophylle (Fig. 3). (b) Une stimulation très importante et spécifique de la biosynthèse de l'acide linoléniqne à la lumière (Tableaux 2 et 4). Cet effet stimulant de la lumière est plus important dans la plantule étiolée que dans la plantule verte (comparer les Tableaux 1 et 3), et spécifique tout au long de développement.

TABLEAU 3. SPÉCIFICITÉ DE LA STIMULATION PAR LA LUMIÈRE DE L'INCORPORATION DE L'ACÉTATE-1- $^{14}\text{C}$  DANS L'ACIDE LINOLÉNIQUE DES FEUILLES VERTES DE 7 JOURS (20 hr EN PRÉSENCE DU PRÉCURSEUR RADIOACTIF)

	Acide palmitique ( $\times 10^3$ )	Acide linoléniqne ( $\times 10^3$ )	Acide linoléniqne ( $\times 10^3$ )
Obscurité	140	180	60
Lumière	150	180	270

Cpm incorporés pour 10 feuilles.

TABLEAU 4. SPÉCIFICITÉ DE LA STIMULATION PAR LA LUMIÈRE DE L'INCORPORATION DE L'ACÉTATE-1- $^{14}\text{C}$  DANS L'ACIDE LINOLÉNIQUE DE LA FEUILLE ÉTIOLÉE DE 9 JOURS (20 hr EN PRÉSENCE DU PRÉCURSEUR)

	Acide palmitique ( $\times 10^3$ )	Acide linoléniqne ( $\times 10^3$ )	Acide linoléniqne ( $\times 10^3$ )
Obscurité	220	350	30
Lumière	250	340	400

Cpm incorporés pour 10 feuilles.

### Catégories Lipidiques Synthétisées

L'incorporation du  $^{14}\text{CO}_2$  dans les feuilles vertes de quatorze jours (permettant un marquage plus important pour un plus grand nombre de feuilles), a montré que l'acide linoléniqne synthétisé à ce stade était incorporé avec une extrême spécificité dans les molécules de galactolipides—principalement dans le monogalactosyldiglycéride—(Tableau 5).

Nous avons d'autre part vérifié que l'effet de la lumière s'exerçait aussi sur l'incorporation du  $^{14}\text{CO}_2$  dans l'acide linoléique (en exposant les feuilles pendant 3 hr à la lumière, à une atmosphère radioactive, puis en suivant le marquage soit à l'obscurité, soit à la lumière).

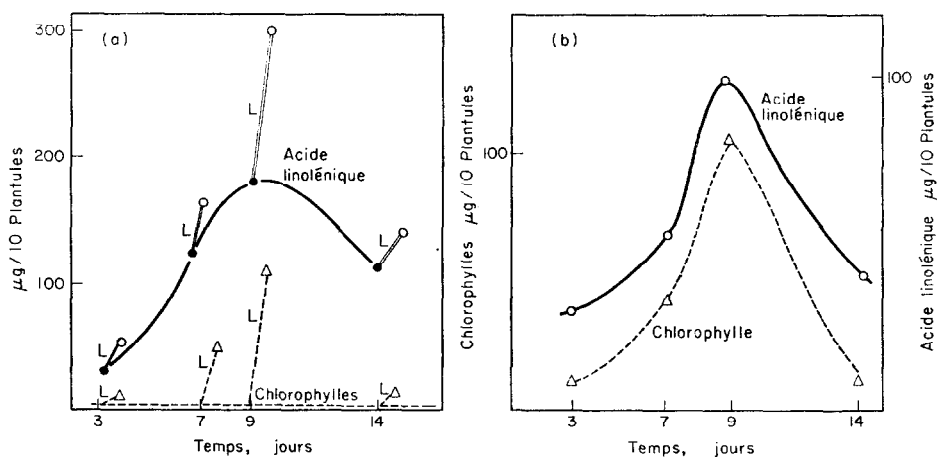


FIG. 3. SYNTHÈSE DE L'ACIDE LINOLÉNIQUE ET DES CHLOROPHYLLES DURANT LE DÉVELOPPEMENT DE LA FEUILLE ÉTIOLÉE DE POIS.

(a) Évolution des teneurs en acide linoléique et en chlorophylles; (b) évolution de la capacité de synthèse (mêmes symboles et processus expérimental que dans la Fig. 2).

Si on fournit à des plantules de sept jours, ayant poussé en régime de jours courts, de l'acétate-1- $^{14}\text{C}$  pendant 20 hr, à la lumière, on observe une incorporation encore plus importante du précurseur dans l'acide linoléique des galactolipides (Tableau 5); après ces 20 hr, 80% de la radioactivité des acides gras du monogalactosyldiglycéride est situé dans l'acide linoléique. Il ne fait donc pas de doute que la régulation décrite ci-dessus concerne l'acide linoléique des galactolipides et donc le constituant lipidique majeur des lamelles chloroplastiques.

TABLEAU 5. RÉPARTITION DE LA RADIOACTIVITÉ DANS LES PRINCIPAUX ACIDES GRAS DES DIFFÉRENTES CATÉGORIES LIPIDIQUES APRÈS 20 hr D'EXPOSITION CONTINUE À LA LUMIÈRE

	Feuilles de 14 jours $^{14}\text{CO}_2$			Feuilles de 7 jours Acétate-1- $^{14}\text{C}$		
	$\text{C}_{16:0}$	$\text{C}_{18:2}$	$\text{C}_{18:3}$	$\text{C}_{16:0}$	$\text{C}_{18:2}$	$\text{C}_{18:3}$
Lipide neutres	55	33	3	36	34	20
Monogalactolipide	3	25	70	8	10	80
Digalactolipide	18	32	45	20	25	55
Phospholipides	30	63	4	22	48	18

% de la radioactivité des Acides Gras totaux.

*Cinétique d'Incorporation de l'Acétate-1-<sup>14</sup>C dans les Acides gras de la Feuille en Verdissement*

Au septième jour de développement en régime de jours courts, on dépose de l'acétate-1-<sup>14</sup>C sur des feuilles exposées pendant vingt heures à la lumière [Fig. 4(a)]: La radioactivité est incorporée très rapidement dans les acides palmitique, oleique et linoleique; après 1 hr la radioactivité est majeure dans l'acide oleique, puis la radioactivité de cet acide décroît pendant les 19 hr suivantes; la radioactivité augmente dans d'acide linoleique pendant 10 hr, puis décroît légèrement; l'incorporation dans l'acide palmitique est très parallèle à l'incorporation dans l'acide linoleique; l'acide linoléique reste très peu marqué pendant les 4 premières hr, puis la radioactivité de cet acide croît jusqu'à 8 hr; les autres acides gras (palmitoleique et stéarique) demeurent toujours faiblement marqués. Ces cinétiques suggèrent une désaturation progressive de l'acide oleique en acide linoleique, puis en acide linoléique.

La Fig. 4(b) montre que la masse de l'acide linoléique demeure stable pendant les 4 premières hr d'éclairement, puis qu'elle croît très parallèlement à la masse de chlorophylle.

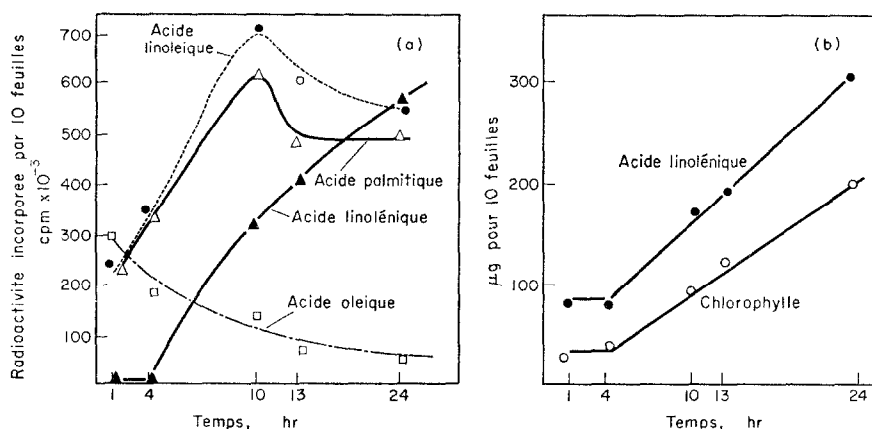


FIG. 4. CINÉTIQUE DE LA BIOSYTHÈSE DE L'ACIDE LINOLÉNIQUE EN ÉCLAIREMENT CONTINU DANS DES FEUILLES DE PLANTULES AYANT POUSSÉES PENDANT SEPT JOURS EN RÉGIME DE JOURS COURTS.

(a) Cinétique d'incorporation de l'acétate-1-<sup>14</sup>C dans les acides palmitique, oleique, linoleique et linoléique. (b) Croissance des masses de l'acide linoléique et de la chlorophylle.

## DISCUSSION

Notre travail montre que la synthèse de l'acide linoléique en quantité importante se produit à un stade très précis du développement de la feuille et ceci rejoint une série d'observations montrant que la synthèse des acides gras poly-insaturés ne se produit pas durant toute la vie des tissus végétaux, mais est l'objet d'une régulation précise. En première approximation, il semble que ces acides gras se synthétisent quand des membranes se forment ou se modifient (déclenchement d'une synthèse d'acide linoléique par agitation de rondelles de pommes de terre dans l'eau,<sup>13,14</sup> d'une synthèse d'acide linoléique dans les racines de luzerne sous l'influence du froid,<sup>15</sup> synthèse d'acides insaturés durant la maturation des graines.<sup>16</sup>

<sup>13</sup> C. WILLEMOT et P. K. STUMPF, *Can. J. Bot.* **45**, 579 (1967).

<sup>14</sup> A. BEN ABDELKADER, *Physiol. Veg.* **6**, 417 (1968).

<sup>15</sup> G. GRENIER, communication personnelle.

<sup>16</sup> A. THIBAUDIN et P. MAZLIAK, *Fruits* **22**, 3 (1967).

L'évolution de la capacité de biosynthèse de l'acide linoléique dans le temps et sa dépendance quantitative de la lumière expliquent bien l'évolution de la teneur en acide linoléique dans les plantules étiolées et dans les plantules vertes, teneur augmentant avec une vitesse maximum entre le septième et le neuvième jour; cette augmentation est seulement très favorisée par la lumière. Il est donc bien net que la lumière exerce un effet quantitatif et spécifique sur la biosynthèse de l'acide linoléique, mais que la dépendance de cette biosynthèse vis à vis de la lumière n'est pas absolue.

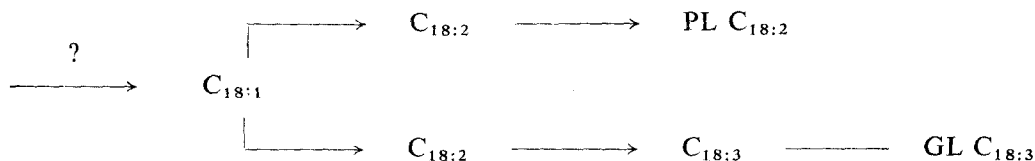
La capacité de production de la chlorophylle à la lumière est, elle aussi, régulée en fonction de l'âge de la feuille, avec un maximum aux alentours du huitième jour; cette régulation a été bien démontrée sur les feuilles étiolées d'Orge;<sup>17</sup> nos propres résultats sur la feuille verte montrent que cette diminution de la capacité de production de la chlorophylle n'est pas due à un déséquilibre métabolique se produisant dans la plantule étiolée âgée, mais a lieu aussi dans une feuille se développant normalement à la lumière. Il est tentant de penser que la lumière module indirectement la biosynthèse de l'acide linoléique en fonction de la quantité de molécules chlorophylliennes produites pour réaliser une association de ces deux constituants au sein des lamelles chloroplastiques adultes; un couplage de la production de ces deux constituants avait déjà été suggéré par Rosenberg<sup>3</sup> qui pensait que les molécules de galactolipides pourraient servir de 'Template' pour la synthèse des molécules de chlorophylles; on pouvait alors penser que dans des feuilles en formation soumises brusquement à une forte intensité lumineuse la stimulation de la biosynthèse de la chlorophylle est telle que les molécules 'Template' supportant cette synthèse viennent à manquer et qu'une production accrue de molécules d'acide linoléique devient nécessaire. Cependant l'existence à l'obscurité d'une synthèse d'acide linoléique sans synthèse de chlorophylle montre que la production de ces molécules n'est pas couplée de façon absolue; peut être la synthèse de l'acide linoléique est-elle strictement couplée non pas exactement à la production des molécules de chlorophylle mais plutôt à celle de précurseur comme protochlorophylle qui, lentement apparaissent aussi à l'obscurité; cette hypothèse est actuellement à l'étude au laboratoire. Rosenberg avait aussi démontré une régulation stricte du rapport acide linoléique/chlorophylle chez l'Euglène; ce fait peut avoir de profondes implications dans le mécanisme de la photosynthèse; cependant les modalités de cette régulation restent en grande partie à démontrer.

Les premières analyses montrent que l'acide linoléique synthétisé est incorporé très spécifiquement dans les molécules de galactolipides, alors que l'acide linoléique se concentre dans les phospholipides; il existe donc dans la feuille des systèmes de régulation très fins des désaturations. Cette régulation peut simplement résulter d'une différence de la localisation cellulaire des désaturases conduisant à la synthèse des phospholipides riches en acide linoléique d'une part et des galactolipides riches en acide linoléique d'autre part. Cependant récemment Kannangara et Stumpf<sup>18</sup> ont montré que dans les plastes de jeunes feuilles d'Epinard la formation de l'acide linoléique était inhibée par le cyanure alors que la formation de l'acide linoléique ne l'était pas. On peut donc penser que en un même site cellulaire il existe deux systèmes enzymatiques de désaturation distincts pour la formation des galactolipides et des phospholipides.

<sup>17</sup> A. K. STOBART, P. R. SHEWRY et D. R. THOMAS, *Phytochem.* **11**, 571 (1972).

<sup>18</sup> C. G. KANNANGARA et P. K. STUMPF, *Arch. Biochem. Biophys.* **148**, 414 (1972).

A partir des résultats obtenus dans nos expériences, il est possible de proposer le schéma de biosynthèse hypothétique suivant:



De très nombreux points demeurent inconnus: (a) comment se forme l'acide oléique? (les cinétiques semblent exclure une désaturation directe de l'acide stéarique); et (b) dans quelle molécule cet acide oléique se trouve-t-il intégré? les désaturations successives se produisent-elles avant, pendant ou après l'intégration de l'acide gras dans les molécules de phospholipides et de galactolipides?

Des études ultérieures au niveau des différentes catégories lipidiques devraient permettre d'éclaircir ces points.

### EXPERIMENTALE

**Matériel végétal.** Les pois (*Pisum sativum* L.) de la variété Alaska, sont mis à germer et cultivés sur terreau à 22°, soit à l'obscurité totale, soit à la lumière ordinaire (photopériode de 9 hr).

**Fourniture des précurseurs radioactifs.** 5  $\mu$ l d'une solution d'acétate-1- $^{14}$ C à 100  $\mu$ Ci/ml sont déposés sur chaque feuille. Après 20 hr d'incubation (soit à l'obscurité, soit à la lumière), les feuilles sont prélevées et plongées dans MeOH bouillant. Le  $^{14}$ CO<sub>2</sub> est libéré dans une enceinte fermée par action H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré sur du  $^{14}$ C-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; la radioactivité spécifique de l'atmosphère est de 100  $\mu$ Ci par litre; on arrête la réaction en fixant le CO<sub>2</sub> restant par l'hyamine.

**Dosage des chlorophylles.** Les chlorophylles totales sont dosées selon McKinney.<sup>19</sup>

**Préparation et analyse des acides gras.** Les lipides sont extraits par le CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1).<sup>20</sup> On saponifie et méthyle les acides gras en présence de BF<sub>3</sub>-MeOH.<sup>21</sup> La radioactivité totale des esters méthyliques est déterminée par comptage en scintillation liquide. L'acide linoléique est dosé en ajoutant une quantité connue d'heptadécanoate de méthyl comme témoin interne. Ces esters méthyliques sont ensuite analysés par radiochromatographie en phase gazeuse (radiochromatographie Barber-Colman, série 5000); La séparation est effectuée à une température constante de 210° sur colonne de butane-diol-succinate (longueur 3 m, largeur 0,25 de pouce; 20% d'imprégnation sur chromosorb W). Pour étudier la répartition du linoléate dans les catégories lipidiques, on fractionne les lipides totaux par chromatographie sur couche mince de gel de silice: premier développement jusqu'à mi-hauteur de la plaque dans l'acétone-HOAc-H<sub>2</sub>O (100:2:1); puis après séchage sous azote on effectue un deuxième développement dans l'EtOAc-HOAc-H<sub>2</sub>O (70:30:0,5); les bandes visualisées à la rhodamine 6 G, sont grattées et on en analyse les acides gras.

<sup>19</sup> C. McKINNEY, *J. Biol. Chem.* **132**, 90 (1940).

<sup>20</sup> E. G. BLIGH et W. S. DYER, *Can. J. Biochem. Biophys.* **37**, 911 (1959).

<sup>21</sup> L. D. METCALFE, A. A. SCHMITZ et J. P. PELKA, *Analyt. Chem.* **38**, 514 (1966).