

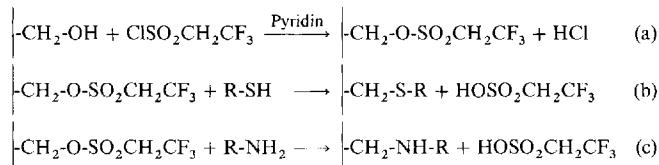
- Pochan, J. M. J. Fréchet, *ibid.* 1993, 26, 1514; G. R. Newkome, J. K. Young, G. R. Baker, R. L. Potter, L. Audoly, D. Cooper, C. D. Weis, K. Morris, C. S. Johnson, *ibid.* 1993, 26, 2394; Y. Guo, K. H. Langley, F. E. Karasz, *ibid.* 1992, 25, 4902; C. J. Hawker, K. L. Wooley, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 4375; P. M. Saville, J. W. White, C. J. Hawker, K. L. Wooley, J. M. J. Fréchet, *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 293; N. J. Turro, J. K. Barton, D. A. Tomalia, *Acc. Chem. Res.* 1991, 24, 332.
- [3] G. R. Newkome, C. N. Moorefield, *Adv. Dendritic Macromol.* 1993, 1, 1; H. Mekelburger, W. Jaworek, F. Vögtle, *Angew. Chem.* 1992, 104, 1609; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992, 31, 1571; H. B. Mekelburger, K. Rissanen, F. Vögtle, *Chem. Ber.* 1993, 126, 1161; D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W. A. Goddard III, *Angew. Chem.* 1990, 102, 119; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990, 29, 138.
- [4] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1990, 1010; C. J. Hawker, J. M. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 7638.
- [5] K. L. Wooley, C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 4252.
- [6] R. Spindler, J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1993, 913.
- [7] C. J. Hawker, K. L. Wooley, J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1993, 1287.

Ein neuer Reaktionsmechanismus für die Kupplung von Nucleophilen an Agarose mit 2,2,2-Trifluorethansulfonylchlorid **

Anastasios Demiroglou, Cornelia Bandel-Schleßelmann und Herbert P. Jennissen *

Sulfonylchloride wie Tosylchlorid und 2,2,2-Trifluoroethansulfonylchlorid (Tresylchlorid^[11]) gehören zu den am weitesten verbreiteten Reagentien für nucleophile Reaktionen. Vor über zehn Jahren wurde die Tresylchloridmethode zur Synthese von Trägermaterialien zur Affinitätschromatographie eingeführt^[2]. Heute wird Tresylchlorid in vielen Bereichen zur Aktivierung

fester Phasen mit primären Hydroxygruppen und anschließender Kupplung mit primären Aminen oder Thiolen eingesetzt^[3–14]. Gleichung (a) beschreibt die „Tresylierung“ einer festen Phase, z.B. des Polysaccharids Agarose (Tresyl-Agarose, Tresyl-Sepharose)^[2]. Man nahm bisher an^[2], daß die anschließende Kupplung von Thiolen und Aminen nach Gleichung (b) bzw. (c) abläuft.



Der in den Gleichungen (a)–(c) implizierte Mechanismus wurde jedoch nie bewiesen^[12–5, 10]. Die unerwarteten Proteinbindungseigenschaften der mit Tresylchlorid hergestellten Alkylthioagarosen^[14–16] veranlaßten uns, den Reaktionsmechanismus durch systematische Elementaranalysen der Endprodukte zu überprüfen. Die Elementaranalysen der Kupplungsprodukte von Tresylagarose stehen im Widerspruch zu den Gleichungen (b) und (c)^[16], die, wie sich im Verlauf der Arbeiten herausstellte, falsch sind.

Eine typische Analyse der Kupplungsprodukte, die nach Tresylchlorid-Aktivierung von Sepharose 4B erhalten werden, ist in Tabelle 1 gezeigt. In den Experimenten 1–5 kann die kovalente Tresylierung der Sepharose leicht anhand der Schwefelanalyse verfolgt werden. Diese Befunde stehen in Einklang mit denen von Mosbach und Nilsson^[2]. Durch SIMS-Analysen (Exp. 1 und 2) kann ein dem Fluor des Tresylrestes entsprechendes Signal an Tresyl-Sepharose nachgewiesen werden. Eine Kupplung

Tabelle 1. Analyse der Produkte der Kupplung von Tresylchlorid-aktivierter Sepharose mit Butanthon und Butylamin [a].

Experiment	Ausgangsmaterial		Reaktion mit	Produkt					
	Tresyl-Sepharose			Elementaranalysen	Schwefel	Stickstoff	eingebaute Butylreste, ¹⁴ C-Analyse	SIMS-Analyse [b]	
	Schwefelanalyse	F [−] -Intensität							
1	328	2070	0.487	Butanthon	697	0	426	46	
2	863	3874	NB	Butanthon	1628	0	604	382	
3	251	NB	NB	Butanthon	488	0	328	NB	
				Butylamin	NB	NB	342	NB	
4	906	NB	NB	Butanthon	1933	0	1073	NB	
				Butylamin	850	814	871	NB	
5	992	NB	NB	Butanthon	2023	0	1151	NB	
				Butylamin	907	1000	957	NB	

[a] Die Aktivierung von Sepharose 4B mit Tresylchlorid und die Kupplung mit Butylthiol oder -amin sind in Lit. [14] und im Text beschrieben. Zu den Elementaranalysen (S, N) siehe Experimentelles und zur ¹⁴C-Traceranalyse siehe Lit. [22]. Für weitere Einzelheiten siehe Experimentelles und Text. NB: nicht bestimmt. [b] SIMS-Analyse: Die Kontrollwerte für unsubstituierte Sepharose 4B (siehe Tabelle 2, Exp. 1) wurden subtrahiert.

[*] Prof. Dr. H. P. Jennissen, A. Demiroglou, C. Bandel-Schleßelmann
Institut für Physiologische Chemie der Universität-Gesamthochschule
Hufelandstraße 55, D-45122 Essen
Telefax: Int. + 201/723-4694

[**] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie (Förderkennzeichen: 07024610) und von der Europäischen Gemeinschaft (EC Joint Research Project CT1*-CT91-0888) gefördert. Wir danken Dipl.-Ing. H. Bandmann (Institut für Organische Chemie der Universität-Gesamthochschule Essen) für die Messung der ¹H-NMR- und ¹⁹F-NMR-Spektren, Dr. M. K. Otto und Prof. Dr. J. Wissler (Fraunhofer-Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart) für die Bestimmung von Fluorid, Dr. C. Plog (Dornier GmbH, Friedrichshafen) für die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS)-Messungen, G. Brauner und V. Hiltenkamp (Institut für Mikroanalytik der Universität-Gesamthochschule Essen) für die Elementaranalysen von Stickstoff und Schwefel und Dr. E. Logemann (Freiburg) für Diskussionen.

lung mit Butanthon (Exp. 1–5) führt zu einer Abnahme des SIMS-Fluorsignals um den Faktor 45 in Experiment 1 und um den Faktor 10 in Experiment 2, was in beiden Fällen in Einklang mit der Freisetzung des 2,2,2-Trifluorethansulfonäurerestes steht. Die weitere Produktanalyse (Tabelle 1) zeigt jedoch, daß der Schwefelgehalt nach der Kupplung nicht wie erwartet konstant geblieben, sondern in allen Experimenten um den Faktor zwei angestiegen ist. Der Anstieg im Schwefelgehalt des Gels entspricht genau der Menge kovalent eingebauter ¹⁴C-Butylthioreste, was auf ein 1:1-Verhältnis von ursprünglich vorhandenem Tresylchloridschwefel zu Alkylthioschwefel hinweist. Ein sehr ähnliches Ergebnis erhält man, wenn Butylamin an Tresyl-Sepharose (Exp. 3–5) gekuppelt wird. In diesen Fällen

Tabelle 2. SIMS-Fluoridanalyse von Tresyl- und Butyl-Sepharose vor und nach NaOH-Behandlung [a].

Experiment	Sepharose-Ausgangsmaterial		Reaktion mit	Schwefelanalyse [µg-Atom/g trockenes Gel]	Produkt		
	Schwefelanalyse [µg-Atom/g trockenes Gel]	SIMS-Analyse F ⁻ -Intensität			F ⁻ /CH ₂	F ⁻ /CH ₂	
1. Sepharose-4B-Kontrolle	0	30	0.010	—	—	—	
2. Tresyl-Sepharose	469 [b]	2824	—	NaOH	NB	40	
3. Tresyl-Sepharose	328	2070	0.497	NaOH, anschließend Kupplung mit Butanthonol	294 [c]	29	0.007
4. Butyl-Sepharose	1628	382	—	NaOH	1359	134	NB

[a] Sepharose 4B wurde aktiviert und mit Butanthonol gekuppelt wie im Experimentellen, im Text und in der Legende zu Tabelle 1 beschrieben wurde. An den gleichen Stellen findet man auch weitere Einzelheiten zur Analyse der Gels. SIMS-Analyse: In Exp. 2–4 wurden die Kontrollwerte für unsubstituierte Sepharose (Exp. 1) von den Meßwerten subtrahiert. NB: nicht bestimmt. [b] Berechnet aus dem Einbau von ¹⁴C-Butanthonol (605 µmol/g trockenes Gel) und dem Verhältnis eingebauter Butylreste/Schwefel der Tresyl-Sepharose von 1.29 (Exp. 1, Tabelle 1). [c] Berechnet auf der Grundlage des Trockengewichtes der entsprechenden Tresyl-Sepharose. [d] Vor NaOH-Behandlung betrug der Einbau an ¹⁴C-Butanthonol 604 µmol/g trockenes Gel (siehe Exp. 2, Tabelle 1).

ist der Schwefelgehalt vor und nach der Kupplung gleich, der ¹⁴C-Butylamineinbau erfolgt stöchiometrisch (siehe auch Stickstoffgehalt). Ähnliche Einbauergebnisse erhält man, wenn die Kupplung statt in NaOH (pH 13.3) bei pH 8.0 wie in Lit.^[12] beschrieben erfolgt. Die Ergebnisse in Tabelle 1 beweisen, daß das Schwefelatom des Tresylchlorids nicht zur Austrittsgruppe bei der Kupplungsreaktion gehört.

Tabelle 2 zeigt, daß bereits eine Alkalibehandlung (0.5 M NaOH, 24 h) allein zu einem Verlust der Fluoratome führt, was sich in einer Intensitätsabnahme des SIMS-Signals um den Faktor 70 (Exp. 2 und 3) widerspiegelt; der Schwefelgehalt verändert sich dabei nicht (Exp. 3 und 4). Alkalibehandelte Tresyl-Sepharose (Exp. 3) ist nicht mehr in der Lage, ¹⁴C-Butanthonol zu kuppeln. Dagegen führt eine 24stündige Alkalibehandlung des Kupplungsendproduktes, Butyl-Sepharose, lediglich zu einem 14–17%igen Verlust von Schwefel und ¹⁴C-Butylresten, was auf eine recht stabile kovalente Bindung zwischen Gelmatrix und Alkylresten hinweist.

Da Verunreinigungen des verwendeten Tresylchlorids ausgeschlossen werden konnten (¹H-NMR- und ¹⁹F-NMR-Analysen des Tresylchlorids ergaben nur das jeweils erwartete Quartett bzw. Triplet als Hinweis für eine 99%ige Reinheit); stellte sich die Frage nach der Natur der Austrittsgruppe. Eine Möglichkeit war, daß 1,1,1-Trifluorethan, ein unlösliches und praktisch inertes Gas, freigesetzt wird. Durch manometrische Messungen während der Alkalihydrolyse verschiedener Tresyl-Sepharosen konnte mit einem Warburg-Apparat^[16] jedoch keine Gasentwicklung nachgewiesen werden. Daher wurden ¹⁹F-NMR-Analysen der flüssigen Phase nach Alkalihydrolyse der Tresyl-Sepharosen und nach der Kupplung von Butanthonol und Butylamin durchgeführt. Im ¹⁹F-NMR-Spektrum läßt sich zwischen $\delta = +115$ und $\delta = -235$ nur ein einziges Singulett bei $\delta = -119.5$ bis -119.7 nachweisen (Abb. 1 A–D), was zweifelsfrei zeigt, daß anorganisches Fluorid als einziges Fluor-Endprodukt unter allen verwendeten Bedingungen der Hydrolyse und Kupplung von Tresyl-Sepharosen entsteht. Der zusätzliche Peak bei $\delta = -75.5$ in Abbildung 1 D ist auf eine Verunreinigung (6.7% des gesamten Signals) im verwendeten Butylamin zurückzuführen.

Als aufgrund der ¹⁹F-NMR-Spektren feststand, daß Natriumfluorid die einzige Fluorverbindung war, die bei der Alkalibehandlung von Tresyl-Sepharose freigesetzt wurde, konnten quantitative F⁻-Bestimmungen durchgeführt werden (Tabelle 3). Fluorid wird in einem Verhältnis F/S von ca. 3:1 freigesetzt, was eine ca. 100%ige Umsetzung von organischen zu

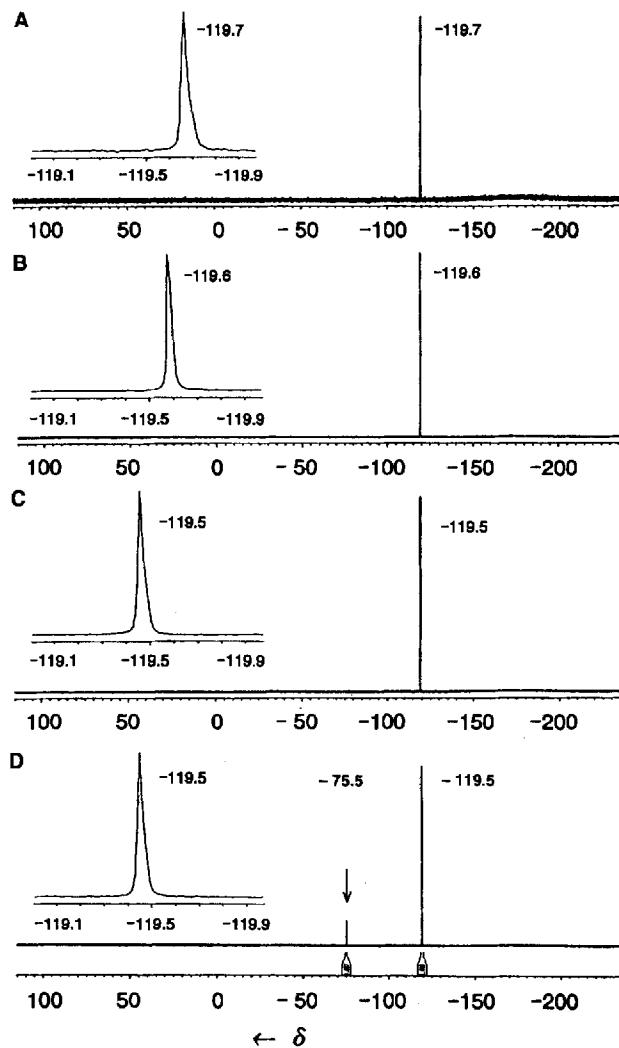


Abb. 1. ¹⁹F-NMR-Spektren der flüssigen Phase aus Reaktionsansätzen von Tresyl-Sepharose in alkalischer Medium. Die Messung der Spektren erfolgte mit CFCl_3 als externer Standard. Die eingefügten Spektren wurden bei einer Auflösung von 30 Hz cm^{-1} gemessen. Die Zahlen an den Peaks geben die chemischen Verschiebungen an. Der Pfeil in D weist auf eine Verunreinigung der Butylaminlösung hin. Weitere Einzelheiten sind in Tabelle 3 und im Text angegeben. A) 48 mM NaF in 1 M NaOH; B) flüssige Phase von Tresyl-Sepharose (1.67 mg-Atom Schwefel/g trockenes Gel) nach Hydrolyse in 0.5 M NaOH; C) flüssige Phase von Tresyl-Sepharose (1.67 mg-Atom Schwefel/g trockenes Gel) nach Kupplung in 0.21 M Butylthiol und 0.5 M NaOH; D) flüssige Phase von Tresyl-Sepharose (1.67 mg-Atom Schwefel/g trockenes Gel) nach Kupplung in 0.21 M Butylamin und 0.5 M NaOH.

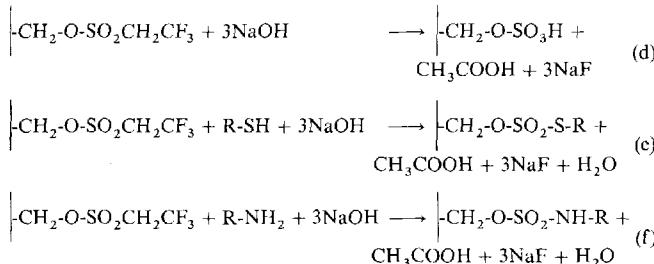
Tabelle 3. Bestimmung von anorganischem Fluorid in der flüssigen Phase nach alkalischer Hydrolyse und Kupplung von Tresyl-Sepharose mit Butanthon und Butylamin [a].

Experiment	Ausgangsmaterial Tresyl-Sepharose Schwefelanalyse [mg-Atom/g trockenes Gel]	Reaktion mit	Elementaranalyse Schwefel [mg-Atom/g trockenes Gel]	Elementaranalyse Stickstoff	Produktanalyse eingebaute Butylreste ¹⁴ C-Analyse [mmol/g trockenes Gel]	anorg. Fluorid [mmol/g trockenes Gel]
1	1.67	NaOH	2.01	0	-	5.80
2	1.67	Butanthon	3.50	0	1.96	5.11
3	1.67	Butylamin	1.81	1.73	1.58	5.77

[a] Für weitere Einzelheiten zu präparativen und analytischen Verfahren (Fluoridbestimmung) siehe Experimentelles, Legenden zu den Tabellen 1 und 2 sowie Abbildung 1 und Text.

anorganischem Fluorid beweist (Tabelle 3). Das Auftreten von Fluorid bei der Hydrolyse von Tresyl-Sepharose wurde kürzlich auch von Ohata et al.^[17] nachgewiesen, die aber den klassischen Reaktionsmechanismus der Tresylchlorid-Aktivierung und -kupplung [Gl. (a)–(c)] nicht anzweifeln.

Es stellt sich nun die Frage, welcher organische Rest als Austrittsgruppe bei der Tresylchloridreaktion fungiert. In diesem Zusammenhang sind die Arbeiten von Jones^[19] und Buxton et al.^[20] von großem Interesse, da sie zeigten, daß in Alkali eine kombinierte Additions-Eliminierungs-Reaktion der Trifluormethylgruppe von *o*- und *p*-substituierten Benzotrifluoriden^[19] oder auch von α -Trifluormethylpropionsäure^[20, 21] unter Bildung einer Carboxygruppe und Natriumfluorid stattfinden kann. Daher lag der Schluß nahe, daß Essigsäure die von uns gesuchte organische Austrittsgruppe ist. Wir schließen deshalb aus den Befunden, daß bei der Reaktion von Tresyl-Sepharose mit nucleophilen Verbindungen in alkalischem Medium eine Additions-Eliminierungs-Reaktion unter Bildung von Essigsäure und Fluorid abläuft. Die Gleichungen (d)–(f) beschreiben die Reaktion von Tresyl-Sepharose in Alkali allein, mit Thiolen bzw. mit Alkylenaminen, wobei ein Sulfat (überprüft durch Titration der Säureäquivalente), ein Thiosulfat bzw. ein Sulfamat gebildet wird.



Experimentelles

Präparative Methoden: Die Bedingungen für die Aktivierung von Agarose (Sepharose 4B, Pharmacia/LKB, Freiburg) mit Tresylchlorid (Fluka, Neu-Ulm) sind in Lit. [14] beschrieben. Aus Umweltschutzgründen wurde das wasserfreie Dioxan [14] durch wasserfreies Aceton ersetzt. Die Kupplung von Tresyl-Sepharose mit Butanthon oder Butylamin erfolgte wie in Lit. [14] beschrieben. In einer typischen Präparation wurden 10 g (Naßgewicht) Tresyl-Sepharose zu 18 mL einer Lösung von 0.43 M Thiol oder 0.43 M Amin in 1 M NaOH in einer verschlossenen Flasche zugegeben. Die Endkonzentrationen des Ansatzes nach Zugabe der Sepharose betrugen 0.28 M sowohl für das Thiol als auch für das Amin und 0.64 M für NaOH. Die Ansätze wurden 60 min im Falle des Thiols bei Raumtemperatur und im Falle des Amins bei 5 °C inkubiert. Wird das Alkylenamin ebenfalls bei Raumtemperatur gekuppelt, erhält man praktisch die gleichen Ergebnisse. Nach der Kupplung wird das Gel auf einem Büchner-Trichter mit ca. 20 Gelfvol. Wasser, Aceton/Wasser (1:3, v/v), Aceton/Wasser (3:1, v/v) und schließlich mit reinem Aceton gewaschen, bis der Thiol- oder Amineruch verschwunden ist. Danach wird das Gel durch eine Umkehrung des Waschverfahrens wieder in das wäßrige Medium zurückgeführt. Für die alkalische Hydrolyse werden 15 g Tresyl-Sepharose oder Alkyl-Sepharose (Naß-

gewicht [22]) zu 15 mL 1 M NaOH gegeben und zwischen 2.5 und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. In früheren Experimenten wurde 24 h hydrolysiert, bis sich herausstellte, daß die Reaktion bereits nach 1–2.5 h abgelaufen war. Zur Analyse der Produkte wurde die feste Gelphase auf einem Büchner-Trichter von der flüssigen Phase getrennt. Alle weiteren Methoden zur Präparation und Handhabung der Agarose sind in Lit. [14] beschrieben.

Analytische Methoden: 1. Die Elementaranalysen des Schwefels und Stickstoffs (Doppelbestimmungen) wurden gaschromatographisch auf einem Carlo-Erba-Strumentazione-Elemental-Analyzer Modell 1106 durchgeführt. 2. Die ¹H-NMR-Spektren wurden auf einem hochauflösenden Bruker-AMX-300-NMR-Spektrometer (282 MHz) in CDCl₃ aufgenommen. Die ¹⁹F-NMR-Spektren wurden auf derselben Maschine mit CFCl₃ als externem Standard (max. Auflösung 30 Hz cm⁻¹ für die eingefügten Spektren in Abb. 1) aufgenommen. 3. Fluorid wurde mit einem modifizierten Durchflußinjektionshalogensensor mittels einer Lanthanfluoridfestphasenelektrode [23] bestimmt. Die Empfindlichkeit war höher als 10⁻⁷ M Fluorid. 4. Die SIMS-Analysen wurden an einem Böltz-SIMS-Gerät mit QMG-511 durchgeführt. Die Ar⁺-Ionen (3 keV, 10⁻⁹ A 0.1 cm⁻²) wurden in einem Winkel von 60° gegen die Probe gerichtet. Die Ladung wurde durch einen zusätzlichen Elektronenstrahl kompensiert. Die Sepharosekügelchen wurden lyophilisiert und an einem leitenden lösungsmittelfreien doppelseitigen Klebestreifen fixiert. Das Massenspektrum wurde in einem Bereich von 0–100 u für positive und negative Sekundärionen erhalten. 5. Zur Bestimmung des Substitutionsgrades der Gele wurden 0.05–0.25 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$ *n*-[¹⁴C]-Butanthon (NEN) [14] oder *n*-[¹⁴C]-Butylamin (Hoechst AG) dem Kupplungsansatz zugesetzt (wie in Lit. [22] beschrieben). Die Menge des gekupplten Alkylrestes wurde nach Säurehydrolyse der *n*-[¹⁴C]-Butyl-markierten Agarose (farbloses Hydrolysat) mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt [22]. Die Analysen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Eingegangen am 6. Juli 1993 [Z 6200]

- [1] R. K. Crossland, W. E. Wells, V. J. Shiner, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4217–4219.
- [2] K. Mosbach, K. Nilsson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *102*, 449–457.
- [3] K. Nilsson, P. O. Larsson, *Anal. Biochem.* **1983**, *134*, 60–72.
- [4] K. Nilsson, K. Mosbach, *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *26*, 1146–1154.
- [5] K. Nilsson, K. Mosbach, *Methods Enzymol.* **1984**, *104*, Part C, 56–69.
- [6] C. F. Mandenius, S. Welin, B. Danielsson, I. Lundstrom, K. Mosbach, *Anal. Biochem.* **1984**, *137*, 106–114.
- [7] W. H. Scouten, W. van den Tweel, D. Delhaes, H. Kranenberg, M. Dekker, *J. Chromatogr.* **1986**, *376*, 289–298.
- [8] K. I. Allam, M. Ehrat, D. Cecchini, B. A. Warden, R. W. Giese, *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 171–177.
- [9] P. Wikstrom, P. O. Larsson, *J. Chromatogr.* **1987**, *388*, 123–134.
- [10] K. Nilsson, K. Mosbach, *Methods Enzymol.* **1987**, *135*, Part B, 65–78.
- [11] K. Ernst-Cabrera, M. Wilchek, *J. Chromatogr.* **1987**, *397*, 187–196.
- [12] S. Tay, E. W. Merrill, E. W. Salzman, J. Lindon, *Biomaterials* **1989**, *10*, 11–15.
- [13] M. A. Desai, A. Lyddiatt, *Bioseparation* **1990**, *1*, 43–58.
- [14] A. Demiroglou, H. P. Jennissen, *J. Chromatogr.* **1990**, *521*, 1–17.
- [15] H. P. Jennissen, A. Demiroglou, *J. Chromatogr.* **1992**, *597*, 93–100.
- [16] A. Demiroglou, H. P. Jennissen, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1993**, *374*, 763.
- [17] T. Ohata, Y. Tairyo, S. Takitani, *Chromatographia* **1993**, *35*, 321–324.
- [18] O. Warburg, *Stoffwechsel der Tumore*, Springer, Berlin, **1926**.
- [19] R. G. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 2346–2350.
- [20] W. M. Buxton, M. Stacey, J. C. Tatlow, *J. Chem. Soc. London*, **1954**, 1054, 366–374.
- [21] M. Hudlický, *Organic Fluorine Chemistry*, Plenum, New York, **1971**, 110.
- [22] H. P. Jennissen, L. M. G. Heilmeyer, Jr., *Biochemistry* **1975**, *14*, 454–460.
- [23] W. Wiesner, M. K. Otto, K. D. Kulbe, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, *589*, 705–711.