

**132. Synthese von {2-[3-(2-Ammonioethoxy)benzoyl]ethyl}-
trimethylammonium-bromid-hydrobromid für die Affinitätschromatographie
von Cholin-Acetyltransferase
(ChAT; EC 2.3.1.6)**

von Gaetano Riggio*, Alexander Josef Raeber und Wolfgang Herbert Hopff

Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, Gloriastrasse 32, CH-8006 Zürich

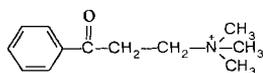
(9. V. 89)

**Synthesis of {2-[3-(2-Ammonioethoxy)benzoyl]ethyl}trimethylammonium Bromide Hydrobromide for the
Affinity Chromatography of Choline Acetyltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6)**

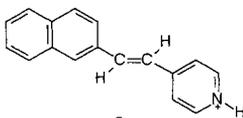
ChAT is an essential enzyme that catalyzes the synthesis of acetylcholine from choline and activated acetic acid. For the affinity chromatography or biospecific adsorption, only those ligands are suited, which resemble the natural substrate. The ligands, however, cannot be bound directly to the matrix, but must be separated by a covalently bound spacer. Contrary to the often cited desorption by ionic gradients, we used the most specific desorption by the same ligand. The synthesis comprises seven steps starting from 3-hydroxyacetophenone (7).

1. Einleitung. – Das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6) katalysiert die Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin aus Acetyl-Coenzym A und Cholin. Die ChAT stellt ein klassisches Enzym dar, das aus Apoenzym und Coenzym besteht. Das Apoenzym besteht aus dem Protein-Träger. Bei dem Coenzym handelt es sich um den Acetyl-Donor Acetyl-Coenzym A. Da bis heute verhältnismässig wenig über die Struktur des Enzyms aus Wirbeltieren bekannt ist, entschlossen wir uns, das Enzym aus elektrischen Organen des Zitterrochen *Torpedo marmorata* zu isolieren. Elektrische Organe stellen ein ideales Ausgangsmaterial für die ChAT-Isolierung dar, da sie unter verschiedenen Nervengewebe aus Wirbeltieren die höchsten ChAT-Konzentrationen aufweisen [1]. Herkömmliche Methoden der Protein-Reinigung führten nur zu teilweise gereinigten ChAT-Preparationen [2] [3]; deshalb wurde das Enzym durch Affinitätschromatographie mit einem spezifischen ChAT-Inhibitor als Affinitätsligand isoliert. Die bekannten Inhibitoren der ChAT lassen sich in drei Gruppen einteilen.

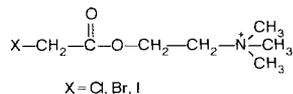
(2-Benzoyl)ethyl)trimethylammonium-chlorid (BETA; **1**), ein Keto-Analog von Acetylcholin wurde von Rowell *et al.* [4] auf seine inhibitorischen Eigenschaften auf die ChAT untersucht. BETA ist ein stabiler Inhibitor der ChAT [4], mit einer IC_{50} von $(9,9 \pm 1,3) \times 10^{-6}$ M [5]. Strukturell lässt sich BETA zwischen den Grundstrukturen der zwei schon bekannten Gruppen von ChAT-Inhibitoren einordnen, den Styrylpyridinen einerseits und den halogenierten Derivaten des Acetylcholins andererseits.



1



2



X = Cl, Br, I

3

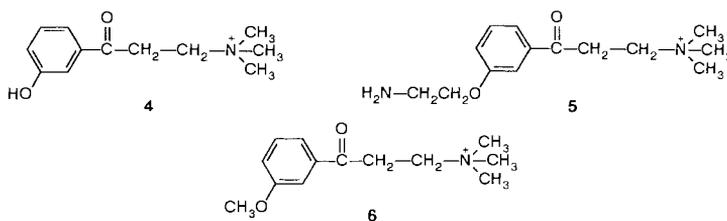
Von den Styrylpyridinen [6] zeigte 4-[2-(2-Naphthyl)vinyl]pyridin (NVP; **2**; $IC_{50} \approx 10^{-6} \text{ M}$) die besten inhibitorischen Eigenschaften auf die ChAT [7] [8]. Der Nachteil dieser Substanzgruppe ist ihre Lichtempfindlichkeit und der damit verbundene schnelle Wirkungsverlust infolge einer beträchtlichen Photoisomerisierung der stark-wirksamen (*E*)- in die schwach-wirksame (*Z*)-Form [9].

Die monohalogenierten Acetylcholin-Derivate **3** von *Chiou* und *Sastry* [10] wurden auf ihre pharmakologischen Eigenschaften untersucht [11]. Chloro-, Bromo- und Iodoacetylcholin stellten sich als starke Inhibitoren der ChAT heraus ($IC_{50} \approx 10^{-7} - 10^{-6} \text{ M}$) [11] [12]. Diese Substanzen hydrolysieren aber bereits in wässriger Lösung und werden zusätzlich im biologischen Milieu durch Cholinesterasen katalytisch gespalten [13].

Sowohl die Styrylpyridine als auch die halogenierten Acetylcholin-Derivate haben zwei Strukturelemente gemeinsam: einen endständigen kationischen Kopf und am anderen Molekül-Ende eine Struktur, die die Delokalisierung einer partiellen negativen Ladung ermöglicht. Auch BETA (**1**) weist diese beiden Strukturelemente in Form des quaternären Ammonium-Kopfes einerseits und des Benzoyl-Restes andererseits auf.

Die Bindungspolarität der (C=O)-Gruppe hat einen partiellen Elektronenunterschuss auf dem (C=O)-C-Atom zur Folge, der durch Einführung von weiteren elektronenanziehenden Atomen (z. B. Halogene in Halogen-Acetylcholin) oder Gruppen (z. B. Ph-Gruppe in BETA) im Bindungsbereich des (C=O)-C-Atoms verstärkt werden kann. *Raeber* [14] untersuchte die Struktur-Aktivitäts-Beziehung einer Reihe von Ph-substituierten BETA-Derivaten und zeigte eine direkte Korrelation zwischen der Wirkungsstärke der ChAT-Inhibitoren und der Natur und Position der Substituenten am Ph-Ring, ausgedrückt durch die Substituenten-Konstante σ nach *Hammett* [15]. Je grösser die Möglichkeit der Lokalisierung einer partiellen positiven Ladung auf dem (C=O)-C-Atom ist, desto stärker ist der Inhibitor.

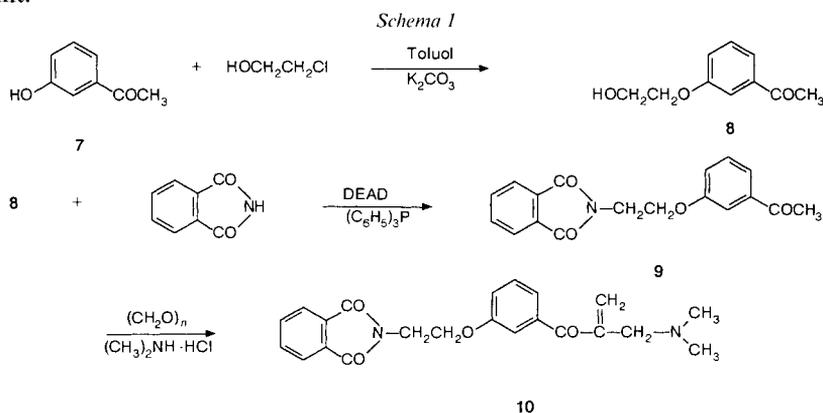
Infolge ihrer beträchtlichen Instabilität eignen sich weder die Styrylpyridine noch die halogenierten Acetylcholin-Derivate als Ligand für die Affinitätschromatographie des Enzyms ChAT. Einzig der stabile und reversible ChAT-Inhibitor BETA (**1**) lässt sich als Affinitätsligand verwenden. Da BETA (**1**) über keine geeignete funktionelle Gruppe verfügt, um an einen festen Träger gekoppelt zu werden, musste der Inhibitor so modifiziert werden, dass er, ohne die für die Aktivität erforderliche Struktur zu beeinflussen, an einem Träger fixiert werden konnte. Die Hydroxylierung des Ph-Rings von BETA (**1**) in *meta*-Stellung ergab einen Inhibitor, **4**¹⁾, mit besserer Hemmwirkung (IC_{50} von $(6,6 \pm 1,5) \cdot 10^{-6} \text{ M}$ [5]) als BETA.



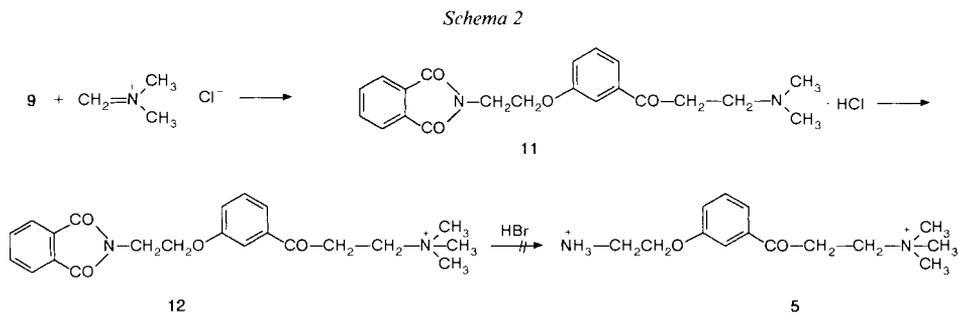
¹⁾ **4**: Weisse Plättchen aus MeOH und Tierkohle. Schmp. 220–221° ([16]: 203–206°). **6**: Schneeweisse Prismen aus abs. EtOH/abs. MeOH 3:1 bei –10°. Schmp. 160–161° ([16]: 143–145°). Die C,H,N-Analyse sowie die Br-Titration gaben sehr gute Resultate. Kleine Verunreinigungen erniedrigten in beiden Fällen den Schmelzpunkt sehr stark, womit die Unterschiede mit den Literaturangaben erklärt sind.

Die Alkylierung der OH-Gruppe von **4** (\rightarrow **6'**) zeigte keinen Einfluss der Me-Gruppe auf die inhibitorischen Eigenschaften (IC_{50} von $(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$ M [5]). Aus diesem Grund wurde **5** als geeigneter Ligand für die Affinitätschromatographie des Enzyms ChAT synthetisiert.

Ausgehend von 3-Hydroxyacetophenon (**7**) versuchten wir zuerst über verschiedene Zwischenstufen, unter anderen über **9** und **12**, den Liganden **5** zu synthetisieren. Verbindung **7** wurde mit 2-Chloroethanol in Toluol in **8** übergeführt (*Schema 1*) [17] [18], anschliessend die OH-Gruppe durch den Phthalimido-Rest substituiert (\rightarrow **9**), und zwar mit Ph_3P und DEAD bei ungewöhnlich hoher Temperatur [19–21], da bei Raumtemperatur keine Reaktion stattfand. Verbindung **9** reagierte unter normalen *Mannich*-Reaktionsbedingungen nicht, sondern erst mit einem Überschuss der *Mannich*-Komponente bei hoher Temperatur und längerer Reaktionszeit. Allerdings wurde nicht die gewünschte Verbindung **11** isoliert, sondern **10**. Ähnliche Resultate sind bereits aus der Literatur [22] bekannt.

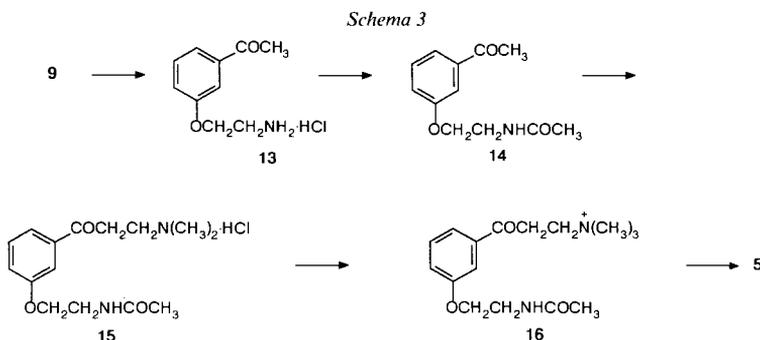


Reines **11** (*Schema 2*) erhielt man nur durch Reaktion von **9** mit dem reaktiveren *Eschenmoser's* Salz [23] [24]. Die Base von **11** wurde mit MeBr zu **12** quaternisiert [16] [25]. Die anschliessende Hydrolyse zu **5** verlief jedoch negativ und unter drastischen Bedingungen (*ca.* 100 h Kochen mit HBr in $H_2O/AcOH$ [26] [27]) erhielt man nur Zersetzungsprodukte. Die basische Hydrolyse lässt sich wegen der *Retro-Mannich*-Reaktion nicht anwenden [28], aber auch wegen des gleichzeitigen *Hofmann'schen* Abbaus des quaternären Ammonium-Salzes zu Aryl-vinyl-keton [4] [16] [25] und schliesslich auch



wegen der bekannten Alkali-Empfindlichkeit der Ketone allgemein. Auch die Hydrazin-Spaltung [29] ist aus mehreren Gründen unzulässig (z. B. Bildung eines Pyrazol-Ringes und Schwierigkeiten bei der Wiederherstellung und Reinigung des Ketons).

Da die schwere Hydrolysierbarkeit der Phthalimido-Schutzgruppe von **12** die Isolierung von **5** verunmöglichte, entschlossen wir uns die leichter abzuspaltende Acetamido-Gruppe zu verwenden [30]. Durch langes Kochen (*Schema 3*) von **9** in HCl erhielt man **13** und nach Acetylierung der NH₂-Gruppe **14**. Anschliessend erhielt man mit dem *Eschenmoser's* Salz **15** und nach Methylierung in Toluol **16**.



Während dieser letzten Reaktion beobachteten wir auch die Bildung von Me₃N · HBr und **14**. Das Auftreten von **14** und Me₂NH lässt sich durch die *Retro-Mannich*-Reaktion erklären. Nach dem Eindampfen und Trocknen im Vakuum sollte jedoch kein freies Me₂NH und deshalb auch kein Me₃N · HBr im Reaktionsprodukt mehr vorhanden sein. Auch in anderen Lösungsmitteln wurden ähnliche Resultate erhalten. Durch Umkristallisation aus MeCN konnte schliesslich die reine Verbindung **16** isoliert werden, deren saure Hydrolyse das gewünschte Produkt **5** ergab.

Dieses wurde entsprechend bekannten Methoden [31–33] an den Träger gekoppelt. Als Träger wurde *CH-Sepharose 4B* (*Pharmacia*) verwendet. Diese Agarose-Matrix hat den Vorteil, dass sie bereits kovalent gebundene 'C₆-Spacer' enthält [31]. Ausserdem weisen die 'Spacer' eine endständige COOH-Gruppe auf, die unter milden Bedingungen mittels wasserlöslichem Carbodiimid mit der NH₂-Gruppe des Liganden **5** reagieren kann [14].

Die Affinitätschromatographie mit dem neu synthetisierten Ligand **5** wurde für die Isolierung der ChAT aus dem elektrischen Organ von *Torpedo marmorata* erfolgreich eingesetzt. Aus 100 g elektrischem Organ liess sich 20 µg reine ChAT isolieren. Dies entspricht einem Reinigungseffekt um den Faktor 7300 bei einer Ausbeute von 11 %. Die Homogenität des isolierten Enzyms wurde mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecyl-sulfat (*SDS-PAGE*) bestätigt. Durch Eichung der Gele mit Standardproteinen konnte für die ChAT ein Molekulargewicht von 68 000 kilodalton ermittelt werden.

Wir danken der 'GRD' (Nr.39888) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, Herrn *H. Frohofer*, Mikroanalytische Abteilung am organisch-chemischen Institut, Universität Zürich, für die Ausführung der Mikroanalysen, Herrn Dr. *R. Hollenstein* für die Aufnahmen der ¹H- und ¹³C-NMR und Herrn *H. Mändli* für die Aufnahme der Massenspektren.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Schmp.: Nicht korrigiert, Heitzschmikroskop der Fa. Reichert. IR-Spektren: Gerät *Acculab 4* von Beckmann (ν_{\max} in cm^{-1}). ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren: Gerät *Varian XL-200*; chem. Verschiebungen in ppm (δ) relativ zu TMS (0 ppm); Kopplungskonstanten J in Hz. MS: Gerät *Kratos MS25RF* (70 eV); Angaben in m/z (%).

1-[3-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]ethanon (8). Zu einer Mischung aus 54 g (0,4 mol) *3-Hydroxyacetophenon* (7), 60 g K_2CO_3 , 3,5 g NaI und 1 l Toluol tropft man unter Kochen und Rühren innert 30 h eine Lsg. von 201 g (2,5 mol) 2-Chloroethanol in 400 ml Toluol. Das gebildete H_2O wird in einem Wasserabscheider abgetrennt. Während der Reaktion gibt man in regelmässigen Zeitabständen je 5 weitere Portionen einer Mischung von 60 g K_2CO_3 und 3,5 g NaI hinzu. Die Reaktion wird im Lauf der Zeit langsamer (zu lange Reaktionsdauer, z. B. durch langsamere Zugabe von $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, erhöhen die Zersetzungsprodukte stark und erniedrigen deshalb die Ausbeute). Die Reaktionskinetik verfolgt man im GC: (silanierte Kapillarsäule, $l = 16$ m, i.d. = 0,2 mm, 0,125 μm *PS255*; Injektortemp. = 250°, Ofentemp. = 150°, 105 s Isotherm, dann Programm 12°/min; t_R 1,48 min, t_R 2,80 min).

Nach dem Erkalten dekantiert man die Lsg. ab, löst den Rückstand in 800 ml H_2O , trennt die org. Phase ab und extrahiert die wässr. Lsg. nochmals mit Toluol. Die vereinigten org. Phasen wäscht man 2mal mit H_2O , trocknet (MgSO_4), dampft i. RV. ein und destilliert den Rückstand i. V. Sdp. 127°/0,1 mm Hg. Ausbeute 43,74 g (60,75% d.Th.) hellgelbes Öl; Reinheit (GC) 97%. Reinstes, farbloses Produkt wird durch 'flash'-Chromatographie (Kieselgel 100 mesh, Laufmittel (*t*-Bu)OMe; DC: Kieselgel MN, R_f 0,59) und anschliessender Destillation im Kugelrohr erhalten. IR (CHCl_3): 3622m, 3480–3250m (br.), 3083w, 3030w (sh), 3013m, 2970m (sh), 2950m, 2885m, 1678vs, 1600s, 1589s, 1488s, 1461m, 1441vs, 1406w, 1375m (sh), 1361s, 1335m, 1286vs (sh), 1272vs, 1200m, 1164w, 1087m (sh), 1072s, 1038s, 1018m (sh), 994w, 978w, 955w, 937m, 918m, 893m, 872m, 839w, 677m, 660m. ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): 2,44 (s, CH_3); 3,52 (br. s, OH); 3,87 (t, $J = 4,2$, CH_2OH); 4,00 (t, $J = 4,2$, CH_2OPh); 6,99 (ddd, $J = 7,6$, 2,5, 1,0, H-C(4)); 7,22 (t, $J = 7,6$, H-C(5')); 7,31 (dd, $J = 2,5$, 1,0, H-C(2')); 7,40 (dd, $J = 7,6$, 1,0, H-C(6')). ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): 26,4 (q, CH_3); 60,7 (t, CH_2OPh); 69,2 (t, CH_2OH); 113,0 (d, arom. C); 119,7 (d, arom. C); 121,0 (d, arom. C); 129,3 (d, arom. C); 138,0 (s, C(1')); 158,6 (s, C(3')); 198,0 (s, CO). Anal. ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ (180,21): C 66,65, H 6,71; gef.: C 66,59, H 6,79.

1-[3-(2-Phthalimidoethoxy)phenyl]ethanon (9). Verbindung 8 (26,15 g, 145 mmol), Phthalimid (21,24 g, 145 mmol) und 800 ml Toluol kocht man so lange (einige min bis 1 h), bis kein H_2O mehr azeotrop entfernt werden kann. Man lässt dann die Temp. auf 100° absinken, wobei das Phthalimid wieder auszufallen beginnt. Man gibt nun 38 g (145 mmol) Ph_3P dazu und tropft, unter Feuchtigkeitsausschluss und Rühren, 22,8 ml (25,2 g, 145 mmol) DEAD innerhalb von 30 min hinzu. Die Reaktion ist exotherm, das Phthalimid geht vollständig in Lsg. Nach 2 h Rückflusskochen lässt man die Lsg. im Kühlschrank abkühlen, wobei der gebildete Hydrazin-1,2-dicarbonsäure-diethylester ausfällt. Man nutsch den Niederschlag (21,5 g) ab und wäscht mit 100 ml kaltem Toluol nach. Nach Eindampfen des Filtrates zuerst bei RT., zuletzt $\frac{1}{2}$ h bei 45° i. RV., löst man den so erhaltenen breiigen Rückstand in 240 ml heissem 95% EtOH und lässt im Kühlschrank auskristallisieren. Nach dem Abnutzen der Kristalle wäscht man mit etwas EtOH nach. Roh-Ausbeute: 34,51 g (77,0% d.Th.) 9. Aus der Mutterlauge erhält man weitere 4,31 g (9,6%) 9. Nach Umkristallisation der vereinigten Rohprodukte aus 180 ml 95% EtOH erhält man 36,22 g (80,8% d.Th.) reines 9 als weisse Kristalle. Schmp. 115–117°. IR (CHCl_3): 3580w, 3500w, 3090w, 3030m, 2965m, 2900w, 1789s, 1737vs, 1697vs, 1605s, 1594s, 1491m, 1475s, 1445s, 1433s, 1399vs, 1365s, 1338s, 1327s, 1289s (sh), 1277vs, 1209m, 1192m, 1175m, 1160m, 1091m, 1072m, 1028s, 999m, 978w, 960m, 941w, 922m, 902m, 874m, 700w, 681m, 661m, 623w. ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): 2,57 (s, CH_3); 4,13 (t, $J = 5,6$, CH_2N); 4,29 (t, $J = 5,6$, CH_2O); 7,08 (ddd, $J = 8,0$, 2,6, 1,0, H-C(4')); 7,33 (t, $J = 8,0$, H-C(5')); 7,45 (dd, $J = 2,6$, 1,0, H-C(2')); 7,52 (dd, $J = 8,0$, 1,0, H-C(6')); 7,73 (m, 2 H-C_{Phthal.} (p zu CO)); 7,87 (m, 2 H-C_{Phthal.} (o zu CO)). ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): 26,7 (q, CH_3); 37,2 (t, CH_2N); 64,9 (t, CH_2O); 113,3 (d, arom. C); 120,0 (d, arom. C); 121,4 (d, arom. C); 123,3 (d, C_{Phthal.} (o zu CO)); 129,6 (d, arom. C); 132,0 (s, CO-C_{Phthal.}); 134,0 (d, C_{Phthal.} (p zu CO)); 138,4 (s, C(1')); 158,4 (s, C(3')); 168,0 (s, CO-N); 197,7 (s, COCH₃). Anal. ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (309,33): C 69,89, H 4,89; gef.: C 69,77, H 4,78.

3-(Dimethylamino)-2-methylidene-1-[3-(2-phthalimidoethoxy)phenyl]propan-1-on (10). Eine Mischung von 3,10 g (10 mmol) 9, 3,0 g (36,7 mmol) $\text{Me}_2\text{N} \cdot \text{HCl}$, 1,5 g (50 mmol) Paraformaldehyd, 1 Tropfen konz. HCl und 25 ml Isoamyl-alkohol kocht man 4 h unter Rückfluss. Anschliessend filtriert man, gibt 30 ml H_2O hinzu, stellt mit HCl auf pH 2, trennt die org. Phase ab und schüttelt die wässr. Lsg. 2mal mit Toluol aus, um noch vorhandenes Edukt sowie andere Verunreinigungen zu eliminieren. Man stellt die wässr. Lsg. mit mindestens 10% Überschuss von 1N NaOH alkalisch, wobei die Lsg. milchig wird, und extrahiert dann 3mal mit Et_2O . Nach Trocknen (MgSO_4), Eindampfen i. RV. und Trocknen des dickflüssigen Rückstandes i. V. bei 10^{-1} mm Hg wird der Rückstand fest. Nach 2maliger Umkristallisation aus abs. EtOH erhält man 0,97 g (25,6 d.Th.) 10 als hellgelbe

Mikrokristalle. Schmp. 114,5–116,5°. Führt man die Reaktion unter milderen Reaktionsbedingungen durch, z. B. in siedendem BuOH, erhält man schlechtere Ausbeuten. In EtOH findet keine Reaktion statt. Andererseits erhält man dasselbe Produkt mit höherer Ausbeute (63,8% d. Th.), wenn man **11** anstelle von **9** einsetzt. IR (CHCl₃): 3570w, 3500w, 3095w, 3055w, 2995w, 2960m, 2900w, 2875w, 2830m, 2785m, 1784s, 1733vs, 1698m (sh), 1660s, 1647m (sh), 1630w, 1622w, 1601m, 1584m, 1486m, 1471m, 1459m, 1440s, 1431s (sh), 1395vs, 1367m, 1322s, 1289m, 1272m, 1242s, 1176m, 1157m, 1143w, 1095w, 1084w, 1068w, 1022s, 1003m (sh), 993m, 974w, 944w, 913w, 901w, 870w, 852m, 702w, 685w, 653w, 620w. ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 2,28 (s, 2 CH₃); 3,31 (s, CH₂NMe₂); 4,13 (t, J = 5,5, CH₂CH₂O); 4,27 (t, J = 5,5, CH₂O); 5,71 (d, J = 1,1, 1 H, CH₂=); 5,96 (d, J = 1,1, 1 H, CH₂=); 7,06 (ddd, J = 7,3, 2,8, 1,8, H-C(4')); 7,26–7,38 (m, 3 arom. H); 7,73 (dd, J = 5,5, 3,1, H-C_{Phthal} (p zu CO)); 7,87 (dd, J = 5,5, 3,1, H-C_{Phthal} (o zu CO)). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): 36,8 (t, CH₂NMe₂); 45,1 (q, CH₃); 60,3 (t, CH₂CH₂O); 64,5 (t, CH₂CH₂O); 114,4 (d, arom. C); 118,8 (d, arom. C); 122,3 (d, arom. C); 122,9 (d, C_{Phthal} (o zu CO)); 126,4 (t, CH₂=); 128,8 (d, arom. C); 131,5 (s, CO-C_{Phthal}); 133,7 (d, C_{Phthal} (p zu CO)); 138,3 (s, C(1')); 144,7 (s, C(2)); 157,8 (s, C(3')); 167,6 (s, CO-N); 196,3 (s, PhCO). MS: 378 (6,6, M⁺), 361 (14), 335 (4,6), 294 (2,1), 204 (5,7), 174 (100), 160 (15,5), 147 (11,4), 130 (25), 112 (10), 104 (9,1), 84 (6,3), 76 (17,5), 58 (71,1). Anal. ber. für C₂₂H₂₂N₂O₄ (378,43): C 69,83, H 5,86, N 7,40; gef.: C 69,82, H 5,91, N 7,33. Titration: 108,5 mg benötigten 2,84 ml 0,1N HCl (theor. 2,87 ml).

3-(Dimethylamino)-1-[3-(2-phthalimidoethoxy)phenyl]propan-1-on-hydrochlorid (**11**). Eine Mischung von 3 g (32,1 mmol) Eschenmoser's Salz (Chlorid), 10 g (32,3 mmol) **9** und 60 ml abs. MeCN werden 24 h bei RT. gerührt, wobei das Salz allmählich in Lsg. geht und **11** langsam ausfällt. Anschliessend bringt man die Lsg. zum Sieden, lässt sie sofort wieder abkühlen, filtriert den Niederschlag ab, wäscht mit MeCN nach und trocknet das schon recht reine Produkt bei 50°/0,01 mm Hg: 11,9 g (92,0% d. Th.) **11** als weisse Prismen. Schmp. 169–171°. IR (CHCl₃): 3620–3080w (br.), 2980m, 2910–2000m–w (br.), 1787m, 1725vs, 1696s, 1605m, 1591m, 1485m, 1473m, 1445s, 1432m, 1399s, 1369m, 1336m (sh), 1328m, 1297m, 1260s, 1222–1206m (br.), 1191m, 1172w, 1160w, 1088w, 1070w, 1023m, 996w, 968w, 869w. ¹H-NMR (CDCl₃): 3,00 (s, 2 CH₃); 3,50–3,64 (m, COCH₂CH₂); 4,02 (t, J = 5,7, CH₂N); 4,29 (t, J = 5,7, CH₂O); 7,18 (ddd, J = 8,1, 2,7, 1,3, H-C(4')); 7,41 (t, J = 8,1, H-C(5')); 7,60–7,66 (m, 2 arom. H); 7,72–7,88 (m, 4 arom. H). Anal. ber. für C₂₁H₂₃ClN₂O₄ (402,88): C 62,61, H 5,76, N 6,95; gef.: C 62,78, H 5,84, N 6,86. Titration: 67,8 mg benötigen 1,67 ml 0,1N AgNO₃ (theor. 1,68 ml).

Trimethyl{2-[3-(phthalimidoethoxy)benzoyl]ethyl}ammonium-bromid (**12**). Nach 3 h kräftigem Rühren einer Suspension von 8 g (19,8 mmol) feinpulverisiertes **11** in 500 ml H₂O und 180 ml CH₂Cl₂, geht der Hauptteil des Festkörpers in Lsg. Anschliessend gibt man 21 ml 1N NaOH hinzu, trennt die org. Phase ab und extrahiert noch 2mal die freie Base mit CH₂Cl₂. Nach Trocknen der vereinigten Extrakte (K₂CO₃), filtriert man, dampft i. RV. ein und trocknet eine Stunde i. V. bei 0,1 mm Hg. Man löst den erhaltenen Rückstand (ca. 6,5 g) in 80 ml abs. MeCN und leitet einen Überschuss MeBr hinein. Die Lsg. erwärmt sich leicht unter Bildung eines weissen Niederschlags. Nach 1 h Stehenlassen filtriert man, wäscht mit etwas MeCN nach und kristallisiert den Niederschlag aus MeCN/EtOH 10:1 um. Gesamtausbeute: 4,85 g (53,1% d. Th.) **12** als Knäuel von Mikronadeln. Schmp. 167–169° (unter Zersetzung und teilweiser Bildung anderer Kristalle, die allmählich bis 225° schmelzen). Nach Eindampfen der Mutterlauge und Chromatographieren des zurückgebliebenen dickflüssigen Öls auf Kieselgel (100 mesh) mit CHCl₃/MeOH 100:5 erhält man als Hauptfraktion, nach Umkristallisation aus 95% EtOH, 1,6 g **9** (IR und Schmp.).

Daten von **12**. IR (KBr): 3680–3200m–w (br.), 3070w, 3025m, 2960w, 2930w, 1780m, 1715vs, 1686s, 1599m, 1586m, 1491vs, 1471m, 1443s, 1424m, 1404s (sh), 1397s, 1367m, 1335m, 1295m, 1260s (sh), 1251s, 1239m (sh), 1188m, 1167w, 1063w, 1040m (sh), 1023m (sh), 1018m, 997w, 972w, 953s, 944vs, 918m, 887w, 871w, 776m, 713s, 682w, 638w, 621w. ¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): 3,22 (s, 3 CH₃); 3,68 (t, J = 6,2, CH₂CO); 3,77 (t, J = 6,2, CH₂NMe₃); 4,09 (t, J = 5,9, CH₂N); 4,35 (t, J = 5,9, CH₂O); 7,20 (ddd, J = 8,1, 2,6, 1,0, H-C(4')); 7,42 (t, J = 8,1, H-C(5')); 7,60–7,66 (m, H-C(2'), H-C(6')); 7,78–7,90 (m, H-C_{Phthal}). Anal. ber. für C₂₂H₂₅BrN₂O₄ (461,36): C 57,27, H 5,46, N 6,07; gef.: C 57,39, H 5,29, N 6,06. Titration: 82,7 mg benötigen 1,79 ml 0,1N AgNO₃ (theor. 1,79 ml).

3-(2-Aminoethoxy)acetophenon-hydrochlorid (**13**). Eine Mischung von 20 g (64,65 mmol) **9**, 20 ml konz. HCl, 20 ml H₂O und 90 ml 95% EtOH kocht man 120 h am Rückfluss, bis kein Edukt mehr nachweisbar ist (DC: Kieselgel, Laufmittel t-BuOMe). Man dampft die Lsg. i. RV. ein, rührt die halbsteife Masse mit 50 ml H₂O und lässt 2 h im Kühlschrank bei 4° stehen. Die Lsg. wird abdekantiert und der Vorgang 2mal mit je 20 ml H₂O wiederholt. Nach Abnutschen der vereinigten Extrakte über eine Glasfritte, dampft man das Filtrat ein, trocknet den Rückstand i. V. bei 50°/0,1 mm Hg und kristallisiert 2mal aus i-PrOH um: 12,29 g (88,1% d. Th.) **13** als farblose Platten. Schmp. 173–175°. IR (KBr): 3640–3325w (br.), 3230w, 3135m (sh), 3060s (sh), 3005vs, 2975vs, 2935vs (sh), 2920vs, 2890s (sh), 2850s, 2795m, 2740m, 2685m, 2650m, 2600m, 2535w, 2505m, 2410w, 2380w, 2355w, 2015w, 1742w,

1724w, 1681vs, 1660m (sh), 1642w, 1600s, 1564w, 1545w, 1531m, 1519m (sh), 1486m, 1465m, 1443s, 1429m (sh), 1410m, 1383w, 1365s, 1333m, 1311m, 1285m, 1271vs, 1220s, 1159m, 1132w, 1086m, 1064w, 1015s, 989m, 898m, 865m, 825w, 786s, 699w, 676m. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 2,59 (s, CH₃); 3,39 (t, *J* = 5,0, CH₂NH₃⁺); 4,29 (t, *J* = 5,0, CH₂O); 4,84 (s, H-Austausch aus NH₃⁺); 7,27 (ddd, *J* = 8,2, 2,7, 0,8, H-C(4)); 7,46 (t, *J* = 8,2, H-C(5)); 7,57 (dd, *J* = 2,6, 1,6, H-C(2)); 7,66 (ddd, *J* = 8,2, 1,6, 0,8, H-C(6)). ¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD): 27,3 (*q*, CH₃); 40,8 (*t*, CH₂NH₃⁺); 66,0 (*t*, CH₂O); 115,1 (*d*, arom. C); 121,5 (*d*, arom. C); 123,5 (*d*, arom. C); 131,5 (*d*, arom. C); 140,3 (*s*, C(1)); 160,1 (*s*, C(3)); 200,5 (*s*, CO). Anal. ber. für C₁₀H₁₄ClNO₂ (215,69): C 55,69, H 6,54; gef.: C 55,52, H 6,57. Titration: 24,8 mg benötigen 1,13 ml 0,1N AgNO₃ (theor. 1,15 ml).

N-[2-(3-Acetylphenoxy)ethyl]acetamid (**14**). Zu einer Suspension von 7,425 g (34,4 mmol) **13** in 100 ml CHCl₃ gibt man unter Rühren 3,25 ml (3,53 g, 45,5 mmol) frisch destilliertes AcCl und tropft dann innert 20 min 12,5 ml (12,2 g, 154 mmol) abs. Pyridin in 25 ml CHCl₃. Nach 2 h Rühren versetzt man mit 100 ml H₂O und neutralisiert mit festen K₂CO₃ bis kein CO₂ mehr entweicht. Man trennt die CHCl₃-Lsg. ab und extrahiert die wässr. Phase 4mal mit CHCl₃, trocknet die vereinigten Extrakte (MgSO₄), dampft i. RV. ab und trocknet den Rückstand bei 70°/0,1 mm Hg bis kein Pyridin mehr wahrnehmbar ist. Den noch heissen Rückstand löst man im doppelten Volumen AcOEt und lässt im Tiefkühlfach auskristallisieren. Nach Abnutschen und Waschen mit AcOEt erhält man 6,93 g **14**, als weisse Kristalle. Schmp. 86–87°. Aus der Mutterlauge wurden weitere 0,51 g **14** als gelbliche Kristalle erhalten. Schmp. 84–86°. Gesamtausbeute: 7,44 (97,8% d. Th.).

Daten von 14. IR (CHCl₃): 3480m, 3007m, 2958w, 2895w, 1762w, 1728w, 1692vs (sh), 1685vs, 1664s (sh), 1646m, 1601m, 1590m, 1576m, 1550m (sh), 1524s, 1516s (sh), 1488m, 1471m, 1445s, 1432m (sh), 1392w, 1372m (sh), 1363s, 1335m, 1291s (sh), 1273vs, 1205m, 1165w, 1126w, 1089w, 1065m, 997w, 956w, 917w, 894w, 873w, 710m, 679m, 667m. ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 1,90 (s, CH₃CONH); 2,44 (s, CH₃CO); 3,52 (t, *J* = 5,4, CH₂NH); 3,96 (t, *J* = 5,4, CH₂O); 6,82 (br. s, NH); 6,94 (ddd, *J* = 7,8, 2,3, 1,0, H-C(6) (Ph)); 7,23 (t, *J* = 7,8, H-C(5) (Ph)); 7,31 (dd, *J* = 2,3, 1,0, H-C(2) (Ph)); 7,40 (dd, *J* = 7,8, 1,0, H-C(4) (Ph)). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): 22,8 (*q*, CH₃CONH); 26,4 (*q*, CH₃CO); 38,7 (*t*, NHCH₂); 66,5 (*t*, CH₂O); 113,0 (*d*, arom. C); 119,3 (*d*, arom. C); 121,0 (*d*, arom. C); 129,4 (*d*, arom. C); 138,1 (*s*, C(3) (Ph)); 158,4 (*s*, C(1) (Ph)); 170,4 (*s*, NHC(O)CH₃); 197,6 (*s*, CO). Anal. ber. für C₁₂H₁₅NO₃ (221,26): C 65,14, H 6,83, N 6,33; gef.: C 64,88, H 6,82, N 6,18.

N-{2-[3-(Dimethylamino)-1-oxopropyl]phenoxy}ethyl}acetamid-hydrochlorid-monohydrat (**15**). Man rührt eine Mischung von 10,80 g (48,8 mmol) **14**, 4,21 g (45 mmol) *N,N*-Dimethyl(methyliden)ammonium-chlorid und 45 ml MeCN. Nach ca. ½ h ist alles in Lsg., das Produkt beginnt auszufallen. Der Niederschlag ist ein schwer filtrierbares Gel, man dampft deshalb das MeCN bei RT. i. RV. ab, nimmt den Rückstand in MeOH auf, dampft nochmals bei RT. ein, löst das zurückgebliebene Öl in 60 ml CH₂Cl₂, filtriert und lässt das Lsgm. verdampfen, wobei die Substanz langsam ausfällt. Man filtriert und wäscht den Niederschlag mit etwas CH₂Cl₂, löst in MeOH und fällt durch tropfenweise Zugabe von (i-Pr)₂O als weisse Mikrokristalle aus. Ausbeute: 11,32 g (69,7% d. Th.). Schmp. 88–90°. IR (KBr): 3420s, 3280m (sh), 3215s, 3095s, 3025m, 2980m, 2945m, 2910m, 2875w, 2675vs, 2595m, 2535w, 2490m, 1696vs, 1662vs (sh), 1655vs, 1649vs, 1612m, 1584vs, 1569s (sh), 1550m, 1513w, 1491s, 1478s, 1450s, 1411m, 1391m, 1379m, 1345s, 1314s, 1302vs, 1298s (sh), 1264vs, 1247m (sh), 1193s, 1164m, 1143w, 1117w, 1093w, 1072w, 1054m, 1035w, 1014w, 1001w, 969s, 948w, 890w, 869w, 777s, 770w, 748w, 679m, 660w, 648w. ¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): 1,98 (s, COCH₃); 2,99 (s, (CH₃)₂N); 3,54–3,68 (m, 2 NCH₂, COCH₂); 4,10 (t, *J* = 5,6, CH₂O); 4,82 (s, H-Austausch aus NH, N⁺H, H₂O); 7,22 (ddd, *J* = 8,2, 2,6, 1,2, H-C(6) (Ph)); 7,44 (t, *J* = 8,2, H-C(5) (Ph)); 7,57 (dd, *J* = 2,6, 1,2, H-C(2) (Ph)); 7,65 (dt, *J* = 8,2, 1,2, H-C(4) (Ph)). ¹³C-NMR (25 MHz, CD₃OD): 22,6 (*q*, COCH₃); 34,5 (*t*, COCH₂); 39,9 (*t*, NHCH₂); 43,9 (*q*, (CH₃)₂N); 54,3 (*t*, CH₂NMe₂); 67,7 (*t*, CH₂O); 114,6 (*d*, arom. C); 121,5 (*d*, arom. C); 122,1 (*d*, arom. C); 131,0 (*d*, arom. C); 138,5 (*s*, C(3) (Ph)); 160,4 (*s*, C(1) (Ph)); 173,4 (*s*, CH₃CO); 198,0 (*s*, COCH₂). Anal. ber. für C₁₅H₂₃ClN₂O₃·H₂O (332,84): C 54,12, H 7,57, N 8,41; gef.: C 53,66, H 7,39, N 8,09. Titration: 51,0 mg benötigen 1,53 ml 0,1N AgNO₃ (theor. 1,52 ml).

{2-[3-(2-Acetamidoethoxy)benzoyl]ethyl}trimethylammonium-bromid (**16**). Hydrochlorid **15** (11,3 g, 35,9 mmol) wird in 60 ml H₂O gelöst, mit 40 ml 1N KOH alkalisch gestellt und die freigesetzte Base 3mal mit je 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten org. Phasen getrocknet (MgSO₄), filtriert und i. RV. bei schwachem Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird 15 min i. V. bei 0,1 mm Hg getrocknet. Den Rückstand löst man in 80 ml abs. Toluol und leitet unter Wasserausschluss und Eiskühlung einen Überschuss MeBr hinein. Nach Stehenlassen über Nacht nutsch man das Rohprodukt von **16** (10,8 g, 80,6% d. Th.) ab und wäscht mit Toluol. Aus der Toluol-Lsg. erhält man, nach dem Eindampfen und Chromatographieren an Kieselgel mit *t*-BuOMe/MeOH 100:3, neben anderen Verunreinigungen, 0,85 g **14** (IR und Schmp.). Durch mehrmaliges Umkristallisieren des Rohprodukts von **16** aus MeCN (15 ml/g) erhält man 4,03 g (30,1% d. Th.) **16** als lange, tetragonale Prismen. Schmp. 141,5–142,5°.

Daten von **16**. IR (KBr): 3475s, 3220s, 3095s, 3020m, 2960m, 2900m, 1689vs, 1660vs, 1646vs, 1612m, 1581vs, 1565s (sh), 1552m (sh), 1531w, 1513w, 1494s, 1469w, 1454w, 1446s, 1434m, 1415m, 1406m, 1389m, 1377m, 1353s, 1338s, 1326m, 1304vs, 1296m (sh), 1265vs, 1243m (sh), 1193s, 1174w, 1145w, 1124w, 1087w, 1066m (sh), 1057s, 1045w, 1000w, 979w, 955m, 946w, 931m, 889w, 866w, 827w, 788w, 774s, 729w, 675m, 655m, 634w. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 1,95 (s, CH₃CO); 3,22 (s, (CH₃)₃N⁺); 3,57 (t, *J* = 5,5, NHCH₂); 3,71 (t, *J* = 7,0, CH₂CO); 3,81 (t, *J* = 7,0, Me₃N⁺ - CH₂); 4,12 (t, *J* = 5,5, CH₂O); 4,83 (H-Austausch aus ≥NH); 7,24 (ddd, *J* = 8,1, 2,5, 1,3, H-C(4) (Ph)); 7,45 (t, *J* = 8,1, H-C(5) (Ph)); 7,62 (dd, *J* = 2,5, 1,3, H-C(2) (Ph)); 7,71 (dt, *J* = 8,1, 1,3, H-C(6) (Ph)). ¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD): 22,7 (*q*, COCH₃); 33,8 (*t*, COCH₂); 39,9 (*t*, NHCH₂); 54,2 (*q*, (CH₃)₃N⁺); 63,1 (*t*, Me₃N⁺ - CH₂); 67,8 (*t*, CH₂O); 114,7 (*d*, arom. C); 121,7 (*d*, arom. C); 122,2 (*d*, arom. C); 131,0 (*d*, arom. C); 138,7 (*s*, C(1) (Ph)); 160,3 (*s*, C(3) (Ph)); 173,3 (*s*, CH₃CO); 196,8 (*s*, COCH₂). MS: 233 (4,7, [M - Me₃N - HBr]⁺), 174 (10,7, CH₂=CHOC₆H₄COCH=CH₂), 147 (12,8, CH₂=CH-O-C₆H₄-CO), 131 (10,4, C₆H₄COCH=CH₂), 121 (15,2), 86 (100, CH₃CONHCH₂CH₂), 82 (25,7), 81 (9,8), 80 (26,5), 79 (9,3), 59 (51,3), 58 (90,8). Anal. ber. für C₁₆H₂₅BrN₂O₃ (373,3): C 51,48, H 6,75, N 7,50; gef.: C 51,72, H 6,78, N 7,75. Titration: 66,8 mg benötigen 1,79 ml 0,1N AgNO₃ (theor. 1,79 ml).

{2-[3-(2-Ammonioethoxy)benzoyl]ethyl}trimethylammonium-bromid-hydrobromid (**5**). Eine Mischung von 4,5 g (12 mmol) **16** und 5 ml 63% HBr wird in 25 ml H₂O 40 min unter Rückfluss gekocht, dann i. RV. eingedampft und i. V. (0,1 mm Hg) bei RT. getrocknet. Den festen Rückstand löst man in abs. MeOH und fällt das Produkt mit i-PrOH aus. Nach 2mal Umkristallisation erhält man 3,44 g (69,6% d. Th.) **5**. Schmp. 189–191°. IR (KBr): 3435m (br.), 3260m (br.), 3065m (sh), 3020vs, 2950s, 2900s, 1688vs, 1661m, 1646m, 1636m, 1624m, 1605s, 1596s, 1583m (sh), 1567w, 1550w, 1514w, 1498s, 1483m (sh), 1472m (sh), 1446vs, 1431m (sh), 1409w, 1388m, 1370w, 1342vs, 1307m, 1296m, 1264vs, 1245m (sh), 1202m (sh), 1198m, 1163w, 1120w 1075m (sh), 1062m, 1037w, 1007m, 991m, 978m, 949m, 920m, 874w, 829w, 814w, 788m (sh), 777s, 723w, 680m, 630w. ¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): 3,41 (*t*, *J* = 5,0, ⁺NH₃CH₂); 3,72–3,89 (*m*, CH₂CH₂CO); 4,36 (*t*, *J* = 5,0, CH₂O); 4,86 (*s*, H-Austausch aus NH₃⁺); 7,32 (ddd, *J* = 8,1, 2,6, 1,0, H-C(4) (Ph)); 7,50 (*t*, *J* = 8,1, H-C(2) (Ph)); 7,71–7,80 (*m*, 2 arom. H). ¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD): 34,2 (*t*, COCH₂); 40,7 (*t*, NH₃⁺CH₂); 54,6 (*q*, CH₃); 63,5 (*t*, Me₃N⁺ - CH₂); 66,2 (*t*, CH₂O); 115,2 (*d*, arom. C); 122,2 (*d*, arom. C); 123,2 (*d*, arom. C); 131,5 (*d*, arom. C); 139,2 (*s*, C(1) (Ph)); 160,1 (*s*, C(3) (Ph)); 196,9 (*s*, CO). Anal. ber. für C₁₄H₂₄Br₂N₂O₂ (412,17): C 40,80, H 5,87, N 6,80; gef.: C 41,24, H 6,08, N 6,98. Titration: 52 mg benötigen 2,60 ml 0,1N AgNO₃ (theor. 2,62 ml).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. Rossier, *Int. Rev. Neurobiol.* **1977**, *20*, 284.
- [2] P. L. McGeer, E. G. McGeer, J. H. Peng, *Life Sci.* **1984**, *34*, 2319.
- [3] P. M. Salvaterra, *Mol. Neurobiol.* **1987**, *1*, 247.
- [4] P. P. Rowell, A. K. Chaturvedi, B. V. R. Sastry, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1978**, *205*, 624.
- [5] A. J. Raeber, P. Thanei, G. Riggio, P. G. Waser, *Experientia* **1987**, *44*, A38.
- [6] J. C. Smith, C. J. Cavallito, F. F. Foldes, *Biochem. Pharmacol.* **1967**, *16*, 2438.
- [7] C. J. Cavallito, H. S. Yun, J. C. Smith, F. F. Foldes, *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 134.
- [8] C. J. Cavallito, H. S. Yun, T. Kaplan, J. C. Smith, F. F. Foldes, *J. Med. Chem.* **1970**, *13*, 221.
- [9] H. L. White, C. J. Cavallito, *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *206*, 242.
- [10] C. Y. Chiou, B. V. R. Sastry, *Fed. Proc.* **1966**, *25*, 320.
- [11] D. Morris, D. S. Grewaal, *Life Sci.* **1969**, *8*, 511.
- [12] G. I. Henderson, B. V. R. Sastry, *Biochem. Pharmacol.* **1978**, *27*, 1331.
- [13] C. Y. Chiou, B. V. R. Sastry, *Biochem. Pharmacol.* **1968**, *17*, 805.
- [14] A. J. Raeber, Dissertation Nr. 8932, ETH Zürich, 1989.
- [15] C. Hansch, A. J. Leo, 'Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology', John Wiley & Sons, New York, 1979.
- [16] J. R. Dimmock, K. Shyam, P. J. Smith, *Pharmazie* **1984**, *39*, 467.
- [17] H. Graf, Dissertation Nr. 5968, ETH Zürich, 1977.
- [18] W. B. Bradley, J. Forest, O. Stephenson, *J. Chem. Soc.* **1951**, 2877.
- [19] O. Mitsunobu, M. Wada, T. Sano, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 679.
- [20] L. S. Hegedus, M. S. Holden, J. M. McKearin, *Org. Synth.* **1984**, *62*, 48.
- [21] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, *13*, 1.
- [22] J. V. Greenhill, M. D. Mehta, *J. Chem. Soc. (C)* **1970**, 1549.

- [23] G. Kinast, L.-F. Tietze, *Angew. Chem.* **1976**, *88*, 261.
- [24] H. Böhme, *Angew. Chem.* **1976**, *88*, 772.
- [25] W. S. Murphy, S. Wattanasin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 1555.
- [26] G. Riggio, W. H. Hopff, A. A. Hofmann, *Experientia* **1979**, *35*, 587.
- [27] W. H. Hopff, G. Riggio, P. G. Waser, 'Cholinergic Mechanisms', Ed. P. G. Waser, Raven Press, New York, 1975, S. 293.
- [28] H. Larramona, B. Tchoubar, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1953**, *20*, C53.
- [29] L. I. Smith, O. H. Emerson, *Org. Synth.* **1949**, *29*, 20.
- [30] G. Riggio, W. H. Hopff, A. A. Hofmann, P. G. Waser, *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 488.
- [31] P. Cuatrecasas, C. B. Anfinsen, 'Affinity Chromatography', in 'Methods in Enzymology', Ed. W. B. Jacoby, Academic Press, New York, 1971, Vol. 22, S. 345–378.
- [32] W. H. Hopff, G. Riggio, P. G. Waser, *FEBS Lett.* **1973**, *35*, 220.
- [33] W. H. Hopff, A. A. Hofmann, G. Riggio, P. G. Waser, 'Cholinergic Receptor Isolation', in 'Cholinergic Mechanisms', Eds. G. Pepeu und H. Ladinsky, Plenum Press, New York, 1981, Vol. 25, S. 323–332.