

185. Isolierung von Arenobufagin und einiger weiterer unbekannter Bufogenine aus *Ch'an Su*¹⁾

Über Krötengifte, 22. Mitteilung²⁾

von Peter Hofer und Kuno Meyer

(30. VI. 60)

Die letzten Arbeiten, die sich mit der Isolierung von Bufadienoliden aus *Ch'an Su* befassten, waren von RUCKSTUHL & MEYER³⁾ unternommen worden und hatten zur Isolierung von 11 kristallisierten Bufogeninen geführt, wovon 4 damals zum ersten Mal in *Ch'an Su* aufgefunden wurden. – Bei der papierchromatographischen Untersuchung der das Gamabufotalin enthaltenden Fraktionen, die bei der chromatographischen Aufteilung der chloroformlöslichen Bestandteile von *Ch'an Su* an Al_2O_3 erhalten worden waren, konnte immer noch ein schneller als Gamabufotalin laufender Fleck beobachtet werden, der auffallenderweise mit $SbCl_3$ keine Färbung gab, wohl aber im gefilterten UV.-Licht⁴⁾ sichtbar gemacht werden konnte. Dieses für ein Bufogenin ungewohnte Verhalten war kurz vorher bei Arenobufagin beobachtet worden⁵⁾. Ein papierchromatographischer Vergleich mit authentischem Arenobufagin⁵⁾ gab sowohl im System Formamid/Chloroform wie auch im System Propylenglykol-Wasser-(4:1)/Chloroform völlige Übereinstimmung in den R_f -Werten, so dass angenommen werden konnte, dass im *Ch'an Su* auch noch Arenobufagin (XV) enthalten ist.

Die vorliegende Arbeit wurde in erster Linie mit dem Ziel durchgeführt, dieses Bufogenin XV in genügender Menge zu isolieren, um dessen Konstitution durch Abbau aufzuklären.

Aufteilung der chloroformlöslichen Bestandteile des *Ch'an Su* durch Chromatographie an Al_2O_3

Zur Identifizierung der einzelnen Bufogenine benutzten wir die Systeme Formamid oder Propylenglykol-Wasser-(4:1) als stationäre Phasen. Je nach Polarität der Substanzen kamen als mobile Phasen Chloroform, Chloroform-Benzol-Gemische, Benzol oder Benzol-Petroläther-Gemische zur Anwendung. Die Flecke wurden jeweils nach Betrachtung im UV.-Licht mit Bleistift auf dem Papier markiert und zur weiteren Identifizierung mit $SbCl_3$ -Lösung (in Chloroform) besprüht³⁾.

Die Aufarbeitung der Krötengiftdroge (*Ch'an Su*) geschah wie früher³⁾. Der von den Sterinen befreite Rohextrakt wurde an Al_2O_3 nach der Durchlaufmethode chromatographiert. Aus den ersten Fraktionen liess sich das Cinobufagin (III) durch direkte Kristallisation abtrennen. (Die vereinigten Mutterlaugen gaben nach Rechromatographie an Al_2O_3 kristallisiertes Resibufogenin (I).) Nach dem Cinobufagin

¹⁾ Auszug aus dem 1. Teil der Diss. P. HOFER, Basel 1960.

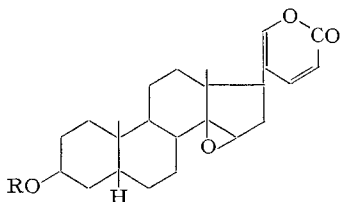
²⁾ 21. Mitteilung: M. BARBIER, H. SCHRÖTER, K. MEYER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **42**, 2486 (1959).

³⁾ J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1270 (1957).

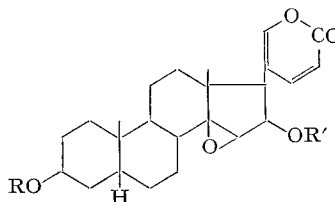
⁴⁾ R. BERNASCONI, H. P. SIGG & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 1767 (1955).

⁵⁾ H. LINDE & K. MEYER, *Pharmac. Acta Helv.* **33**, 327 (1958).

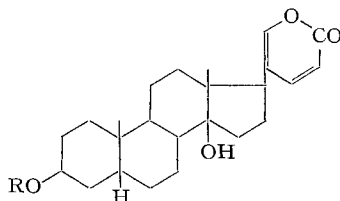
wurde Bufalin (VI) eluiert, und anschliessend Bufotalin (VIII). Von diesem Bufogenin liess sich nur ein kleiner Teil in einheitlichen Kristallen gewinnen. Zur Hauptsache schied sich VIII als Mischkristall mit wenig (10–20%) Bufalin aus. (Als Acetylverbindungen lassen sich VI und VIII dagegen leicht an Al_2O_3 aufteilen⁹⁾.) Nach Bufotalin wurde Cinobufotalin (X) eluiert, das in einheitlichen Kristallen



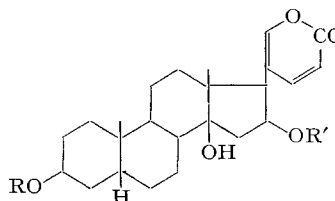
I (R = H) Resibufogenin⁵⁾
F. 113–140°/155–168° [– 5]
II (R = Ac) F. 218–230° [– 1]⁶⁾



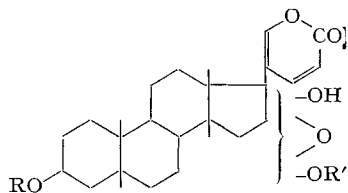
III (R = H; R' = Ac) Cinobufagin
F. 213–215° [– 4]³⁾⁷⁾⁸⁾
IV (R = R' = H) Desacetylcinobufagin = Substanz A
F. 180–182° [+ 22]^{*)}
V (R = R' = Ac) F. 202–204° [– 2]⁷⁾⁸⁾



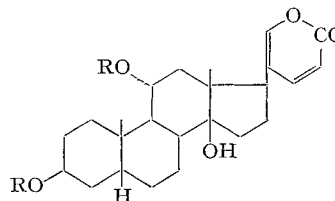
VI (R = H) Bufalin
F. 238–242° [– 9]³⁾⁷⁾
VII (R = Ac) F. 230–247° [– 6]⁷⁾



VIII (R = H; R' = Ac) Bufotalin
F. 223–227° [+ 5]³⁾⁷⁾⁹⁾
VIIIa (R = R' = H) Desacetylbufotalin = Substanz B
F. 210–223° [+ 30 Dioxan]³⁾
IX (R = R' = Ac) F. 256–262° [+ 4]³⁾⁷⁾⁹⁾



X (R = H, R' = Ac) Cinobufotalin
F. 257–259° [+ 11]³⁾⁷⁾
XI (R = R' = H) Desacetylcinobufotalin = Substanz D
F. 251–261° [+ 34 Me]³⁾
XII (R = R' = Ac) F. 215–218° [+ 24]³⁾⁷⁾



XIII (R = H) Gamabufotalin
F. 258–266° [+ 1 Me]^{*)3)10)}
XIV (R = Ac) F. 257–259° [– 11]³⁾⁷⁾

⁵⁾ K. MEYER, *Helv.* 35, 2444 (1952).

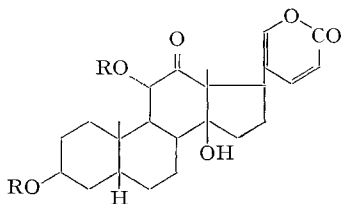
⁷⁾ K. MEYER, *Pharmac. Acta Helv.* 24, 222 (1949).

⁸⁾ P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Tetrahedron Letters* 1959, Nr. 7, 8.

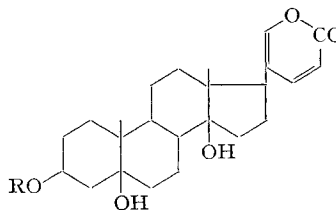
⁹⁾ H. WIELAND & P. WEYLAND, *S-B. math.-naturwiss. Abt. bayer. Akad. Wiss. München* 1920, 329.

¹⁰⁾ M. KOTAKE, *Liebigs Ann. Chem.* 465, 11 (1928).

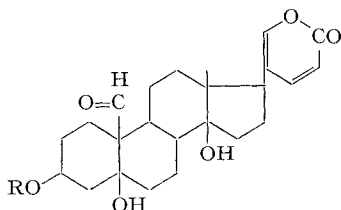
gewonnen werden konnte. Aus den den Cinobufotalin-Fractionen folgenden Eluaten schieden sich bereits während des Eindampfens Kristalle aus, die sich in allen organischen Lösungsmitteln als schwerlöslich erwiesen. Mit Hilfe der Papierchromatographie liess sich zeigen, dass diese Kristalle zur Hauptsache aus Gamabufotalin (XIII) bestanden, die noch etwas Arenobufagin (XV) enthielten (siehe Fig. 1).



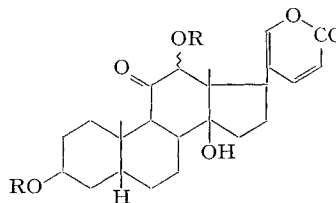
XV (R = H) Arenobufagin
F. 222–228° [+55 Me]^{*)5)11)}
XVI (R = Ac) F. 233–240° [+43]^{*)5)11)}



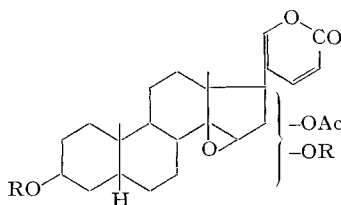
XVII (R = H) Telocinobufagin
F. 160/207–211° [+5]^{*)7)}
XVIII (R = Ac) F. 263–275° [+25]^{*)7)}



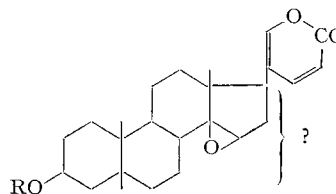
XIX (R = H) Hellebrigenin = Substanz C
F. 239–249° [+17]^{*)12)}
XX (R = Ac) F. 229–247° [+34]^{*)12)}



XXI (R = H) Bufarenogin = Substanz F
F. 230–233° [+11 Me]¹¹⁾
XXII (R = Ac) F. 288–290° [+26]¹¹⁾
F. 264–270°*



XXIII (R = H) Substanz G
F. 239–242° [–2 Me]^{*)}
XXIV (R = Ac) F. 205–208° [+9]^{*)}



XXV (R = H) Substanz H
F. 248–262° [+6 Me]^{*)}
XXVI (R = Ac) amorph^{*)}

Aus den nun folgenden Fractionen des Al₂O₃-Chromatogramms konnten der Reihe nach Telocinobufagin (XVII), Hellebrigenin (XIX) und Desacetylcinobufotalin (XI) in einheitlichen Kristallen gewonnen werden. Die letzten Eluate waren ganz dunkel gefärbt. Die Papierchromatogramme dieser Fractionen zeigten im gefilterten UV. Flecke stark polarer Substanzen, die vermutlich ebenfalls Bufogenine darstellen.

*) Siehe Exper. Teil dieser Arbeit. Ac = CH₃CO–; die Zahlen in eckigen Klammern geben die auf ganze Zahlen auf- oder abgerundete spezifische Drehung für Na-Licht an, wobei keine Bezeichnung Drehung in Chloroform, und Me Drehung in Methanol bedeutet.

¹¹⁾ R. REES, O. SCHINDLER, V. DEULOFEU & T. REICHSTEIN, *Helv.* 42, 2400 (1959).

¹²⁾ J. SCHMUTZ, *Helv.* 32, 1442 (1949).

Aufteilung der Gamabufotalin-Rohkristallisate mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie

1. *Isolierung von Arenobufagin (XV)*. Das durch direkte Kristallisation erhaltene Gamabufotalin (XIII) war, wie eben erwähnt, nicht einheitlich, sondern enthielt noch Arenobufagin. Da sich durch fraktionierte Kristallisation und auch wiederholte chromatographische Aufteilung an Al_2O_3 keine Trennung dieser Bufogenine erzielen liess¹³⁾, haben wir diese durch präparative Papierchromatographie im Schlitztrog¹⁴⁾ durchgeführt. Die dem Arenobufagin entsprechenden Zonen wurden nach üblicher Vorbehandlung der Papierbogen ausgeschnitten, extrahiert und das dabei gewonnene Rohprodukt noch an Al_2O_3 chromatographiert. Die Ausbeuten an kristallisiertem

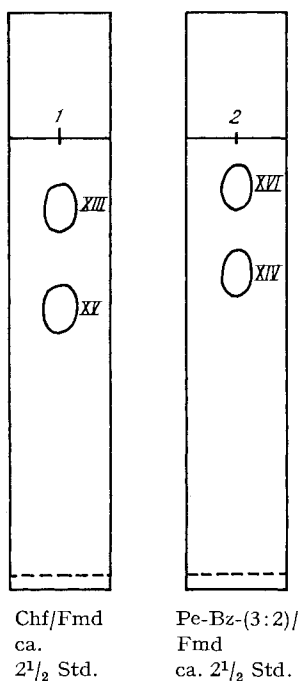


Fig. 1

1 ca. 0,1 mg rohe Gamabufotalinkristalle
XV = Arenobufagin, XIII = Gamabufotalin

2 ca. 0,1 mg rohes Acetylgamabufotalin
XVI = Di-O-acetyl-arenobufagin
XIV = Di-O-acetyl-gamabufotalin

Arenobufagin (XV) betragen aber nur rund die Hälfte der Menge, die auf Grund des Ergebnisses der Chromatographie des Gemisches der Acetylverbindungen von XIII und XV erwartet werden konnte¹³⁾. Dies dürfte daran gelegen haben, dass Arenobufagin infolge der grossen Oberflächenverteilung bei der Papierchromatographie zum Teil verändert worden war. Durch die anschliessende chromatographische Reinigung an Al_2O_3 sind wahrscheinlich noch weitere Anteile dieses Bufogenins in Mitleidenschaft gezogen worden, wie aus den Arbeiten von REES *et al.*¹¹⁾

¹³⁾ Das Gemisch der Acetylverbindungen von Gamabufotalin und Arenobufagin lässt sich leicht durch Chromatographie an Al_2O_3 aufteilen. Es zeigte sich dabei, dass das Arenobufagin etwa in gleicher Menge (ungefähr zu 15%) sowohl in den Kristallen wie auch in den Mutterlaugen des Gamabufotalins enthalten war.

¹⁴⁾ E. VON ARX & R. NEHER, *Helv.* 39, 1664 (1956).

geschlossen werden kann. Arenobufagin (XV) geht nämlich durch den Kontakt mit Al_2O_3 teilweise in Bufarenogin (XXI) bzw. Argentinogin über. In welchem Ausmass diese Umwandlung tatsächlich auch bei dem von uns an Al_2O_3 chromatographierten, rohen, durch präparative Papierchromatographie gewonnenen Arenobufagin eingetreten ist, haben wir nicht untersucht. Wie weiter unten noch gezeigt werden wird, konnten auch wir in sehr kleinen Mengen ein für *Ch'an Su* unbekanntes Bufogenin isolieren, das vermutlich identisch ist mit Bufarenogin (XXI) (siehe weiter unten bei Substanz F).

Bemerkenswert ist das Verhalten von Gamabufotalin und Arenobufagin einerseits und ihrer Acetylverbindungen andererseits bei der Papierchromatographie: während Arenobufagin sich dabei als weniger polar als Gamabufotalin erweist, also rascher läuft als dieses, wandern die Acetylverbindungen dieser beiden Bufogenine gerade in umgekehrter Reihenfolge (siehe 1 und 2 in Fig. 1). Dies lässt sich auf Grund der heute gesicherten Formel⁸⁾ leicht erklären: zwischen der HO-Gruppe an C-11 und der Ketogruppe an C-12 in Arenobufagin (XV) kommt es zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke, wodurch XV unpolarer wird; Di-O-acetyl-arenobufagin ist umgekehrt polarer als Di-O-acetyl-gamabufotalin (XIV). Das Vorliegen einer Wasserstoffbrücke im Arenobufagin (XV) lässt sich auch mit Hilfe der IR.-Spektroskopie nachweisen: während das freie Bufogenin im Bereich der HO-Bande zwei Maxima bei 2,90–2,92 μ und 2,98–3,00 μ und im Bereich der Ester-Carbonyl-Bande ein Maximum bei 5,85 μ aufweist, zeigt die Acetylverbindung XVI nur eine HO-Bande bei 2,85 μ und eine Carbonyl-Bande bei 5,80 μ mit Schulter bei 5,70–5,80 μ . Ganz analoge Befunde waren von RENKONEN *et al.*¹⁵⁾ am Beispiel des Sinogenins erhalten worden, das im tetracyclischen Anteil ja genau dem Arenobufagin entspricht.

2. *Isolierung von papierchromatographisch einheitlichem Gamabufotalin (XIII).* Die Eluierung der das Gamabufotalin enthaltenden Zonen des oben erwähnten präparativen Papierchromatogrammes ergab in guter Ausbeute ein kristallisiertes Rohprodukt, das zur weiteren Reinigung noch an Al_2O_3 chromatographiert wurde. Das dabei erhaltene Gamabufotalin war papierchromatographisch völlig einheitlich.

3. *Isolierung der Substanz F¹⁶⁾ (XXI).* Bei der Durchführung des präparativen Papierchromatogramms wurde eine weitere auf Grund des Fleckenchromatogramms nicht erwartete Zone festgestellt, die beim Betrachten des Papierbogens im UV. zwischen Arenobufagin (XV) und Gamabufotalin (XIII) sichtbar wurde (siehe Fig. 2). Eluierung dieser Zone gab ein als F bezeichnetes amorphes Bufogenin, dessen Acetylverbindung XXII in Kristallen vom Smp. 264–270° erhalten werden konnte. Im Papierchromatogramm (System Petroläther-Benzol-(2:3)/Formamid) gab XXII denselben Rf-Wert wie authentisches Di-O-acetyl-bufarenogin¹¹⁾¹⁷⁾.

¹⁵⁾ O. RENKONEN, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Croatica chemica Acta* 29, 239 (1957).

¹⁶⁾ Für die Bezeichnung der in dieser Arbeit beschriebenen, zum ersten Mal in *Ch'an Su* aufgefundenen Bufogenine wählen wir wieder grosse Buchstaben, wie wir dies früher³⁾ bereits getan hatten und knüpfen an die dort begonnene Reihe an.

¹⁷⁾ Wir danken Herrn Prof. T. REICHSTEIN für die freundliche Überlassung einer kleinen Probe von Di-O-acetyl-bufarenogin.

**Isolierung von Substanz G (XXIII), Desacetylcnobufagin (IV),
Substanz H (XXV), Hellebrigenin (XIX) und Desacetylcnobufotalin (XI)**

Die Mutterlaugen von Hellebrigenin und Desacetylcnobufotalin sowie die amorphen Endfraktionen der Grosschromatographien an Al_2O_3 wurden vereinigt und nochmals an Al_2O_3 aufgeteilt. Dabei konnten noch reichliche Mengen Kristalle von Telocinobufagin (XVII), Hellebrigenin (XIX) und Desacetylcnobufotalin (XI) gewonnen werden.

Die Mutterlaugen von Hellebrigenin (XIX) und Desacetylcnobufotalin (XI) zeigten im Papierchromatogramm neben Desacetylcnobufagin (IV) einen neuen

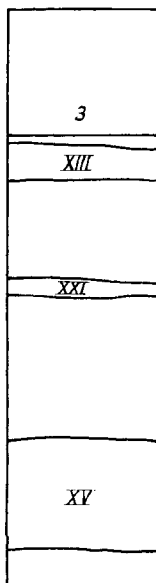


Fig. 2
Bz-Chf-(1:1)/
Pgl-W-(4:1)
ca. 24 Std.

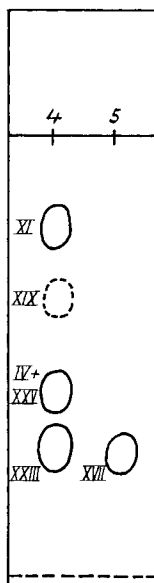


Fig. 3
Chf-Fmd
ca. 2 $\frac{1}{2}$ Std.

Fig. 2

3 ca. 10 mg rohe Gamabufotalinkristalle
im präparativen Papierchromatogramm
XV = Arenobufagin, XIII = Gama-
bufotalin, XXI = Bufarenogin

Fig. 3

4 ca. 0,2 mg Hellebrigenin- und Desace-
tylcnobufotalin-Mutterlaugenrück-
stände

XXIII = Substanz G*), IV = Desace-
tylcnobufagin, XXV = Substanz H*),
XIX = Hellebrigenin, XI = Desacetyl-
cnobufotalin

5 ca. 0,1 mg Telocinobufagin

*) Siehe Exper. Teil dieser Arbeit.

Fleck mit annähernd gleichem Rf-Wert wie Telocinobufagin (XVII) (Fig. 3). Zum Unterschied zu XVII gab aber dieser neue Fleck mit SbCl_3 nicht eine violette Färbung, sondern wurde erst gelb und nach einiger Zeit braunorange. Zur Isolierung dieser neuen Substanz, vorläufig als G (XXIII) bezeichnet, benützten wir wieder die präparative Papierchromatographie im Schlitztrogl¹⁴). Im System Formamid/Chloroform liess sich dabei das Gemisch der oben erwähnten Mutterlaugen von Hellebrigenin und Desacetylcnobufagin in 4 im UV.-Licht abgrenzbare Zonen aufteilen, die nach dem Herausschneiden eluiert wurden und die folgenden Bufogenine gaben (in der Reihenfolge steigender Rf-Werte): kristallisiertes Desacetylcnobufagin (IV), kristallisiertes Hellebrigenin (XIX), Gemisch von Desacetylcnobufagin (IV) und Substanz H (XXV) (breiteste Zone), das durch Chromatographie an Al_2O_3 getrennt werden konnte (siehe weiter unten), und kristallisierte Substanz G (XXIII).

Das rohe Bufogenin G (XXIII) wurde zur weiteren Reinigung an Al_2O_3 chromatographiert. Dabei konnten in zu Drusen vereinigte Kristallprismen vom Smp. 239–242° und $[\alpha]_D = -2^\circ$ (in Methanol) erhalten werden. Die Analysenergebnisse sprechen für die Formel $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_7$. Die Acetylverbindung von XXIII liess sich ebenfalls in Kristallen vom Smp. 205–208° gewinnen; $[\alpha]_D = +9^\circ$ (in Chloroform). Die Analyse gab Werte, die am besten auf die Formel $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{O}_9$ passen. Das IR.-Spektrum des freien Bufogenins (mit CaF_2 -Prisma aufgenommen) zeigte die für tertiär-sekundäre Epoxyde typische Bande bei $3,315 \mu^{18}$). Seine Acetylverbindung XXIV liess im IR. keine HO-Bande mehr erkennen. Demnach könnte es sich beim Bufogenin G (XXIII) um ein dem Cinobufagin (III) ähnlich gebautes Epoxyd handeln, das noch eine zusätzliche acylierbare HO-Gruppe enthält. Mit 85-proz. Phosphorsäure geben III und XXIII im UV. dieselbe schwach gelbgrüne Fluoreszenz. Wir haben dieselbe Fluoreszenz auch beim Cinobufotalin beobachtet, von dem feststeht, dass es wie Cinobufagin bezüglich des Ringes D gebaut ist¹⁹). Ob aus dieser Farbreaktion wirklich eine teilweise strukturelle Übereinstimmung zwischen III und XXIII abgeleitet werden kann, ist noch nicht mit Sicherheit zu entscheiden²⁰).

Das Gemisch aus Desacetylcinobufagin (IV) und Substanz H (XXV) wurde einer sorgfältigen chromatographischen Verteilung an Al_2O_3 unterzogen, wobei sich diese beiden Bufogenine glatt aufteilen liessen. IV machte etwa 80% des chromatographierten Gemisches aus und konnte hier erstmals in Kristallen gewonnen werden. Von XXV liess sich nur eine kleine Menge Kristalle gewinnen, die den unscharfen Smp. 248–262° zeigten. Die spez. Drehung betrug $+6^\circ$ (in Methanol). Das IR.-

Tabelle 1. Färbungen der Bufogenine mit konzentrierter H_2SO_4

Zeit in min	0	5	10	30	60–360
Arenobufagin	—	zitronengelb	eigelb	braungelb	braungelb
Di-O-acetylarenobufagin	—	zitronengelb	eigelb	braungelb	braungelb
Substanz G	blutrot	blutrot	braunrot	braunrot	orangerot
O-Acetyl-G	blutrot	blutrot	braunrot	braunrot	braunrot
Substanz H	—	braunoliv	braunoliv	braunoliv	braunoliv
O-Acetyl-H	—	braun	braunoliv	braunoliv	braunoliv

¹⁸) H. HENBEST, G. D. MEAKINS, B. NICHOLLS & K. TAYLOR, J. chem. Soc. 1957, 1459; H. SCHRÖTER, CH. TAMM & REICHSTEIN, Helv. 41, 720 (1958); H. LINDE & K. MEYER, Helv. 42, 807 (1959).

¹⁹) F. BERNOULLI, H. LINDE & K. MEYER (unveröffentlichte Ergebnisse).

²⁰) Diese von den $14\beta, 15\beta$ -Epoxy- 16β -acetoxy-bufadienoliden durch 85-proz. H_3PO_4 hervorgerufene Fluoreszenz ist grundverschieden von der intensiv und strahlend hellblauen Fluoreszenz (mit leichtem Grün-stich), die PESEZ²¹) bei $14\beta, 16\beta$ -Dihydroxy- bzw. 14β -Hydroxy- 16β -acetoxy-cardenoliden (z. B. Gitoxigenin bzw. Oleandrigenin) beobachtet hat. Die PESEZ-Reaktion fällt, soweit wir feststellen konnten, mit den entsprechenden Verbindungen in der Reihe der Bufadienolide negativ aus, d. h. also z. B. mit Desacetylbufotalin (VIIIa) oder Bufotalin (VIII). Auch die den beiden Cardenoliden Gitoxigenin und Oleandrigenin zugrundeliegenden Ätiansäureester geben eine negative PESEZ-Reaktion. Es kann hier lediglich eine äusserst schwache, blaue Fluoreszenz beobachtet werden.

²¹) A. PETIT, M. PESEZ, P. BELLET & G. AMIARD, Bull. Soc. chim. France 17, 288 (1950); vgl. P. BELLET, Ann. pharmac. franç. 8, 471 (1950); M. PESEZ, *ibid.* 8, 746 (1950).

Spektrum (mit CaF_2 -Prisma aufgenommen) zeigte bei $3,315 \mu$ die für tertiär-sekundäre Epoxyde typische Absorption. Aus den acetylierten Mutterlaugenrückständen von XXIII liessen sich keine Kristalle der gesuchten Acetylverbindung XXVI gewinnen.

Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze bis $200^\circ \pm 2^\circ$, darüber $\pm 3^\circ$. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chloroform-Äther-(1:4) (andere Lösungsmittel in Klammern), Waschen mit 2N HCl, 2N Na_2CO_3 -Lösung und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 , Filtrieren und Eindampfen im Vakuum. Die bei Lösungsmitteln erwähnten Zahlenangaben beziehen sich auf Volumenteile. Substanzproben zur Drehungsbestimmung wurden 1 Std. bei $80^\circ/0,02$ Torr, zur Analyse 10 Std. bei $100^\circ/0,01$ Torr getrocknet.

Abkürzungen: Ac = $\text{CH}_3\text{CO}-$, Ä = Diäthyläther, Ac_2O = Acetanhydrid, Al = 95-proz. Äthanol, An = Aceton, Bz = Benzol, Chf = Chloroform, Fmd = Formamid, Me = Methanol, Pe = Petroläther, Pn = Pentan, Pgl = 1,2-Propylenglykol, Py = Pyridin, W = Wasser, ML = Mutterlaugenrückstände.

Ausführung der Papierchromatographie. Zur Identifizierung der Bufogenine wurde die von BOLLIGER & MEYER²²⁾ angegebene Technik und die beiden dort beschriebenen Systeme mit Fmd oder Pgl-W-(4:1) als stationäre Phasen benützt. Die mobilen Phasen wurden entsprechend der Polarität der untersuchten Substanzen gewählt: bei den polaren Bufogeninen benützten wir reines Chf, bei solchen mit geringer Polarität Chf-Bz-(2:3) oder -(1:1). Bei polaren Acetylverbindungen erwies sich reines Bz am geeignetsten, während bei weniger polaren Bz-Pe in den Verhältnissen (3:2), (2:3) oder (1:4) zur Anwendung kam.

Gewinnung der Bufogenine aus der chinesischen Krötengiftdroge *Ch'an Su*. – 750 g *Ch'an Su*-Scheiben wurden im Eisenmörser grob zerkleinert und in der Kaffeemühle (Turmix) pulverisiert. Das Pulver wurde durch Sieb 4a der *Pharmacopoea Helv.* V geschlagen und

Tabelle 2. *Chromatographische Aufteilung an Al_2O_3 von 50 g Chloroform-Rohextrakt aus *Ch'an Su**

Fraktionen	Lösungsmittelgemisch	Menge in g	Bufogenine, in Klammern Menge Kristalle in g
5–19	Bz-Chf-(19:1)	17,55	Cinobufagin (11,0) + Resibufogenin
20–21	„ „ -(19:1)	1,55	Cinobufagin + Resibufogenin + Bufalin
22–24	„ „ -(9:1)		
25–30	„ „ -(9:1)		
31–37	„ „ -(4:1)		
38–43	„ „ -(3:2)	3,71	Bufotalin (0,3)
44–46	„ „ -(3:2)	0,27	Bufotalin + Cinobufotalin
47–55	„ „ -(3:7)	4,26	Cinobufotalin (2,15)
56–65	Chf	3,80	Gamabufotalin + Arenobufagin (2,0 Mischkristalle)
66–68	Chf-Me-(199:1)	1,70	Gamabufotalin + Arenobufagin + Telocinobufagin
69–71	„ „ -(99:1)	2,07	Telocinobufagin (0,93) + Gamabufotalin + Arenobufagin + Desacetylcinobufagin
72	„ „ -(49:1)		
73–74	„ „ -(49:1)	0,39	Telocinobufagin + Hellebrigenin + Desacetylcinobufagin
75–77	„ „ -(19:1)	1,48	Hellebrigenin + Substanz G + Desacetylcinobufagin + Substanz H ? + Desacetylcinobufotalin
78	„ „ -(9:1)	0,29	Desacetylcinobufotalin + Substanz G + Desacetylcinobufagin + Substanz H ? + Hellebrigenin
79–80	„ „ -(3:7)	0,35	stark polare Substanzen
		41,83	

²²⁾ R. BOLLIGER & K. MEYER, *Helv. 40*, 1659 (1957).

mit dem gleichen Volumen gereinigtem Seesand vermischt. Dieses Gemisch wurde mit Chf angefeuchtet und in 6 Portionen je 2mal während 2 Std. mit neutralem alkoholhaltigem Chf (mit 1% Al) im SOXHLET-Apparat extrahiert. Die Auszüge wurden eingeeengt, im Vakuum zum Schaum eingedampft, hierauf in 350 ml Me gelöst, mit 150 ml W verdünnt und 20mal mit je 600 ml Pn ausgeschüttelt. Die Pn-Auszüge wurden je einmal mit 100 ml des obigen Me/W-Gemisches gewaschen und dann zur Trockne eingedampft. Der so erhaltene Rückstand (rohes γ -Sitosterin) wog etwa 10 g. Die Me-W-Phase wurde im Vakuum vom Me befreit und die verbliebene wässrige Lösung 3mal mit Chf ausgeschüttelt. Die Chf-Auszüge wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, im Vakuum zum Schaum eingedampft und über Nacht im Trockenschrank bei 40° nachgetrocknet: 150 g (20% des Ausgangsmaterials). In der wässrigen Phase blieben ca. 0,9 g «Basen» zurück, die nicht weiter untersucht wurden.

Chromatographische Aufteilung des vorgezeigten Chloroform-Rohextraktes an Al_2O_3 (Grosschromatographie). Der obige Rohextrakt (150 g) wurde in 3 gleichen Portionen an 500 g Al_2O_3 nach der Durchlaufmethode chromatographiert. Die einzelnen Portionen wurden in der eben nötigen Menge Chf gelöst, mit soviel Bz versetzt, bis das Verhältnis Bz-Chf (19:1) betrug. Dabei schied sich ein grosser Teil wieder als harzige Masse ab. Die überstehende Lösung wurde auf die mit Bz-Chf-(19:1) bereitete Al_2O_3 -Säule gegeben. Nun wurde die Chromatographie in Gang gesetzt und die durchgelaufene Lösung fortwährend durch neue Extrakt-Lösung ersetzt, die wiederum durch Auflösen der harzigen Ausfällung in Chf und Versetzen mit Bz bis zum Verhältnis Bz-Chf (19:1) bereitete worden war. Dieses Verfahren wurde über alle Fraktionen mit Bz-Chf-(19:1) hinweg durchgeführt, wobei der grösste Teil des Harzes in Lösung gebracht werden konnte. Der unlösliche Rest konnte schliesslich in analoger Weise mit den folgenden polareren Gemischen auf die Säule gebracht werden.

Die ML der rohen Cinobufagin-Kristallisate aus 6 Grosschromatographien wurden vereinigt und erneut an Al_2O_3 aufgeteilt (35 g Substanz, 600 g Al_2O_3 , 500 g – Säule, Frakt. zu 500 ml).

Tabelle 3. *Chromatographische Aufteilung von 35 g ML roher Cinobufagin-Kristallisate an Al_2O_3*

Fraktionen	Lösungsmittelgemisch	Menge in g	Bufofenine, in Klammern Menge in g
4–10	Pe-Bz -(1:3)	12,105	Resibufogenin (14,5)
11–17	Bz	4,645	
18–20	Bz-Chf-(19:1)	1,248	
21–23	„ „ -(9:1)	1,143	
24–26	„ „ -(4:1)	1,205	
27–31	„ „ -(3:2)	6,481	amorph
32–33	„ „ -(3:2)	1,233	
34–35	„ „ -(3:2)	0,710	Cinobufagin (1,3)
36–39	„ „ -(3:7)	1,016	
40–43	Chf	1,335	amorph
44–48	Chf-Me	0,733	

Beschreibung und Identifizierung der isolierten Stoffe. – *Resibufogenin (I).* Aus An-W farblose Prismen vom Doppel-Smp. 113–140°/155–168°. *Acetylverbindung II*, aus An-Ä-Pn farblose Nadeln vom Smp. 218–230°.

Cinobufagin (III). Aus An-Ä Prismen mit Doppel-Smp. von 167–174°/213–216°; aus wenig Me umkristallisiert, Tetraeder vom Smp. 213–216°. *Acetylverbindung V*, aus An-Ä prismatische Plättchen vom Smp. 203–204°.

Bufalin (VI). Aus Me-Ä dicke Prismen vom Smp. 238–242°. *Acetylverbindung VII*, aus An-Ä Nadeln vom Smp. 230–247°.

Bufotalin (VIII). Aus An Tetraeder, die bei 223–226° schmolzen (Sint. ab 215°); aus An-Ä Nadeln vom Smp. 223–227°, die aus An wieder in Tetraedern gewonnen werden können. *Acetylverbindung IX*, aus An zu Rosetten vereinigte Plättchen vom Smp. 256–260° (Zers.).

Cinobufotalin (X). Aus An klare Oktaeder vom Smp. 257–259° (Sint. ab 253°). *Acetylverbindung XII*, aus An-Ä farblose Prismen vom Smp. 215–218° (Sint. ab 208°).

Gamabufotalin-Arenobufagin-Mischkristalle. Aus Me flache Prismen vom Smp. 256–262° (Zers., Sint. ab 245°).

Telocinobufagin (XVII). Aus An flache Prismen vom Doppel-Smp. 160–175°/207–211°. *Acetylverbindung XVIII,* aus Chf-An körnige Prismen vom Smp. 275–281° (Sint. ab 265°).

Hellebrigenin (XIX). Aus Me zu Rosetten vereinigte Platten vom Smp. 239–249° (Sint. ab 230°).

Desacylcinobufotalin (XI). Aus Me-Ä lange Prismen vom Smp. 251–261° (Zers., Sint. ab 180°).

Die *ML* von *Resibufogenin (I)*, *Cinobufagin (III)*, *Bufalin (VI)*, *Bufotalin (VIII)* und *Cinobufotalin (X)* zeigten im Papierchromatogramm [Fmd/Bz-Chf-(3:2) und Pgl-W-(4:1)/Bz-Chf-(1:1)] ausser den diesen Geninen entsprechenden keine weiteren Flecke, weder durch Behandeln mit SbCl_3 im Tages- noch im UV.-Licht. Die *Kristalle wie auch die ML* von *Gamabufotalin (XIII)* zeigten bei Verwendung der beiden eben erwähnten Papierchromatographie-Systeme im UV. einen neuen, schneller als XIII laufenden Fleck, der denselben Rf-Wert wie Arenobufagin (XV) hatte. Dieser Fleck liess sich mit SbCl_3 nicht anfärben. Arenobufagin (XV) konnte trotz wiederholter Chromatographie an Al_2O_3 nicht von Gamabufotalin (XIII) abgetrennt werden.

Aufteilung von Gamabufotalin und Arenobufagin durch Chromatographie ihrer Acetylverbindungen an Al_2O_3 . – 15 g rohes Gamabufotalin-Kristallisat wurde in Pyridin-Acetanhydrid-Gemisch acetyliert und nach üblicher Aufarbeitung (18,5 g) an 500 g Al_2O_3 chromatographiert.

Tabelle 4. *Chromatographische Trennung an Al_2O_3 der O-Acetylverbindungen (18,5 g) von Gamabufotalin und Arenobufagin*

Fraktionen	Lösungsmittelgemisch	Menge in mg	Kristalle in g
1–7	Bz	61	amorph, enthält Di-O-acetyl-gamabufotalin 6,42 Di-O-acetyl-gamabufotalin, Smp. 257–263° (Sint. ab 255°) 1,75 Di-O-acetyl-are-nobufagin Smp. 233–240° Sint. ab 215° amorph, enthält u. a. O-Acetyl-telocinobufagin
8–13	Bz-Chf-(19:1)	632	
14–21	„ „ -(9:1)	2933	
22–29	„ „ -(4:1)	2736	
30–38	„ „ -(3:2)	4505	
39–41	„ „ -(3:2)	651	
42–48	„ „ -(3:7)	3266	
49–51	„ „ -(3:7)	242	
52–54	Chf	308	
55	Chf-Me-(9:1)	35	
56–59	„ „ -(3:7)	323	
		15692	

Aufteilung von Gamabufotalin (XIII), Arenobufagin (XV) und Substanz F (XXI) durch präparative Papierchromatographie. – 1,68 g rohes Gamabufotalin-Kristallisat wurde in Me gelöst und auf 168 Bogen WHATMAN-Papier Nr. 1 (18 × 64 cm), die mit Pgl-W-(4:1) imprägniert worden waren, in Balken aufgetragen. Die Bogen wurden hierauf im Schlitztroch mit Bz-Chf-(1:1) während rund 24 Std. entwickelt. Nach dem Trocknen ($\frac{1}{3}$ Std.) an der Luft wurden die im UV. sichtbaren Zonen markiert und herausgeschnitten. Zwischen der durch Arenobufagin hervorgerufenen Zone (nahe der Frontlinie) und der dem Gamabufotalin zukommenden Zone (nahe der Startlinie) war jeweils noch eine weitere sehr schwache Bande zu erkennen (Substanz F). Die ausgeschnittenen Papierstreifen wurden zerkleinert, jeweils in einem Rundkolben mit W angefeuchtet, mit der doppelten Menge Me versetzt und im Wasserbad bei 50° 1 Std. mazeriert. Die Lösungen wurden abgenutzt und die Papierschnitzel mit einem Me-W-Gemisch-(2:1) nachgewaschen. Die Extraktion wurde hierauf in analoger Weise noch je einmal mit Me-W-(4:1), -(9:1) und -(9:1) wiederholt. Die vereinigten Auszüge wurden im Vakuum vom Me befreit und die verbliebene wässrige Lösung mit Chf extrahiert. Es wurden erhalten: 1,2 g rohes Gamabufotalin, aus Chf 1,1 g Prismen vom Smp. 258–266° (Zers.), die nach Chromatographie an Al_2O_3 und Um-

lösen aus Me-Chf bei 265–269° (Zers.) schmolzen; 50 mg rohe Substanz F, die auch nach Chromatographie an Al_2O_3 nicht kristallisierte (Acetylverbindung siehe weiter unten); und 490 mg rohes Arenobufagin. Letzteres wurde an 14 g Al_2O_3 chromatographiert.

Tabelle 5. *Chromatographische Reinigung von 490 mg rohem Arenobufagin an Al_2O_3*

Fraktionen	Lösungsmittelgemisch	Menge in mg	Kristalle in mg
1	Bz-Chf-(1:1)	22	amorph
2	Bz-Chf-(3:7)	} 252	90
3–6	Chf		
7–9	Me-Chf-(1:199)		
10–11	„ „ -(1:99)		
12–14	„ „ -(1:49)		
15–16	„ „ -(1:19)	} 73	amorph
17	„ „ -(1:9)		
18–19	„ „ -(7:3)		
		450	

Arenobufagin (XV). Die Hauptmenge der aus den Fraktionen 2–11 erhaltenen 90 mg Kristalle war in der 2. Fraktion enthalten. Aus Me-Ä grobe, zu Drusen vereinigte Prismen von XV, die nach 2maligem Umlösen bei 222–228° schmolzen; $[\alpha]_D^{21} = +55^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,004$ in Me). Mischprobe mit authentischem Arenobufagin⁵) ohne Depression.

$C_{24}H_{32}O_6$ (416,50) Ber. C 69,20 H 7,74% Gef. C 69,64 H 7,78%

Di-O-acetyl-arenobufagin (XVI). 10 mg XV wurden in Py- Ac_2O acetyliert. Nach 2maligem Umlösen des nach üblicher Aufarbeitung erhaltenen kristallinen Rückstandes wurden zu Drusen vereinigte grobe Kristalle vom Smp. 233–240° (Sint. ab 215°) erhalten; $[\alpha]_D^{21} = +43,0^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,916$ in Chf).

$C_{28}H_{36}O_8$ (500,57) Ber. C 67,18 H 7,25% Gef. C 66,99 H 7,27%

Acetylverbindung von Substanz F (XXII). 16 mg rohe amorphe Substanz F (XXI) wurden in 1 ml Py gelöst, mit 0,7 ml Ac_2O versetzt und 40 Std. bei 40° stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung wurde das rohe XXII an 0,8 g Al_2O_3 chromatographiert. Mit Bz und Bz-Chf-(19:1), -(9:1), -(4:1) und -(1:1) wurden 5 mg amorphes Material von der Säule gelöst. Bz-Chf-(3:7) und Chf eluierten 9 mg Substanz, die aus An-Ä 2 mg feine Kristallprismen gaben, die bei 264–270° schmolzen; die Mischprobe mit authentischem²³⁾ *Di-O-acetyl-bufarenogin* vom Smp. 280–287° schmolz bei 264–285°. Im Papierchromatogramm [Pe-Bz-(3:2)/Fmd] gaben die Kristalle von XXII denselben Rf-Wert wie das authentische Di-O-acetyl-bufarenogin.

Isolierung von Substanz G (XXI), Desacetylcinobufagin (IV), Substanz H (XXIII), Hellebrigenin (XIX) und Desacetylcinobufotalin (XI). – Die vereinigten ML der Hellebrigenin- und Desacetylcinobufotalin-Kristallisationen der Grosschromatographien (23,8 g) wurden an 250 g Al_2O_3 chromatographiert.

In den ML von Telocinobufagin konnten im Papierchromatogramm keine Flecke von unbekanntem Bufogeninen nachgewiesen werden. Die ML von Hellebrigenin und Desacetylcinobufotalin zeigten im Papierchromatogramm einen neuen, keinem bekannten Bufogenin zuzuordnenden Fleck mit ähnlicher Laufstrecke wie Telocinobufagin. Beim Besprühen mit $SbCl_5$ wurde dieser Fleck nicht violett gefärbt (Telocinobufagin), sondern erst gelb und nach kurzer Zeit braunorange (Substanz G). Die Fraktionen 40–42 enthielten ebenfalls ein neues Bufogenin, das sich polarer als Gamabufotalin und Desacetylcinobufotalin erwies, dessen Isolierung aber bisher nicht versucht wurde.

960 mg ML der Fraktionen 8–17 wurden in An gelöst und in analoger Weise, wie oben bei der Isolierung von Arenobufagin beschrieben, auf 96 Bogen von WHATMAN-Papier Nr. 1, die vorher

²³⁾ Wir danken Herrn Prof. T. REICHSTEIN bestens für die Überlassung von Vergleichssubstanz.

Tabelle 6. *Chromatographische Aufteilung an Al₂O₃ von 23,8 g ML roher Hellebrigenin- und Desacetylcinobufotalin-Kristallisate*

Fraktionen	Lösungsmittelgemisch	Menge in mg	Bufogenine. In Klammer Menge der Kristalle in g
1-2	Bz-Chf-(3:7)	286	—
3-7	„ „ -(3:7)	6020	Telocinobufagin (1,3)
8-15	„ „ -(3:7)	7356	Hellebrigenin (1,8) + Substanz G + Desacetylcinobufagin + Desacetylcinobufotalin + Substanz H
16-17	Chf		
18-26	„	4093	Desacetylcinobufotalin (3,5) + Substanz G + Desacetylcinobufagin + Hellebrigenin + Substanz H ?
27-31	Chf-Me-(199:1)	1971	
32-34	„ „ -(99:1)	534	
35-37	„ „ -(49:1)	331	
38-39	„ „ -(19:1)	1616	
40-42	„ „ -(9:1)	2086	Desacetylcinobufotalin + amorphe Substanzen

mit Fmd imprägniert worden waren, aufgetragen. Entwickelt wurde mit Chf während 2½ Std. Nach dem Trocknen der Papierbogen konnten im UV. 4 Zonen erkannt werden. Diese wurden markiert, anschliessend ausgeschnitten und für sich, wie bei der Isolierung von Arenobufagin beschrieben, extrahiert.

1. Zone, *Rf*-Wert = 0,27 : *Desacetylcinobufotalin* (XI). Erhalten 57 mg Rohprodukt, die an 2 g Al₂O₃ chromatographiert wurden. Die Fraktionen mit Chf-Me-(99:1) bis -(19:1) ergaben 10 mg Kristalle, aus Me-Ä farblose Prismen vom Smp. 251–261° (Sint. ab 180°), die sich mit authentischem *Desacetylcinobufotalin*³⁾ als identisch erwiesen.

2. Zone, *Rf*-Wert = 0,33 : *Hellebrigenin* (XIX). Erhalten 120 mg Rohprodukt, welche an 4 g Al₂O₃ chromatographiert wurden. Die Fraktionen mit reinem Chf und Chf-Me-(99:1) bis -(19:1) ergaben insgesamt 50 mg Kristalle. Aus An Plättchen vom Smp. 230–237°, die mit *Hellebrigenin* (XIX) identisch waren. Die *Acetylverbindung* (XX) gab aus An Plättchen vom Smp. 230–247° (Zers. ab 212°).

3. Zone, *Rf*-Wert = 0,59 : *Desacetylcinobufagin* (IV) und *Substanz H* (XXV). Aus dieser breitesten Zone konnten 306 mg Rohprodukt extrahiert werden. Chromatographie an 8 g Al₂O₃ gab die in Tab. 7 zusammengestellten Ergebnisse.

Tabelle 7. *Chromatographie von 306 mg Roh-Desacetylcinobufagin an Al₂O₃*

Fraktionen	Lösungsmittelgemisch	Menge in mg	Bufogenine, in Klammern Menge der Kristalle in mg
1-2	Bz-Chf-(1:1)	16	—
3-4	„ „ -(3:7)	9	—
5-8	Chf	208	Desacetylcinobufagin (125)
9-10	Chf-Me-(99:1)		
11-12	„ „ -(49:1)		
13-14	„ „ -(19:1)	55	Substanz H (15)
15-16	„ „ -(9:1)	5	—

Die aus den Fraktionen 5–12 gewonnene Rohsubstanz (208 mg) gab aus Me-Ä 125 mg Kristalle vom Smp. 180–182°; $[\alpha]_D^{21} = +22^\circ \pm 2^\circ$ (*c* = 1,285 in Chf). Sie erwiesen sich im Papierchromatogramm als völlig identisch mit dem früher nur in amorpher Form erhaltenen IV. Acetylierung gab *O-Acetylcinobufagin* (V) vom Smp. 199–202°.

Die aus den Fraktionen 13–14 gewonnene Substanz (55 mg) gab aus An prismatische Kristalle vom Smp. 248–255°: Substanz H (XXV). Nach zweimaligem Umlösen aus An stieg der Smp. auf

248–262°; $[\alpha]_D^{22} = +6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,028$ in Me). Das Bufogenin H aus *Ch'an Su* läuft im Papierchromatogramm in den beiden Systemen Fmd/Chf und Pgl-W-(4:1)/Chf etwas weniger langsam als Telocinobufagin. Die ML von XXV wurden in Py-Ac₂O acetyliert und in üblicher Weise aufgearbeitet. Es liessen sich keine Kristalle gewinnen. Die amorphe *Acetylverbindung XXVI* läuft im Papierchromatogramm [Fmd bzw. Pgl-W-(4:1)/Pe-Bz-(3:2)] etwas langsamer als O-Acetylcinobufagin (V). Mit SbCl₃ färben sich die Flecke im Papierchromatogramm erst gelb, dann geht die Farbe in ein schmutziges Braun über.

4. *Zone, Rf-Wert = 0,71: Substanz G (XXIII)*. Von dieser neuen Substanz konnten total 154 mg erhalten werden. Diese wurden an Al₂O₃ chromatographiert. Mit reinem Chf bis Chf-Me-(49:1) liessen sich 146 mg eluieren, die aus An-Ä 80 mg zu Drusen vereinigte Prismen vom Smp. 239–242° gaben; $[\alpha]_D^{21} = -2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,915$ in Me).

C₂₆H₃₄O₇ (458,56) Ber. C 68,10 H 7,47% Gef. C 67,94 H 7,60%

Im System Fmd/Chf lief das Bufogenin G nur wenig rascher als Telocinobufagin, im System Pgl-W-(4:1)/Chf hingegen wesentlich rascher. Mit SbCl₃ gibt XXIII zunächst eine Gelbfärbung, die beim weiteren Erhitzen in Braunorange übergeht.

Acetylverbindung XXIV: aus An-Ä Prismen vom Smp. 205–208°; $[\alpha]_D^{20} = +9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,020$ in Chf).

C₃₀H₃₈O₉ (542,63) Ber. C 66,41 H 7,06 O 26,54% Gef. C 65,94 H 7,15 O 26,61%

Im Papierchromatogramm läuft die Acetylverbindung XXIV in den Systemen Fmd und Pgl-W-(4:1)/Pe-Bz-(3:2) ganz wenig langsamer als die Acetylverbindung von Bufogenin H.

ZUSAMMENFASSUNG

Die hier beschriebene erneute Untersuchung der chloroformlöslichen Bestandteile der chinesischen Krötengiftdroge *Ch'an Su* hat durch Kombination der Adsorptionschromatographie an Al₂O₃ mit der präparativen Papierchromatographie die Isolierung von 14 papierchromatographisch einheitlichen Bufogeninen ermöglicht, wovon 13 sich in Kristallen gewinnen liessen. 4 davon konnten zum ersten Mal in *Ch'an Su* nachgewiesen werden. Bei diesen neuen Bufogeninen handelt es sich um Arenobufagin und dessen Artefact Bufarenogin, die schon in anderen Krötengiftsekreten nachgewiesen worden sind, und um zwei vermutlich völlig neue Bufogenine – vorläufig mit den Buchstaben G und H bezeichnet –, die zum Unterschied vom Arenobufagin, das ein 14-Hydroxysteroid ist, auf Grund des IR.-Spektrums 14,15-Epoxysteroid sein dürften. Das früher im *Ch'an Su* nachgewiesene Desacetylbufotalin konnte hier nicht wieder aufgefunden werden.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel