

# Isolierung und Identifizierung von Naturstoffen aus Baumpilzen (Basidiomycetes)



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Fernando Campos Ziegenbein**

aus Veracruz Llave (México)

Hamburg 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2002 bis September 2005 unter der Leitung von Herrn Prof. W. A. König und Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. W. Francke am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. A. König und Prof. Dr. Dr. h. c. mult. W. Francke für das fortwährende Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. Chris Meier

- 1. Prüfer:** Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke
- 2. Prüfer:** Prof. Dr. Chris Meier
- 3. Prüfer:** Priv.- Doz. Dr. W. Schultze

**Tag der Disputation:** 12.07.06

Für meine Familie.

## Inhaltsverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis.....  | i   |
| Abkürzungsverzeichnis.....   | iii |
| 1 Einleitung.....  | 1   |
| 1.1 Pilzinhaltsstoffe.....   | 1   |
| 2 Problemstellung.....   | 3   |
| 3 Allgemeiner Teil.....  | 2   |
| 3.1 Baumpilze.....   | 2   |
| 3.2 Terpene.....   | 2   |
| 3.2.1 Nomenklatur und Stereochemie steroidartiger Verbindungen.....                  | 8   |
| 3.3 Untersuchte Pilzarten.....   | 9   |
| 3.3.1 Taxonomische Zuordnung.....  | 9   |
| 4 Spezieller Teil.....   | 9   |
| 4.1 Identifizierung flüchtiger und nichtflüchtiger Inhaltsstoffe von Baumpilzen..... | 9   |
| 4.1.1 <i>Ganoderma lucidum</i> .....   | 9   |
| 4.1.2 <i>Spongiporus leucomallellus</i> .....  | 27  |
| 4.1.3 <i>Bjerkandera adusta</i> .....  | 51  |
| 4.1.4 <i>Laetiporus sulphureus</i> .....   | 55  |
| 4.1.5 <i>Schizophyllum commune</i> .....   | 62  |
| 4.1.6 <i>Datronia mollis</i> .....   | 65  |
| 4.1.7 <i>Stereum hirsutum</i> .....  | 68  |
| 4.1.8 <i>Ganoderma applanatum</i> .....  | 71  |
| 4.1.9 <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> .....   | 73  |
| 4.1.10 <i>Spongiporus caesius</i> .....  | 76  |
| 4.2 Biologische Tests.....   | 81  |
| 4.2.1 Agardiffusionstests.....   | 81  |
| 4.2.2 Cytotoxische Tests.....  | 82  |
| 5 Zusammenfassung.....   | 84  |
| 6 Experimenteller Teil.....  | 88  |
| 6.1 Chemikalien, Messgeräte und Methoden.....  | 88  |
| 6.1.1 Extraktionsmethoden.....   | 88  |
| 6.1.2 Reagenzien und Lösungsmittel.....  | 88  |
| 6.2 Chromatographische Trennmethoden.....  | 88  |
| 6.2.1 Dünnschichtchromatographie.....  | 89  |
| 6.2.2 Flüssigchromatographie.....  | 89  |
| 6.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie.....                                       | 89  |
| 6.2.4 Gaschromatographie.....  | 90  |
| 6.3 Massenspektrometrie.....   | 91  |
| 6.4 NMR-Spektroskopie.....   | 91  |
| 6.4.1 <sup>1</sup> H-Experiment.....   | 92  |
| 6.4.2 <sup>13</sup> C-Experiment.....  | 92  |
| 6.4.3 DEPT- und PENDANT-Experimente.....   | 92  |
| 6.4.4 <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY-Experiment.....                            | 92  |
| 6.4.5 TOCSY-Experiment.....  | 93  |
| 6.4.6 Inverse Spektroskopie; HMQC- und HMBC-Experimente.....                         | 93  |
| 6.4.7 NOESY-Experiment.....  | 93  |
| 6.5 Polarimetrie.....  | 93  |
| 6.6 Schmelzpunktbestimmung.....  | 93  |
| 6.7 ATR(Attenuated Total Reflection)-IR-Spektroskopie.....                           | 93  |

---

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 6.8     | Agardiffusionstests .....                               | 94  |
| 6.9     | Cytotox-Tests .....                                     | 94  |
| 6.10    | Herkunft und Identifizierung des Pilzmaterials.....     | 95  |
| 6.11    | Aufarbeitung und Extraktion des Pilzmaterials.....      | 95  |
| 6.12    | Identifizierung und Isolierung von Inhaltsstoffen ..... | 96  |
| 6.12.1  | <i>Ganoderma lucidum</i> .....                          | 96  |
| 6.12.2  | <i>Spongiporus leucomallellus</i> .....                 | 99  |
| 6.12.3  | <i>Bjerkandera adusta</i> .....                         | 101 |
| 6.12.4  | <i>Laetiporus sulphureus</i> .....                      | 102 |
| 6.12.5  | <i>Schizophyllum commune</i> .....                      | 104 |
| 6.12.6  | <i>Datronia mollis</i> .....                            | 104 |
| 6.12.7  | <i>Stereum hirsutum</i> .....                           | 105 |
| 6.12.8  | <i>Ganoderma applanatum</i> .....                       | 105 |
| 6.12.9  | <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> .....                    | 105 |
| 6.12.10 | <i>Spongiporus caesius</i> .....                        | 105 |
| 7       | Gefahrenstoffanhang.....                                | 107 |
| 8       | Spektrenanhang .....                                    | 108 |
| 9       | Literatur.....  | 142 |
|         | Veröffentlichungen.....                                 | 1   |
|         | Danksagungen .....                                      | 2   |
|         | Erklärung .....   | 3   |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |
|-------------------|---|
| AIDS              | Acquired immunodeficiency syndrome                  |
| APCI              | Atmospheric pressure chemical ionisation            |
| APPI              | Atmospheric pressure photo ionisation               |
| ATCC              | American type culture collection                    |
| ATP               | Adenosin-5'-triphosphat                             |
| ATR               | Attenuated total reflection                         |
| <i>br s</i>       | Breites Singulett                                   |
| CD                | Cyclodextrin  |
| CDP-ME            | Cytidindiphosphomethyl-D-erythritol kinase          |
| CDP-MES           | Cytidindiphosphomethyl-D-erythritol synthase        |
| CI                | Chemical ionization                                 |
| CoA               | Coenzym A   |
| COSY              | Correlated spectroscopy                             |
| <i>d</i>          | Dublett   |
| DC                | Dünnschichtchromatographie                          |
| DEPT              | Distortionless enhancement by polarization transfer |
| DMAPP             | Dimethylallylpyrophosphat                           |
| DMEM              | Dulbecco's modified eagle medium                    |
| DXP               | 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat                      |
| EI                | Electron impact                                     |
| ESI               | Electrospray ionization                             |
| eV                | Elektronen Volt                                     |
| FAB               | Fast atom bombardment                               |
| FID               | Flammenionisationsdetektor                          |
| FT                | Fourier-Transformation                              |
| GC                | Gaschromatographie                                  |
| HeLa              | Henrietta Lacks-Zellen (Cervix Karzinom)            |
| HETP              | Hight equivalent to one theoretical plate           |
| HIV               | Human immunodeficiency virus                        |
| HMBC              | Heteronuclear multiple bond correlation             |
| HMQC              | Heteronuclear multiple quantum correlation          |
| HPLC              | High performance liquid chromatography              |
| IC                | Inhibitor Konzentration                             |
| IE                | Ionisierungsenergie                                 |
| IPP               | Isopent-3-enylpyrophosphat                          |
| IR                | Infrarot  |
| IspH              | 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphatreduktase     |
| KI                | Kováts-Index  |
| LC                | Liquid chromatography                               |
| LM                | Lösungsmittel                                       |
| LSC               | Liquid solid chromatography                         |
| <i>m</i>          | Multipllett   |
| MALDI             | Matrix assisted laser desorption                    |
| <i>me</i>         | Methyl  |
| MEP               | 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphat                  |
| MHz               | Megahertz   |
| MS                | Massenspektrometrie                                 |
| MSFTA             | N-Methyltrimethylsilyltrifluoroacetamid             |
| NADP <sup>+</sup> | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat             |
| NADPH             | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziert) |

---

|              |  |
|--------------|--|
| NMR          | Nuclear magnetic resonance                               |
| NOE          | Nuclear Overhauser effect                                |
| NOESY        | Nuclear Overhauser effect spectroscopy                   |
| P            | Phosphat   |
| p.a.         | pro analysi, zur Analyse                                 |
| pe           | Pentyl   |
| PEEK         | Poly Ether Ether Keton                                   |
| PENDANT      | Polarisation enhancement during attached nucleus testing |
| ppm          | Parts per million  |
| <i>q</i>     | Quartett   |
| $R_f$        | Retention factor   |
| $R_i$        | Retentionsindex  |
| RI           | Refractive index   |
| RP           | Reversed phase   |
| RPMI         | Roswell Park Memorial Institute                          |
| $R_t$        | Retention time   |
| <i>s</i>     | Singulett  |
| s. lat.      | sensu lato   |
| SPME         | Solid-phase microextraction                              |
| <i>tert.</i> | tertiär  |
| TFA          | Trifluoressigsäure                                       |
| TLC          | Thin layer chromatography                                |
| TMS          | Trimethylsilyl   |
| TMSH         | Trimethylsulfoniumhydroxid                               |
| TOCSY        | total correlation spectroscopy                           |
| TOF          | Time of flight   |
| $t_R$        | Retentionszeit   |
| UV           | Ultraviolett   |
| VIS          | visible  |

# 1 Einleitung

In der traditionellen chinesischen Medizin spielen Baumpilze (Holz zersetzende Basidiomyceten) seit mehr als 2000 Jahren eine wichtige Rolle. Zum Beispiel schrieb man Ling-Zhi (*Ganoderma lucidum*) heilende Eigenschaften zu. In Erzählungen wurden Aktivitäten gegen Hepatitis, Nierenentzündungen, Neurasthenie, Schlaflosigkeit, Bronchitis, Asthma und gegen Magengeschwüre erwähnt<sup>[1]</sup>. Im Buch Ben Cao Gang Mu (Chinesisches Buch über die Natur aus dem Jahre 1578 A.D.) wird beschrieben, dass „fortdauernde Einnahme von Ling-Zhi Gewichtsabnahme und eine längere Lebensdauer zur Folge hat“<sup>[1]</sup>. Die Verwendung von Heilpilzen in Europa ist im Vergleich zu China recht gering. Es gibt jedoch schon von Plinius dem Älteren (23-79 n. Chr.) Berichte über den Gebrauch von *Fomitopsis officinalis* (vormals *Agaricus albus* genannt) aus dem ersten Jahrhundert. Er beschreibt unter anderem Linderung von Atemnot bei Einnahme dieses Pilzes mit Milch, die Behandlung von Tuberkulose, fiebersenkende Eigenschaften und sogar die Behandlung von Epilepsie.

Dioskurides, ein Arzt zur Zeit der Herrschaft von Kaiser Nero, beschrieb auch die Behandlung von Wunden mit diesem Pilz. Der Pilz galt bis ins 17. Jahrhundert als Allheilmittel, wurde jedoch im 18. Jahrhundert durch pflanzliche Heilmittel abgelöst. Während in Fernost Heilpilze einen festen Bestandteil der dortigen traditionellen Medizin bildeten, blieb im Westen die Bedeutung von Heilpilzen recht gering<sup>[1]</sup>.

In den letzten zwei Dekaden wurden vermehrt Extrakte aus Pflanzen und Pilzen, denen man heilende Eigenschaften zuschrieb, untersucht. Aus biologisch aktiven Extrakten wurden diverse Sekundärmetabolite isoliert und identifiziert, um eventuell neuartige Pharmazeutische Erzeugnisse herzustellen (z.B. Ganoderensäuren aus dem Pilz *Ganoderma lucidum*)<sup>[2]</sup>.

Sekundärmetabolite sind Naturstoffe, die aus dem Metabolismus entstehen, jedoch nicht essentiell für das normale Wachstum, die Entwicklung oder die Vermehrung des Organismus sind. Sie sind hauptsächlich Lock-, Abwehrstoffe oder Regulatoren.

Die Untersuchung von Sekundärmetaboliten, generell die Naturstoffforschung, dient in erster Linie der Identifizierung neuartiger Substanzen. In manchen Fällen wird die Identifizierung von bekannten und unbekannt Substanzen bzw. die chemische Zusammensetzung eines Organismus zur hierarchischen Einordnung in biologische Systeme verwendet (Chemotaxonomie). In manchen Fällen ist die Erkennung sog. chemischer Rassen innerhalb der Arten (Chemodeme) möglich<sup>[3]</sup>.

## 1.1 Pilzinhaltsstoffe

Die Isolierung von Naturstoffen aus Pilzen sorgte vor allem durch die Isolierung von Penicillin und dessen nachweislich antibiotische Wirkung in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts für Aufsehen. Seitdem haben sich die Methoden der Extraktion und Analyse kontinuierlich verbessert<sup>[4]</sup>. Vor allem der Pilz *Ganoderma lucidum* (Glänzender Lackporling), der wie oben erwähnt, bereits vor langer Zeit in China als Medikament verwendet wurde, war Gegenstand der Untersuchungen. Über 100 Triterpenoide wurden isoliert und auf biologische Aktivität getestet. Die bereits bekannten Eigenschaften gegen Bronchitis, Asthma, Hyperlipämie wurden zum Teil bestätigt.

Darüber hinaus konnte die Wirkung gegen einigen Krebsarten, Arteriosclerose, Magengeschwüre, Schlaflosigkeit, AIDS und andere Krankheiten bestätigt werden<sup>[5]</sup>.

Besonders hervorzuheben in diesem Zusammenhang sind die Ganoderische-Säuren V, W, X, Y und Z (s. Abb. 1-1), die stark gegen Hepatoma-Zellen wirken<sup>[5]</sup>.

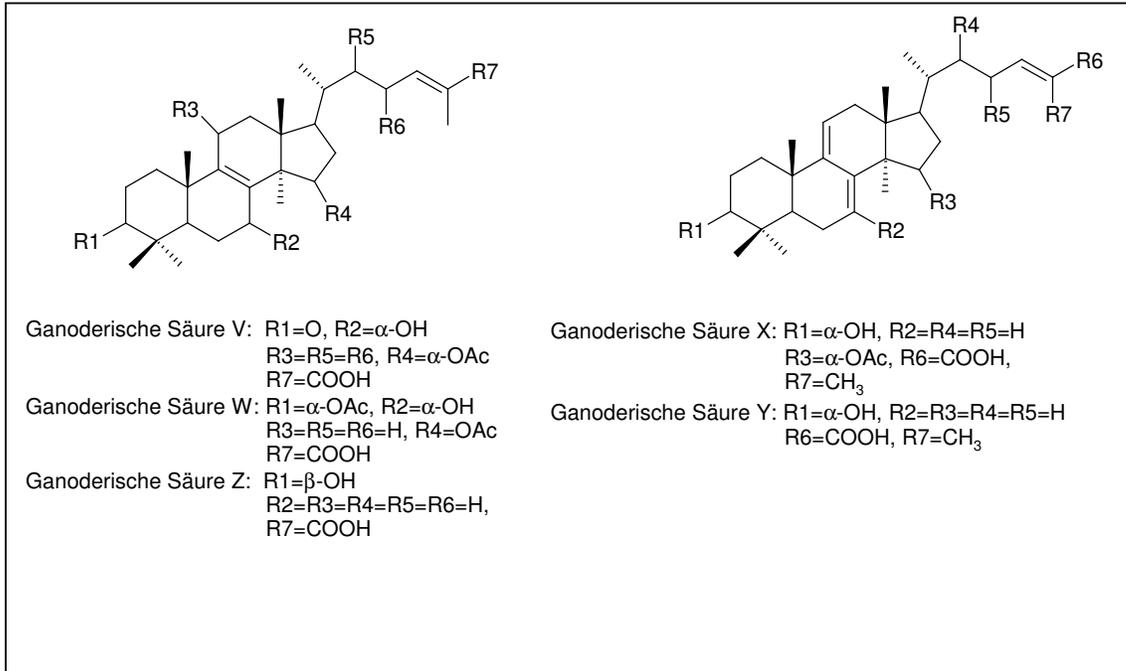


Abb. 1-1 Biologisch Aktive Triterpensäuren aus *G. lucidum*

Neben Triterpenen wurden auch biologisch aktive Sesquiterpene, wie z.B. das von W. Steglich isolierte antibiotisch wirksame Pleurotollol (s. Abb. 1-2), identifiziert<sup>[6]</sup>. Weitere wichtige Inhaltsstoffe sind Monoterpene, Aldehyde, Ketone, Fettsäuren, Alkaloide und aromatische Verbindungen<sup>[7-10]</sup>.

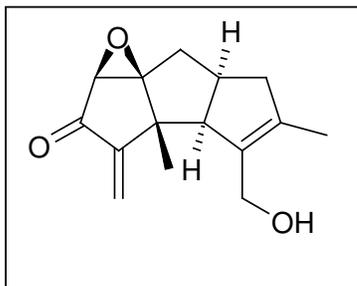


Abb. 1-2 Pleurotollol

## 2 Problemstellung

Die Isolierung und Identifizierung von neuen Naturstoffen kommt der Grundlagenforschung zugute, weil sie Hinweise auf Biosynthesewege der jeweiligen Spezies liefert. Die Untersuchung der biologischen Aktivität von neuen Substanzen liefert wertvolle Informationen über bakterizide, bakteriostatische, antibiotische, anticancerogene und weitere Wirksamkeiten. Naturstoffe können auch für die Pharmaindustrie selbst, oder als Vorläufer für andere Substanzen (Stichwort: Lead-Structure), von Bedeutung für die Herstellung von Medikamenten sein. Viele Baumpilze sind jedoch noch nicht oder nur wenig untersucht worden. Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung von Inhaltsstoffen (Sekundärmetabolite) der Holz zersetzenden Basidiomyceten *Ganoderma lucidum*, *Spongiporus leucomallendus*, *Bjerkandera adusta*, *Laetiporus sulphureus*, *Schizophyllum commune*, *Datronia mollis*, *Stereum hirsutum*, *Ganoderma applanatum*, *Pycnoporus cinnabarinus* und *Spongiporus caesiust*. Durch den Einsatz chromatographischer Methoden und moderner instrumenteller Analytik sollten flüchtige und nichtflüchtige Substanzen isoliert und identifiziert werden. Bei ausreichendem Material wurde versucht, unbekannte Substanzen zu isolieren und ihre Struktur mittels Massenspektroskopie und Kernmagnetresonanzspektroskopie aufzuklären. Chromatographische Methoden sollten bei der Isolierung der Substanzgemische verwendet werden.

Ferner sollten Agardiffusionstests der unbekannt Substanzen mit einer Reihe von Mikroorganismen durchgeführt werden, um eine evtl. vorhandene bakterizide, fungizide, bakteriostatische oder fungistatische Wirkung nachzuweisen. Bekannte Substanzen, bei denen noch keine Ergebnisse im Agardiffusionstest mit den ausgewählten Mikroorganismen vorliegen, sollten gleichfalls untersucht werden. Tests über cytotoxische Eigenschaften sollten auch durchgeführt werden.

## 3 Allgemeiner Teil

### 3.1 Baumpilze

Vor allem Basidiomyceten mit hymenialen Fruchtkörpern (z.B. *Poriales*), zum Teil aber auch Ascomyceten (z.B. *Ceratocystis*) und Fungi imperfecti sind am Abbau von Holz beteiligt. Einige dieser Holzzerstörer befallen als Parasiten bereits lebende Stämme, z.B. *Phellinus pini* und *Heterobasidion annosum*, die Kiefer und Fichte befallen, sowie den Buchen und Birken befallenden *Phellinus fomentarius*. Viele Pilze leben saprophytisch nur auf abgestorbenem Holz (z.B. *Trametes*- und *Gloeophyllum*-Arten). Auch kann parasitischer Befall von saprophytischer Lebensweise auf abgestorbenem Holz ausgehen, wie bei *Armillaria mellea*, der in abgestorbenen Baumstümpfen lebt und an ihnen seine Fruchtkörper bildet aber von hier auf physiologisch geschwächte Bäume überzugehen vermag („Schwäche-Parasiten“). Die Holzzerstörung durch Pilze geschieht als Destruktions- (Braun-), als Korrosionsfäule (Weiß-) oder als Moderfäule. Bei der Braunfäule verzehrt der Pilz vorzugsweise die Cellulose, so dass der Ligninanteil des Holzes übrig bleibt. Das Holz wird braun, querrissig und zerfällt würfelig (z.B. *Coniophora*). Bei der Korrosionsfäule bauen die Pilze Lignin und Cellulose ab, wobei sie Phenoloxidasen in das Substrat ausscheiden. Das morsche Holz wird infolge von Bleichungsvorgängen weiß und längsfaserig (z.B. *Phellinus ignarius*). Erst in neuerer Zeit wird die Moderfäule als dritter Typ der Holzzerstörung stärker beachtet. Die Moderfäule wird vorwiegend durch Kleinpilze mit kleinen Fruchtkörpern (z.B. Ascomyceten) oder ohne Hauptfruchtform (Fungi imperfecti) verursacht. Diese Fäule stellt eine langsam verlaufende Braunfäule dar. Am besten kann man diese Fäule am Beispiel von *Chaetomium*-Arten zeigen, deren Hyphen die Sekundärwand der Tracheiden bzw. Holzfasern angreifen<sup>[11]</sup>.

Einige dieser genannten Pilze sind gefährliche Lager- und Bauholz-Zerstörer, wie *Coniophora cerebella* und *Serpula lacrymans* (Braunfäuleerreger).

Manche Baumpilze sind jedoch sehr nützlich. Einige von ihnen sind essbar, wie der seit alter Zeit in Japan intensiv angebaute Shii-Take-Pilz (*Lentinus edodes*), der seit einigen Jahren mit großem Erfolg in Europa in Großbetrieben angebaute Austernpilz (*Pleurotus ostreatus*) oder das Stockschwämmchen (*Kuehneromyces mutabilis*)<sup>[12]</sup>.

Baumpilze werden jedoch nicht nur als Lebensmittel gezüchtet. Der in der traditionellen chinesischen Medizin bekannte Ling-Zhi (*Ganoderma lucidum*) wurde seit langer Zeit gegen Bronchitis, Asthma, Hyperlipämie, Diabetes, etc verwendet<sup>[13]</sup>. Auch der ebenfalls in China bekannte Affenkopfpilz (*Hericium erinaceus*) gilt sowohl als Delikatesse als auch als Medikament gegen Magen- und Darmbeschwerden. In-vitro-Versuche von Extrakten dieses Pilzes haben starke antimutagene Aktivität gezeigt<sup>[14]</sup>.

### 3.2 Terpene

Terpene lassen sich formal als Oligomere des Kohlenwasserstoffs Isopren [2-Methyl-1,3-butadien] auffassen und aus Isopreneinheiten zusammengesetzt denken. Je nach Zahl dieser Basiseinheiten teilt man sie ein in Monoterpene (C<sub>10</sub>, 2 Isopreneinheiten), Sesquiterpene (C<sub>15</sub>, 3 Isopreneinheiten), Diterpene (C<sub>20</sub>, 4 Isopreneinheiten), Sesterpene (C<sub>25</sub>), Triterpene (C<sub>30</sub>) und Tetraterpene (C<sub>40</sub>) (Abb. 3-4). Die Steroide leiten sich von den Triterpenen ab, Carotinoide besitzen Tetraterpen-Struktur. Die Isopentyl-Basiseinheiten können entweder Kopf-Schwanz- oder Kopf-Kopf-verknüpft sein (Abb. 3-1).

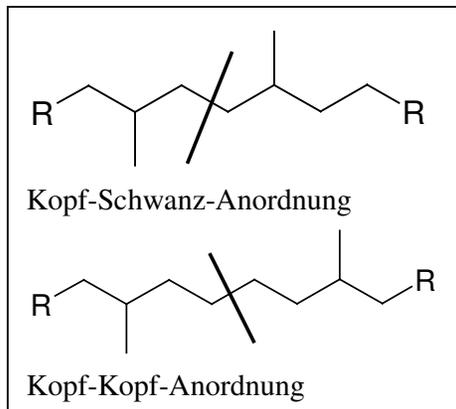


Abb. 3-1 Verknüpfung der Isopenten-Einheiten

Das Kriterium des Aufbaus des Kohlenstoffskelettes der Isoprenoide wurde ursprünglich von O. Wallach (1887) <sup>[15]</sup> aufgestellt und später von L. Ruzicka (1922) <sup>[16]</sup> als „biogenetische Isoprenregel“ formuliert und gibt seitdem wertvolle Anregungen zur Konstitutionsermittlung komplexer Terpene.

Biosynthese: Mittelpunkt ist die Mevalonsäure <sup>[17], [18], [19]</sup>, die aus 3 Molekülen AcetylCoA entsteht. Zwei Einheiten AcetylCoA treten zunächst zu AcetoacetylCoA (Abb. 3-2) zusammen, eine dritte Einheit wird durch eine aldolartige Reaktion zum 3-Hydroxy-3-methylglutarsäurederivat angefügt. Reduktive Abspaltung von CoA gibt Mevalonsäure. Zweifache Phosphorylierung von Mevalonsäure gibt das entsprechende Pyrophosphat. Decarboxylierung und Wasserabspaltung führt schließlich zu Isopent-3-enylpyrophosphat (aktives Isopren, IPP), das durch eine Isomerase in das stabilere 3,3-Dimethylallylpyrophosphat (Prenol) umgelagert wird.

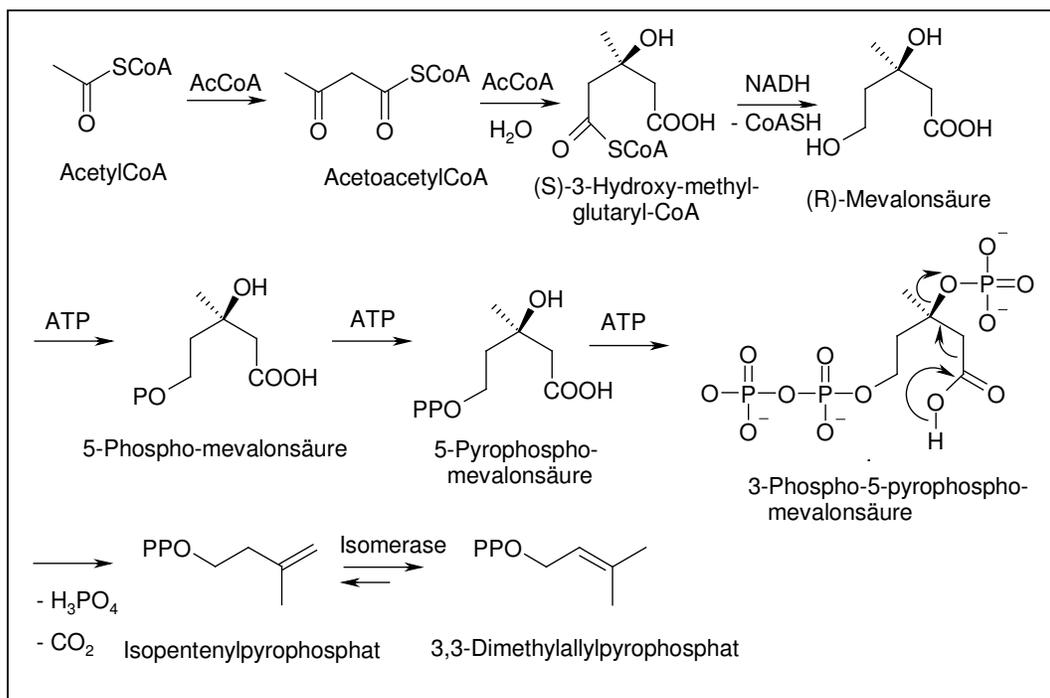


Abb. 3-2 Biosynthese von Mevalonsäure und den Isopreneinheiten

3,3-Dimethylallylpyrophosphat DMAPP lässt sich unter Austritt von Pyrophosphat nucleophil substituieren; als Nucleophil wirkt die Doppelbindung des Isopentenylpyrophosphats. Durch Kopf-Schwanz-Kondensation entsteht (*E*)-2-Geranylpyrophosphat oder (*Z*)-Nerylpyrophosphat.

Durch Verknüpfung mit einer weiteren IPP-Einheit gelangt man zu den Farnesylpyrophosphaten, welche die Vorstufen zu den Sesquiterpenen darstellen (Abb. 3-3)<sup>[20]</sup>.

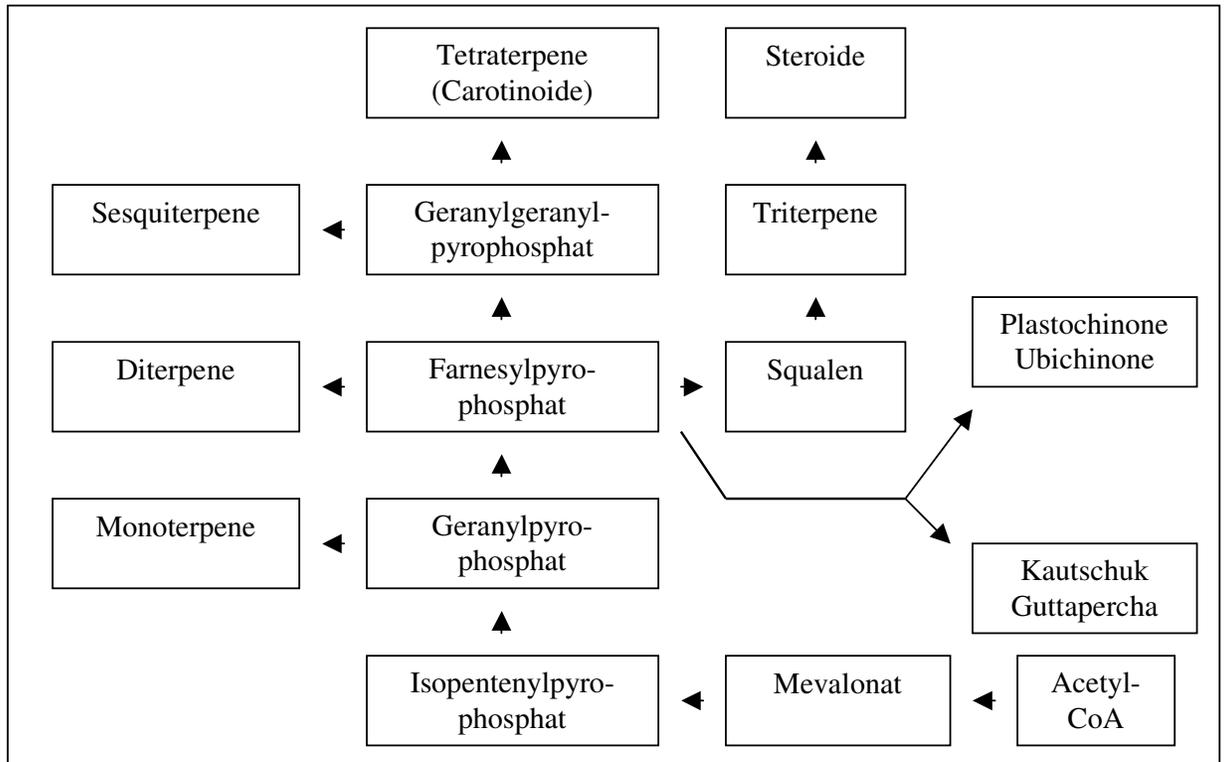


Abb. 3-3 Gesamtübersicht über die Biosynthese der Terpenoide

Ende der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurden Versuche mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Substanzen verwendet, um die Biosynthesewege der Terpene nachvollziehen zu können<sup>[21]</sup>,<sup>[22]</sup>. Man fand heraus, dass auch ein Mevalonat-unabhängiger Biosyntheseweg besteht: der Desoxyululose-Biosyntheseweg. Die Ausgangssubstrate sind Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (Abb. 3-4).

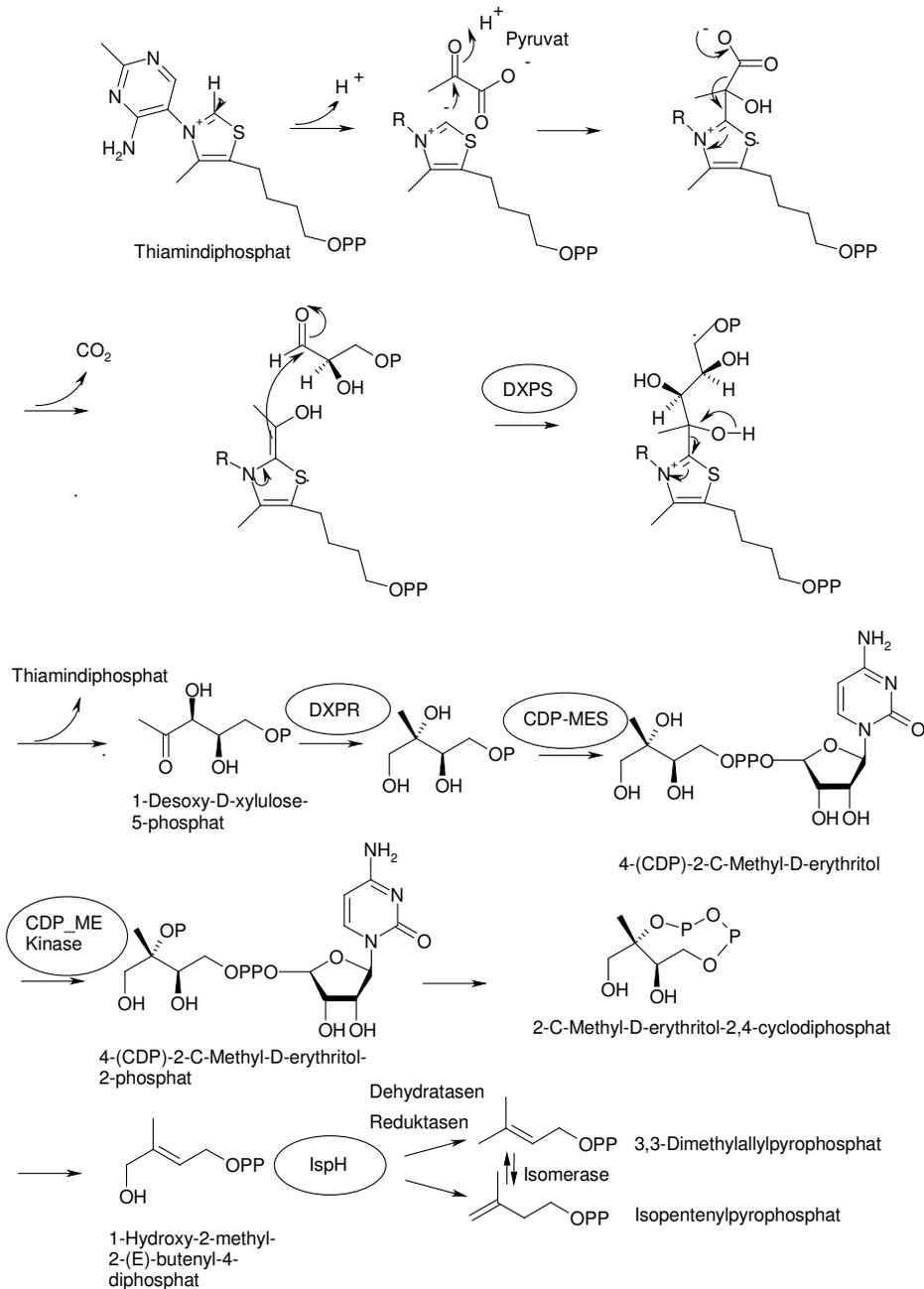


Abb. 3-4 Desoxyxylulosephosphat Biosyntheseweg

DXPS: Desoxyxylulose-5-phosphatsynthase

DXPR: Desoxyxylulose-5-phosphat-5-phosphatreduktoisomerase

CDP-MES: Cytidindiphospho methyl-D-erythritolsynthase

CDP-ME Kinase: Cytidindiphospho methyl-D-erythritol kinase

IspH: 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphatreduktase

In einer Thiamin-abhängigen transketolaseartigen Reaktion wird eine aus Pyruvat stammende C2-Einheit auf Glycerinaldehyd-3-phosphat übertragen, wobei 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) gebildet wird. Katalysiert wird dieser Schritt durch das Enzym DXP-Synthase. Im darauf folgenden Schritt wird DXP in 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) durch DXP-Reduktoisomerase umgewandelt. Durch die folgende Reaktion, die Cytidin-5'-triphosphatabhängig ist, wird aus MEP 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2C-methyl-D-

erythritol. Nach Phosphorylierung (ATP-abhängig) der C-2 Hydroxyl-gruppe liegt 2-Phospho-4-(cytidin-5''-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol vor, welches weiter in 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat umgewandelt wird. Durch reduktive Ringöffnung entsteht 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat. Das Enzym 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphatreduktase (IspH) katalysiert dann die Umwandlung in IPP und DMAPP im Verhältnis 5:1<sup>[23]</sup>.

Da im Laufe dieser Arbeit vornehmlich Terpene aus der Gruppe der Triterpenoide isoliert wurden, soll hier auf deren in Pilzen Biogenese eingegangen werden.

Die Dimerisierung zweier Farnesylpyrophosphatmoleküle führt zum Squalen (Abb. 3-5), einem acyclischen Triterpenkohlenwasserstoff. Squalen wird durch eine Squalen-2,3-epoxidase und Luftsauerstoff zu 2,3-Epoxysqualen umgesetzt. In Pilzen wird das 2,3-Epoxysqualen mittels einer 2,3-Epoxysqualencyclase unter Wanderung zweier Methylgruppen zum Lanosterol cyclisiert. Aus Lanosterol werden durch Oxigenierungen, Isomerisierungen, Cyclisierungen, Reduktionen und Abbaureaktionen die zahlreichen Triterpene und Triterpenderivate gebildet, die in Baumpilzen gefunden werden<sup>[24]</sup>.

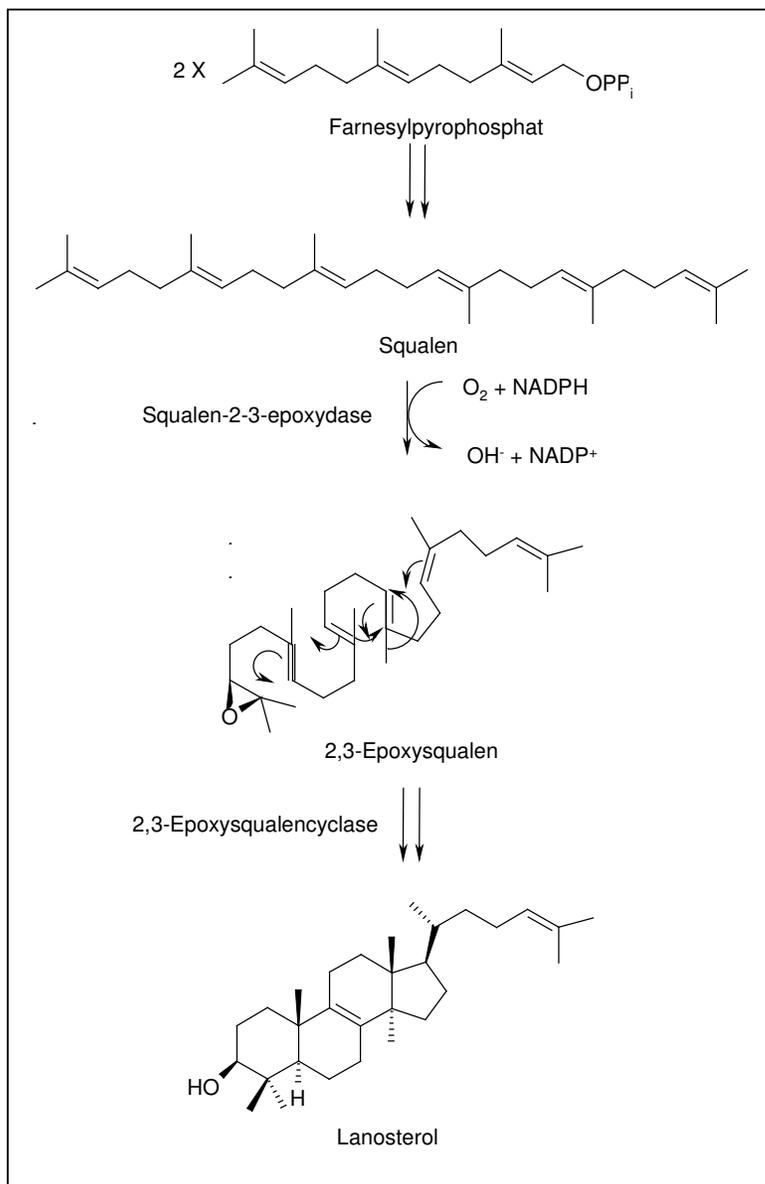


Abb. 3-5 Biogenese des Lanosterols in Tieren und Pilzen

Eine wichtige triterpenoide Substanz in Pilzen ist Ergosterol, das unerlässlich für den Bau der Pilzmembranen ist. In Fadenpilzen, zu denen auch die Baumpilze gehören, wird Lanosterol mittels einer C-24-Sterolmethyltransferase und S-Adenosylmethionin in Position 24 methyliert (Abb. 3-6). Das entstandene 24-Methylen-24,25-dihydrolanosterol wird mittels einer Cytochrom P-450 Oxidase unter Abspaltung von Formiat demethyliert. Daraufhin wird die  $\alpha$ -ständige Methylgruppe an C-4 abgebaut. Nach Epimerisierung an Position 4 wird dann auch die verbleibende Methylgruppe entfernt, und es entsteht Fecosterol. Durch Doppelbindungsisomerisierung und Reduktionen, die von Spezies zu Spezies variieren können, entsteht letztendlich Ergosterol<sup>[24]</sup>.

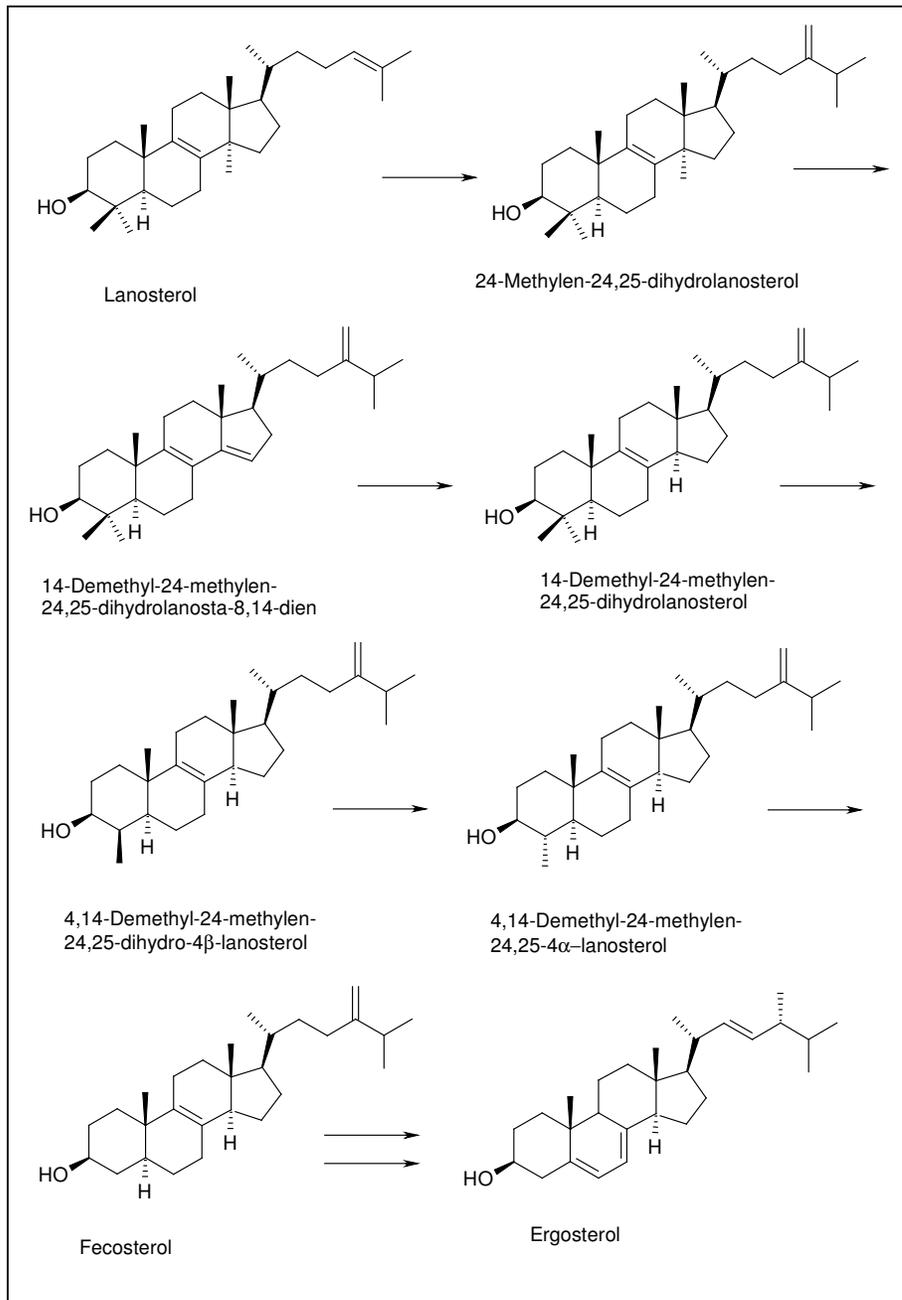


Abb. 3-6 Biosynthese von Ergosterin in Baumpilzen

### 3.2.1 Nomenklatur und Stereochemie steroidartiger Verbindungen

Für die Nomenklatur der recht komplexen Triterpene, hat es sich bewährt, für bestimmte Grundgerüste Trivialnamen zu verwenden. Die für die vorliegende Arbeit wichtige Nomenklatur und Nummerierung der Grundgerüste werden in Abbildung 3-7 gezeigt<sup>[25]</sup>.

Die Struktur der hier behandelten Triterpenoide leitet sich vom Gonan ab, einem perhydrierten 1,2-Cyclopentanophenantren. Die Ringe werden mit A, B, C und D durchnummeriert.

Je nach Verknüpfung der Ringe unterscheidet man zwischen der 5  $\alpha$ -Reihe (A/B, B/C, C/D trans verknüpft) und 5  $\beta$ -Reihe (A/B cis, B/C und C/D trans-verknüpft<sup>[26]</sup>). In Abbildung 3-8 sind die für die Arbeit wichtigen Grundgerüste mit ihrer Stereochemie (5  $\alpha$ -Reihe) dargestellt. Da ein System anellierter Cyclohexanringe wie das der Steroide (Triterpene) bei größtmöglicher Zahl von Sessel-Konformationen thermodynamisch stabil ist, gibt es für jede Position des Steroidgerüsts eine endgültige Beziehung zwischen konfigurationeller ( $\alpha$  oder  $\beta$ ) und konformationeller (a oder e) Orientierung eines Liganden<sup>[26]</sup>.

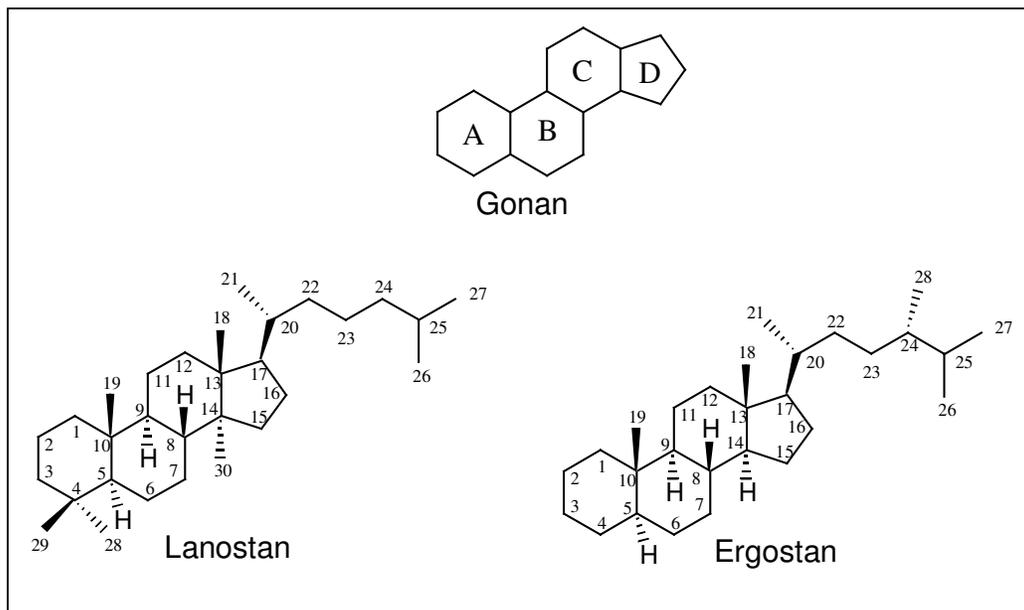


Abb. 3-7 Nomenklatur einiger Grundgerüste, Nummerierung der Kohlenstoffe und Bezeichnung der Ringe

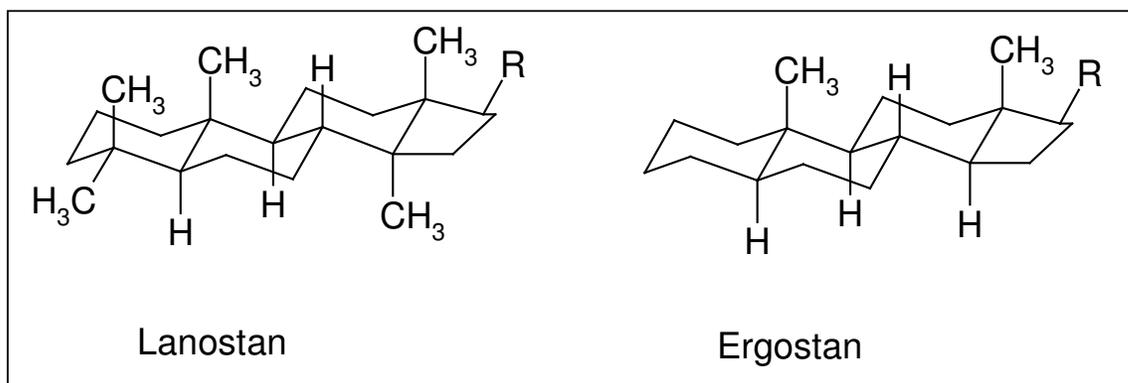


Abb. 3-8 Stereochemie des Lanostan- und Ergostan-Ringsystems

### 3.3 Untersuchte Pilzarten

#### 3.3.1 Taxonomische Zuordnung

Die taxonomischen Zuordnungen sind in Tabelle 3-1 aufgelistet.

Tabelle 3-1: Taxonomische Zuordnung der untersuchten Spezies

| Spezies                           | Familie              | Gattung              | Ordnung         | Unterklasse     | Klasse         |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| <i>Ganoderma lucidum</i>          | Ganodermataceae      | Ganoderma            | Aphyllophorales | Hymenomycetidae | Basidiomycetes |
| <i>Ganoderma applanatum</i>       |                      |                      |                 |                 |                |
| <i>Spongiporus leucomallendus</i> | Polyporaceae s. lat. | Spongiporus          |                 |                 |                |
| <i>Spongiporus caesius</i>        |                      | Bjerkandera          |                 |                 |                |
| <i>Bjerkandera adusta</i>         |                      |                      |                 |                 |                |
| <i>Laetiporus sulphureus</i>      |                      | Laetiporus           |                 |                 |                |
| <i>Datronia mollis</i>            |                      | Datronia             |                 |                 |                |
| <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>    |                      | Pycnoporus           |                 |                 |                |
| <i>Stereum hirsutum</i>           |                      | Corticiaceae s. lat. |                 |                 |                |
| <i>Schizophyllum commune</i>      | Schizophyllaceae     | Schizophyllum        |                 |                 |                |

[27], [28]

## 4 Spezieller Teil

### 4.1 Identifizierung flüchtiger und nichtflüchtiger Inhaltsstoffe von Baumpilzen

#### 4.1.1 *Ganoderma lucidum*

Dieser Pilz ist nieren- bis halbkreisförmig, 5 bis 20 cm breit und 1 bis 3 cm dick. Die Oberseite ist konzentrisch gefurcht und zeigt eine glänzende, dünne gelborange bis rostbraune, manchmal schwarzbraune Lackkruste. Der Rand ist zur Wachstumszeit weiß gefärbt. Der Stiel sieht aus wie ein lackierter Finger, mit weißlicher Spitze emporwachsend. Später biegt er sich ab und verbreitet sich, wobei der Hut gebildet wird. Er kann bis 25 cm lang werden. Der einjährige Pilz wächst meist saprophytisch (Weißfäuleerreger) an Eichen und Buchen, selten an anderen Laub- und Nadelhölzern. Fruchtkörper kommen meist von Juli bis Oktober vor.

Synonyme: -<sup>[27]</sup>

Wie schon in Abschnitt 1.1 erwähnt, ist *Ganoderma lucidum* seit langer Zeit als Heilpilz beliebt. Man verwendet in der neueren Zeit Extrakte zur Vorbeugung oder zur Behandlung

mancher Krebsarten. Selbst eine Wirkung gegen AIDS konnte nachgewiesen werden<sup>[5]</sup>. Daher ist dieser Pilz einer der weltweit meistuntersuchten Pilze. Aus diesem Pilz wurden schon über 100 Triterpenoide isoliert. Besonders die Ganoderische-Säuren sind hier hervorzuheben (s. Abb. 4-1). Biologische Aktivitäten wurden von vielen der isolierten Substanzen bestimmt. Ganoderische Säure B (Abb. 4-2) zeigt zum Beispiel Aktivität gegen Bluthochdruck. Ganoderiol F zeigt Aktivität gegen HIV<sup>[5]</sup>. Auch Polysaccharide zeigten biologische Aktivität. Es wurden Polysaccharide isoliert, die immunstimulierend wirken (Bao<sup>[29]</sup>). Das ätherische Öl dieses Pilzes ist bisher jedoch nicht untersucht worden. In Abschnitt 4.1.1.1 dieser Arbeit wird die Zusammensetzung des ätherischen Öls besprochen.



Abb. 4-1 *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Foto: ©Andy Overall<sup>[30]</sup>

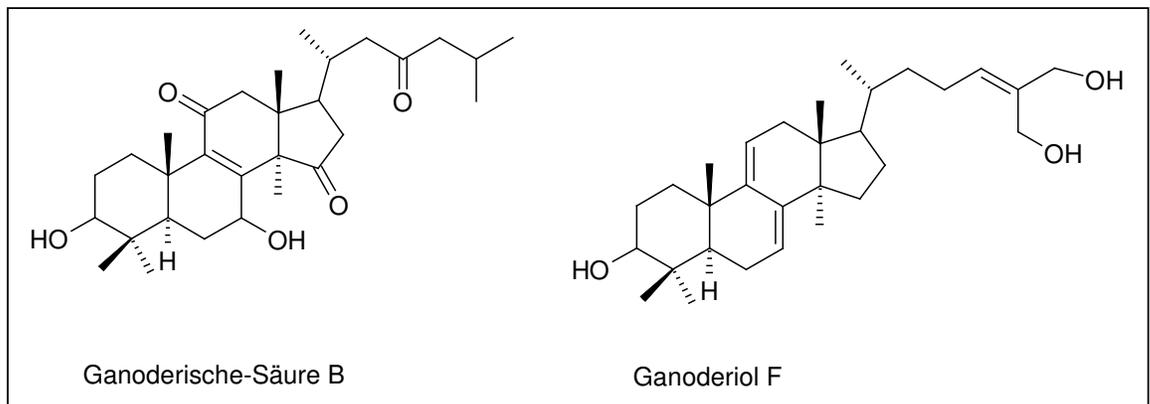


Abb. 4-2 Aus *Ganoderma lucidum* isolierte Triterpene

#### 4.1.1.1 Flüchtige Inhaltsstoffe

Im ätherischem Öl von *Ganoderma lucidum* findet man mit insgesamt 17.9% Anteil (die prozentualen Angaben hier sind stets Prozentwerte der Gesamtfläche des Chromatogramms) die Monoterpene *R*-(-)-Linalool, *S*-(+)-Carvon (Enantiomere durch enantioselektive GC bestimmt, s. Abschnitte 4.1.1.2 und 6.12.1.1.1) und *trans*-Anethol, die die Hauptkomponenten bilden. Ihre prozentualen Anteile betragen 4.4% respektive 4.4% und 9.1%. Mit einem Anteil von 4.6% im Öl enthalten ist Phenylpropan.

Eine recht große Anzahl von weiteren Monoterpenen wie  $\alpha$ -Pinen (1.1%), 1,8-Cineol (1.2%), Fenchon (0.7%), *o*-Cymen,  $\alpha$ -Thujon,  $\alpha$ -Pinenepoxid, Campher, *trans*-Pinocarveol, Menthon

(0.3%), Isopinocamphon, Pinocarvon, Isomenthon, Borneol, Terpinen-4-ol (2.1%), Dillether,  $\alpha$ -Terpineol (2.7%), Piperiton und Geranial sind im ätherischen Öl dieses Pilzes enthalten. Bei den Sesquiterpenen sind besonders  $\alpha$ -Bisabolol und *trans*- $\alpha$ -Bergamoten mit Anteilen von ca. 2.0% und 1.8% zu nennen.

Wie bei vielen anderen Pilzen findet man im ätherischen Öl freie Fettsäuren<sup>[10]</sup>. *n*-Tetradecan-, *n*-Pentadecan-, *n*-Hexadecan- und Linolsäure stellen zusammen einen Anteil von 8.5% dar. In kleineren Mengen sind auch *n*-Octan-, *n*-Nonan- und *n*-Dodecansäure enthalten.

Es wurden 3 Substanzen identifiziert, die zum ersten Mal in Baumpilzen nachgewiesen wurden. Es handelt sich um Cedrol, Cuparen, Isopinocamphon und Borneol. Cedrol wurde schon als flüchtige Substanz des Pilzes *Penicillium italicum* identifiziert<sup>[31]</sup>, der vor allem in Innenräumen der menschlichen Gesundheit schaden kann. Cuparen ist aus Fusarien bekannt<sup>[32]</sup>. SPME-Untersuchungen an der Trüffelart *Tuber borchii* zeigten Isopinocamphon und Borneol als Bestandteile der flüchtigen Komponenten dieses Pilzes<sup>[33]</sup>.

Phenylpropan ist als Bestandteil von Erdöl oder Kohle beschrieben<sup>[34]</sup>, und ist noch nicht als Substanz aus der belebten Natur identifiziert worden.

(*E*)-Nerolidol, 1-Hepten-3-on, *p*-Methylanisol, *ar*-Curcumen, Undecanal, *trans*-Pinocarveol, Pinocarvon, *trans*- $\alpha$ -Bergamoten, *trans*-Anethol, Estragol,  $\alpha$ -Pinenepoxid, Dillether, Carvon, Geranial, Isomenthon,  $\alpha$ -Ylängen, Dauen, Bisabololoxid B,  $\beta$ -Bisabolen,  $\alpha$ -Bisabolol,  $\beta$ -Iron, Fenchylacetat, und 2-Himalachen-7 $\beta$ -ol sind bislang in Pilzen ebenfalls unbekannt.

Interessant in diesem Zusammenhang sind die biologischen Aktivitäten einiger dieser flüchtigen Komponenten. Es ist erwiesen, dass *trans*-Anethol expektorante Eigenschaften besitzt. Es wird daher von der pharmazeutischen Industrie genutzt<sup>[35]</sup>. Isomenthon und Piperiton sind antiasthmatische Wirkstoffe<sup>[36]</sup>.  $\alpha$ -Bisabolol besitzt antiphlogistische sowie spasmolytische Eigenschaften<sup>[37]</sup>, Bisabololoxid B ist ebenfalls ein Spasmolytikum<sup>[38]</sup>. Weitere Inhaltsstoffe wie z.B. Carvon, Linalool und 1,8-Cineol<sup>[39], [40]</sup> besitzen antimikrobielle Eigenschaften.

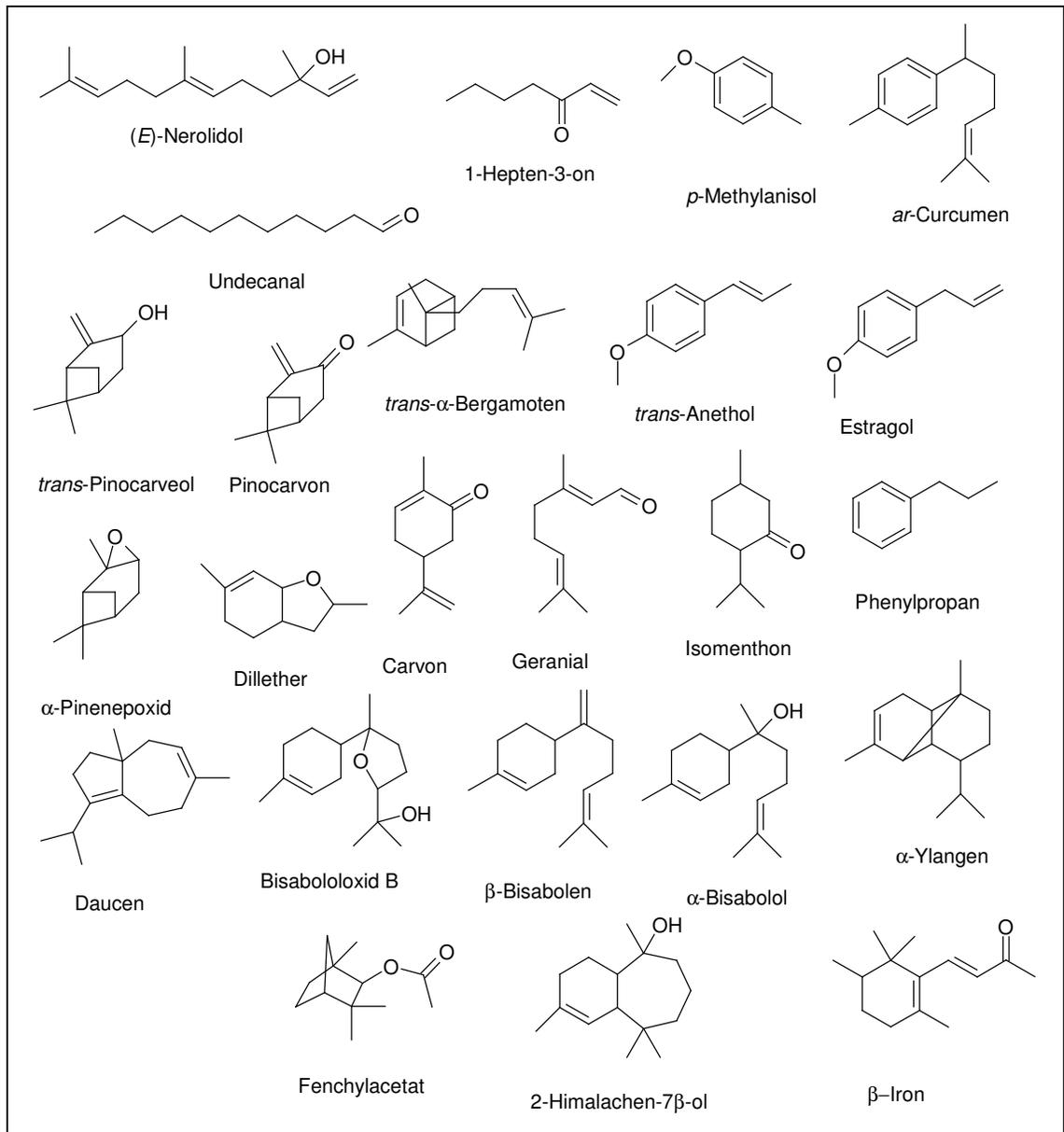
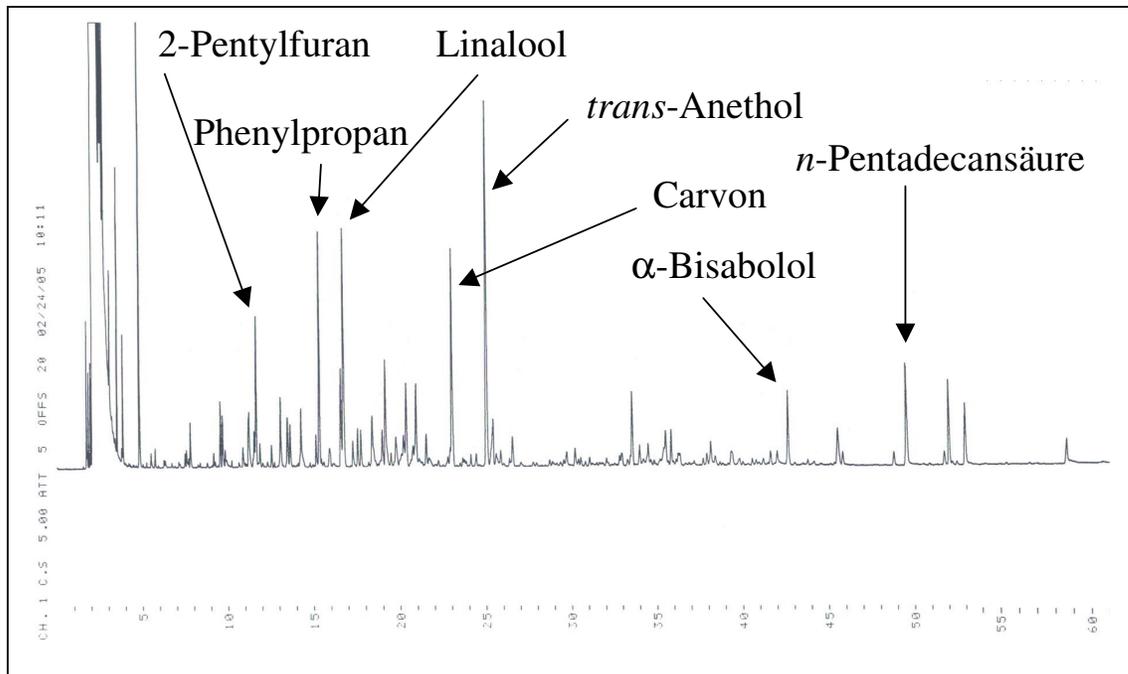


Abb. 4-3 Flüchtige Substanzen aus *G. lucidum*

Abbildung 4-4 zeigt das GC-FID-Chromatogramm. Die Substanzen wurden anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert<sup>[41]</sup>.

Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-1 aufgeführt. Für die Substanzen, die in Mengen unter 0.1% vorliegen, werden keine Retentionszeiten im CG-FID angegeben.

Abb.4-4 GC-FID-Chromatogramm des ätherischen Öls von *Ganoderma lucidum*Tabelle 4-1 Flüchtige Substanzen und deren prozentuale Anteile aus *G. lucidum*

\* Kováts-Index

\*\* Relativer prozentualer Anteil der flüchtigen Substanzen basierend auf GC-FID; mit + markierte Substanzen sind in einer Menge kleiner als 0.1% enthalten

| Peak No. | Substanz                       | GC-MS |                | GC-FID         | %** |
|----------|--------------------------------|-------|----------------|----------------|-----|
|          |                                | KI*   | M <sup>+</sup> | R <sub>t</sub> |     |
| 1        | 2-Heptanon                     | 871   | 114            |                | +   |
| 2        | <i>n</i> -Heptanal             | 882   | 114            | 7.79           | 0.7 |
| 3        | <i>n</i> -Nonan                | 906   | 128            |                | +   |
| 4        | $\alpha$ -Pinen                | 936   | 136            | 9.56           | 1.1 |
| 5        | 1-Hepten-3-on                  | 956   | 112            |                | +   |
| 6        | 6-Methyl-5-heptene-2-on        | 972   | 126            | 11.24          | 1.2 |
| 7        | 2-Pentylfuran                  | 981   | 138            | 11.66          | 2.8 |
| 8        | <i>p</i> -Methylanisol         | 1004  | 122            | 12.57          | 0.4 |
| 9        | Phenylacetaldehyd              | 1012  | 120            | 13.08          | 1.6 |
| 10       | 1,8-Cineol                     | 1024  | 154            | 13.50          | 1.2 |
| 11       | ( <i>E</i> )-2-Octenal         | 1034  | 126            | 13.65          | 1.0 |
| 12       | Phenylpropan                   | 1065  | 120            | 15.34          | 4.6 |
| 13       | Fenchon                        | 1069  | 152            | 15.94          | 0.7 |
| 14       | <i>o</i> -Cymen                | 1076  | 134            |                | +   |
| 15       | <i>n</i> -Nonanal              | 1076  | 142            | 16.59          | 2.0 |
| 16       | <i>R</i> -(-)-Linalool         | 1086  | 154            | 16.74          | 4.4 |
|          | <i>S</i> -(+)-Linalool         |       |                |                | 1.5 |
| 17       | $\alpha$ -Thujon               | 1089  | 152            |                | +   |
| 18       | $\alpha$ -Pinenepoxid (Isomer) | 1116  | 152            |                | +   |
| 19       | Campher                        | 1123  | 152            |                | +   |
| 20       | <i>trans</i> -Pinocarveol      | 1126  | 152            |                | +   |
| 21       | Menthon                        | 1136  | 154            | 19.48          | 0.3 |
| 22       | <i>n</i> -Nonanol              | 1149  | 144            | 19.78          | 1.1 |

|    |                                     |      |     |       |     |
|----|-------------------------------------|------|-----|-------|-----|
| 23 | Isopinocamphon                      | 1151 | 152 |       | +   |
| 24 | Pinocarvon                          | 1137 | 152 |       | +   |
| 25 | Isomenthon                          | 1146 | 154 |       | +   |
| 26 | Borneol                             | 1150 | 154 |       | +   |
| 27 | <i>n</i> -Octansäure                | 1156 | 144 |       | +   |
| 28 | Terpinene-4-ol                      | 1164 | 154 | 20.37 | 2.1 |
| 29 | Dillether                           | 1176 | 152 |       | +   |
| 30 | $\alpha$ -Terpineol                 | 1176 | 152 | 20.95 | 2.7 |
| 31 | Estragol                            | 1175 | 148 |       | +   |
| 32 | <i>n</i> -Decanal                   | 1180 | 156 | 21.53 | 0.8 |
| 33 | <i>R</i> -(-)-Carvon                | 1214 | 150 | 23.03 | 0.9 |
|    | <i>S</i> -(+)-Carvon                |      |     |       | 4.4 |
| 34 | Piperiton                           | 1226 | 152 |       | +   |
| 35 | ( <i>E</i> )-2-Decenal              | 1240 | 154 |       | +   |
| 36 | Gernial                             | 1244 | 152 |       | +   |
| 37 | <i>n</i> -Nonansäure                | 1263 | 158 | 24.45 | 0.3 |
| 38 | <i>trans</i> -Anethol               | 1263 | 148 | 25.04 | 9.1 |
| 39 | 2-Undecanon                         | 1273 | 170 | 25.43 | 1.8 |
| 40 | Undecanal                           | 1290 | 170 | 25.87 | 0.4 |
| 41 | ( <i>E,E</i> )-2,4-Decadienal       | 1291 | 152 | 26.56 | 0.8 |
| 42 | $\alpha$ -Ylängen                   | 1376 | 204 |       | +   |
| 43 | Daucen                              | 1380 | 204 |       | +   |
| 44 | Geranylaceton                       | 1430 | 194 |       | +   |
| 45 | <i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoten | 1430 | 204 | 33.59 | 1.8 |
| 46 | Isobazzenen                         | 1442 | 204 |       | +   |
| 47 | ( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesen     | 1446 | 204 |       | +   |
| 48 | <i>ar</i> -Curcumen                 | 1473 | 202 | 34.53 | 0.8 |
| 49 | $\beta$ -Iron                       | 1566 | 206 |       | +   |
| 50 | Cuparen                             | 1498 | 202 |       | +   |
| 51 | $\beta$ -Bisabolen                  | 1503 | 204 | 35.86 | 0.9 |
| 52 | $\delta$ -Cadinen                   | 1520 | 204 |       | +   |
| 53 | $\beta$ -Bazzenen                   | 1519 | 204 |       | +   |
| 54 | <i>n</i> -Dodecansäure              | 1554 | 200 |       | +   |
| 55 | ( <i>E</i> )-Nerolidol              | 1547 | 222 |       | +   |
| 56 | Cedrol                              | 1603 | 222 |       | +   |
| 57 | 2-Himachalene-7- $\beta$ -ol        | 1642 | 222 | 41.67 | 0.5 |
| 58 | Bisaboloxid B                       | 1654 | 238 | 42.05 | 0.9 |
| 59 | $\alpha$ -Bisabolol                 | 1673 | 222 | 42.69 | 1.2 |
| 60 | Tetradecansäure                     | 1748 | 198 | 45.59 | 1.4 |
| 61 | Drimenol                            | 1750 | 222 | 45.88 | 0.5 |
| 62 | Pentadecansäure                     | 1823 | 242 | 49.59 | 3.5 |
| 63 | <i>n</i> -Hexadecansäure            | 1951 | 256 | 53.08 | 2.1 |
| 64 | Linolsäure                          | 2095 | 280 | 58.56 | 1.1 |

#### 4.1.1.1 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Linalool und Carvon

Die gaschromatographische Analyse der Enantiomeren wurde mit den in Abschnitt 6.2.4.2 genannten Säulen durchgeführt. Es wurde für die Analyse von Linalool eine Methode von Krüger <sup>[42]</sup> als Basis für die Methodenentwicklung verwendet. Die Bedingungen für die Enantiomertrennung sind in Tabelle 6-6 aufgeführt. Die Retentionzeiten von *R*-(-)- und *S*-(+)-Linalool betragen 61 min. respektive 64.6 min. Der  $\alpha$ -Wert der Trennung betrug  $\alpha=1.060$  [ $R_t$  *S*-(+)/ $R_t$  *R*-(-)].

Für die Analyse von Carvon wurde eine Methode von König <sup>[43]</sup> als Basis für die Methodenentwicklung verwendet. Die Retentionszeiten für *S*-(+)- und *R*-(-)-Carvon betragen 18.8 min respektive 19.1 min. Der  $\alpha$ -Wert der Trennung betrug  $\alpha=1.016$  [ $R_t$  *R*-(-)/ $R_t$  *S*-(+)]. Durch Coinjektion der Enantiomere mit der Probe konnten sowohl *R*-(-)- und *S*-(+)-Linalool bzw. *R*-(-)- und *S*-(+)-Carvon identifiziert werden. Die Abbildungen 4-5 und 4-6 zeigten die Trennung der Enantiomere von Linalool und Carvon.

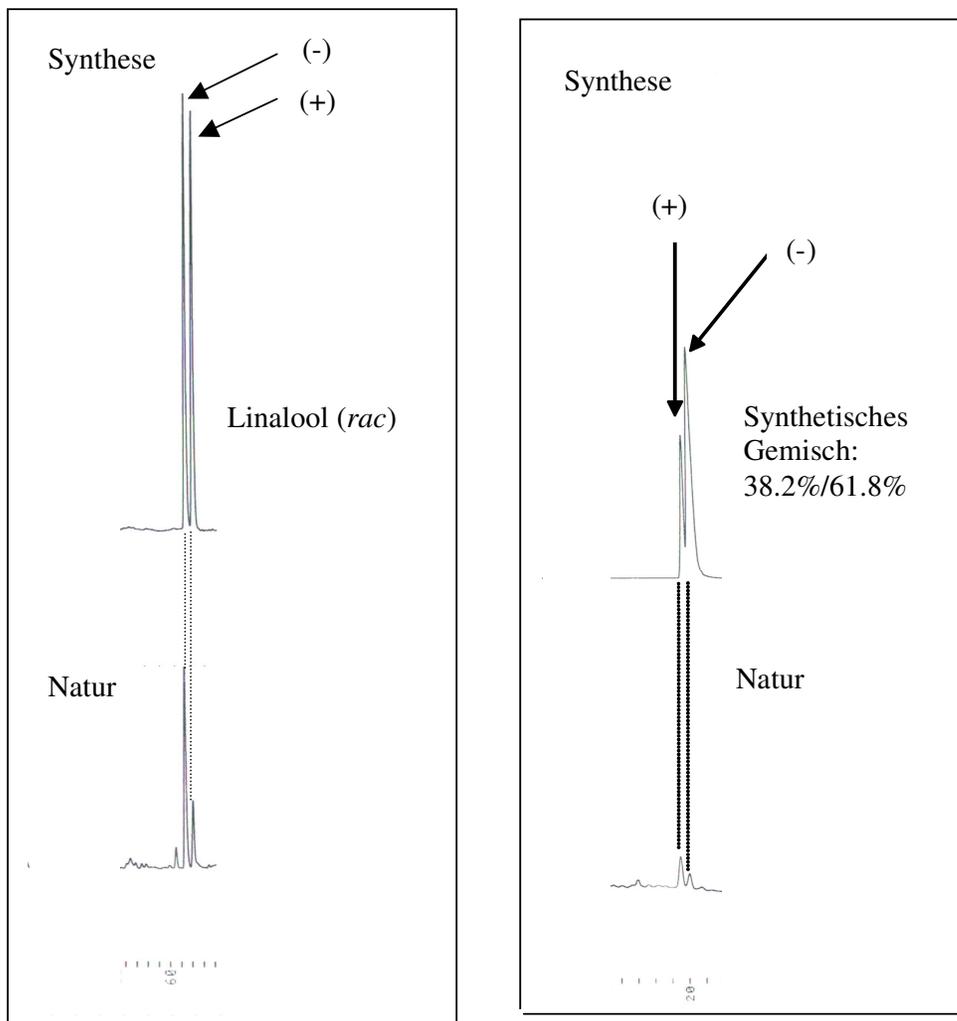


Abb. 4-5 Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Linalool und Carvon im ätherischen Öl von *G. lucidum*

#### 4.1.1.2 Nichtflüchtige Inhaltsstoffe

Mittels semi-präparativer HPLC (Abb. 4-6) wurden aus dem *n*-Hexanextrakt des Fruchtkörpers von *G. lucidum* einige Substanzen isoliert, deren Massenspektren auf Steroidester hindeuteten. Es wurde die in Abschnitt 6.2.3 genannte RP-18-Säule verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektion bei einer Wellenlänge von  $\lambda=210$  nm. Als Elutionsmittel wurde Acetonitril/*tert*-Butylmethylether (60/40, v/v) bei einem Fluß von 1 ml/min verwendet s. Abschnitt 6.12.1.2.1.

##### 4.1.1.2.1 Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat

Die NMR-Daten der Substanz sind in Tabelle 4-2 aufgeführt. Wichtige  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und HMBC-Kopplungen sind in Tabelle 4-3 aufgeführt.

Bei der fraglichen Substanz handelt es sich um Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat.

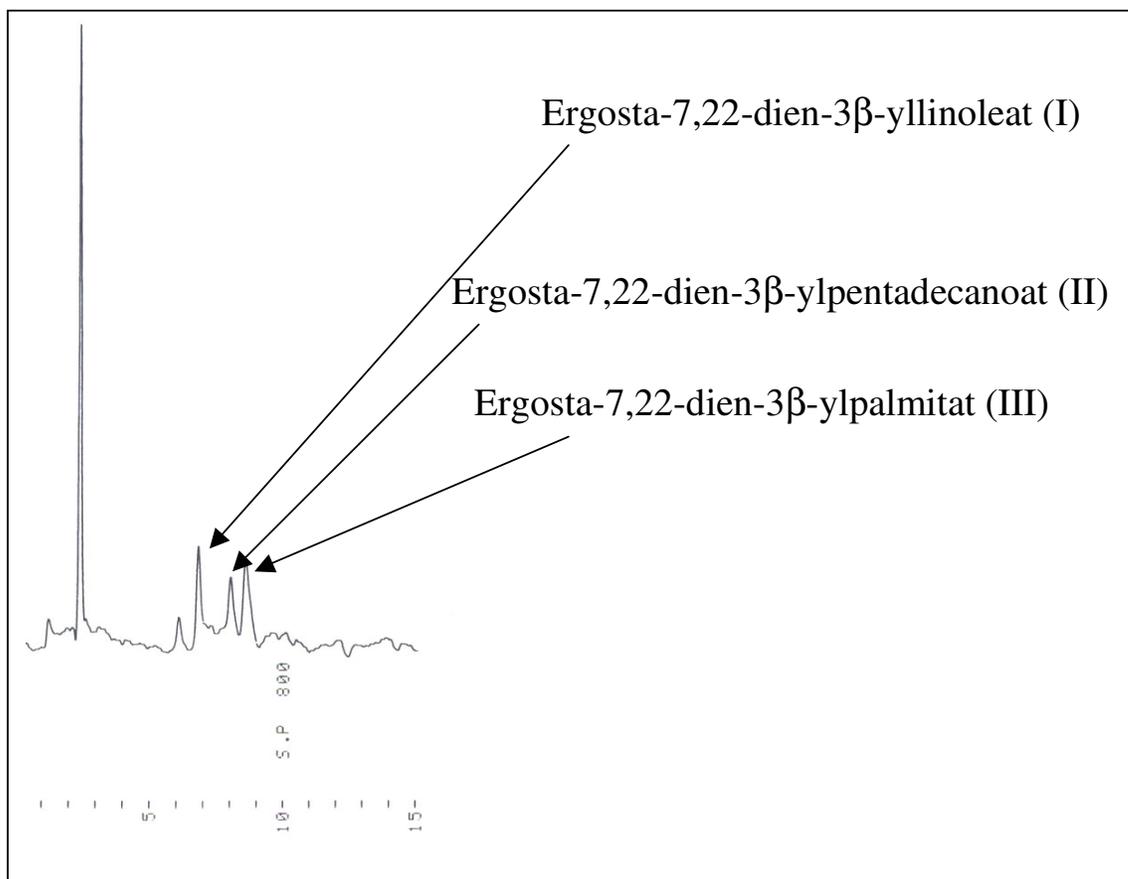


Abb. 4-6 HPLC-Trennung der Steroidester aus *G. lucidum*

Die Substanz besaß negative optische Drehung ( $[\alpha]_{20}^{589} = (-) 9.5$  ( $c=0.06$  Benzol)). Der Schmelzpunkt betrug  $91$  °C. Das EI-Massenspektrum (Abb. 4-7) der Substanz zeigte einen Molpeak bei  $622$   $m/z$ . Der  $m/z$ -Wert des hochaufgelösten Molpeaks betrug  $622.5674$ , was die Summenformel  $\text{C}_{43}\text{H}_{74}\text{O}_2$  (Berechneter Wert:  $622.5688$   $m/z$ ) liefert. Aus der Molmasse geht hervor, dass 7 Doppelbindungsäquivalente vorhanden sind.

Charakteristisch für ein Monoensteroidringsystem ist das Signal bei  $255$   $m/z$ <sup>[44]</sup>.

Wyllie und Djerassi <sup>[45]</sup> machten MS-Versuche mit deuterierten Steroiden, die Doppelbindungen in der Seitenkette besitzen. Das Fragmention 495  $m/z$  (65%) entspricht einem der dort postulierten Fragmente, an der die Doppelbindung an Position 22 beteiligt ist. Nach Ionisierung befindet sich die Ladung an C-22 oder C-23. Das Proton an Position C-17 wandert zum C-22 oder C-23. Gleichzeitig wandert die Methylgruppe C-18 an Position C-17. Die Ladung befindet sich nun in Position C-13. Der Methinwasserstoff an Position C-14 wandert zum Kohlenstoff mit dem freien Elektron an Position C-22 oder C-23, wobei sich eine Doppelbindung zwischen C-13 und C-14 bildet. Gleichzeitig verliert das Steroidgerüst die Seitenkette. Die Ladung befindet sich schließlich am C-17 (Abb. 4-8).

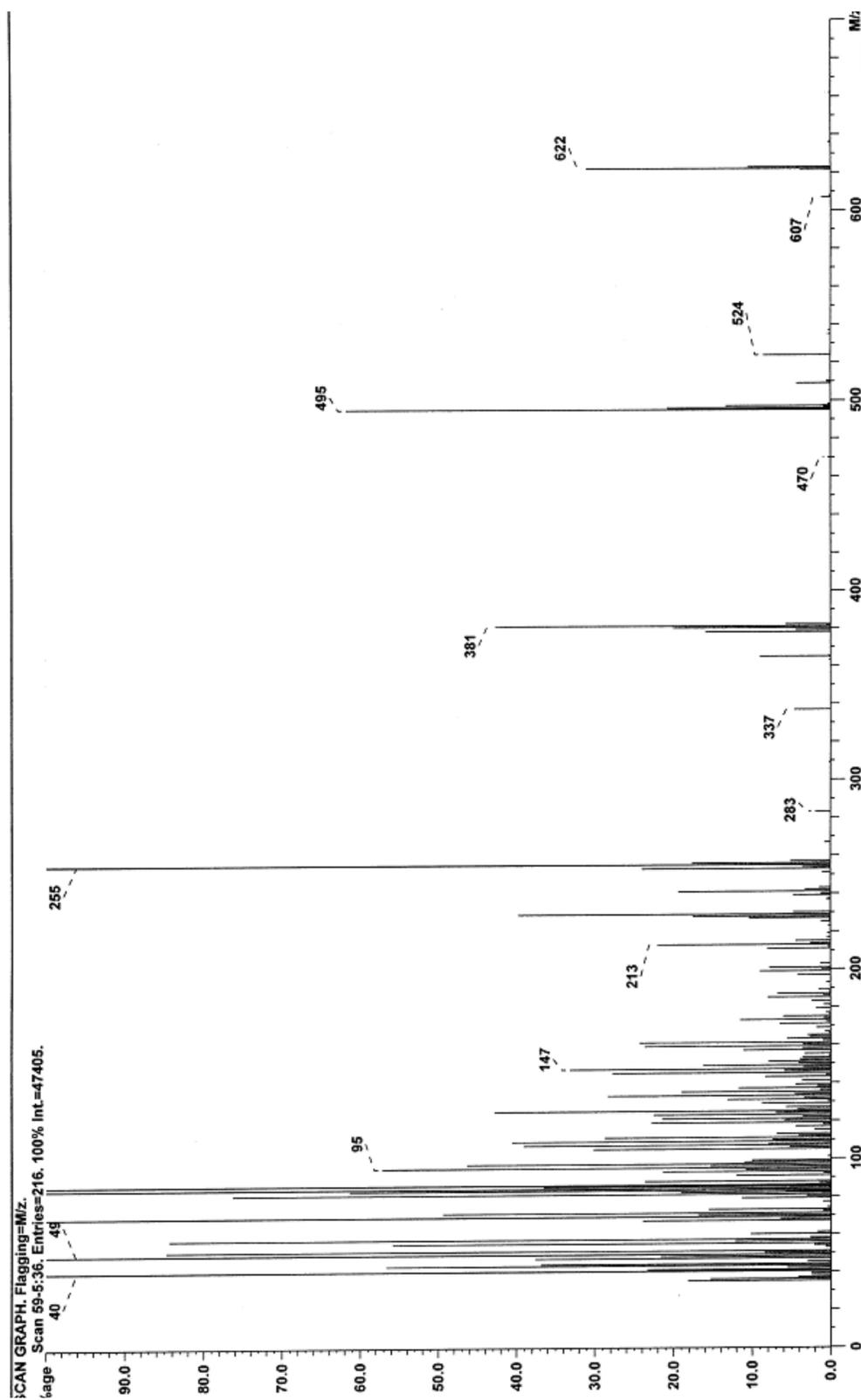


Abb. 4-7 EI-Massenspektrum von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat

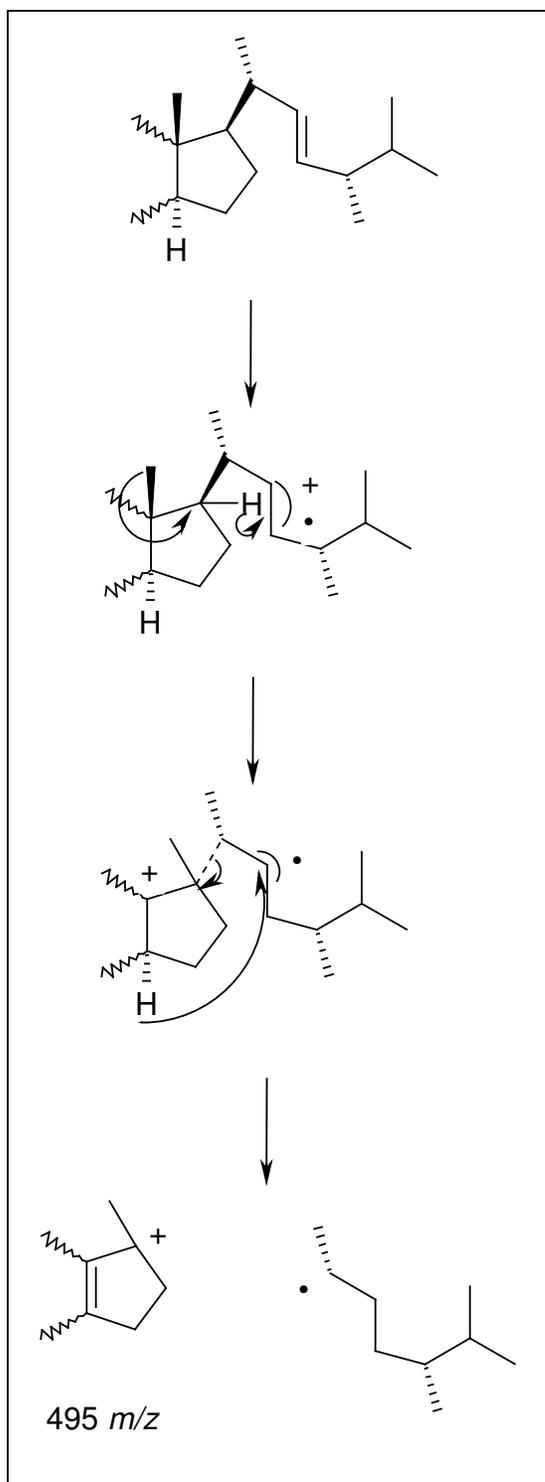


Abb. 4-8 Verlust der Seitenkette von Ergosta-7,22-dien-3β-ylpentadecanoat gemäß Wyllie und Djerassi

Eine Mc-Lafferty-Umlagerung mit anschließender Fragmentierung (s. Abb. 4-9) führt zum Verlust des Fettsäurerestes, wobei das Fragmention  $380\ m/z$  (20%) gebildet wird.

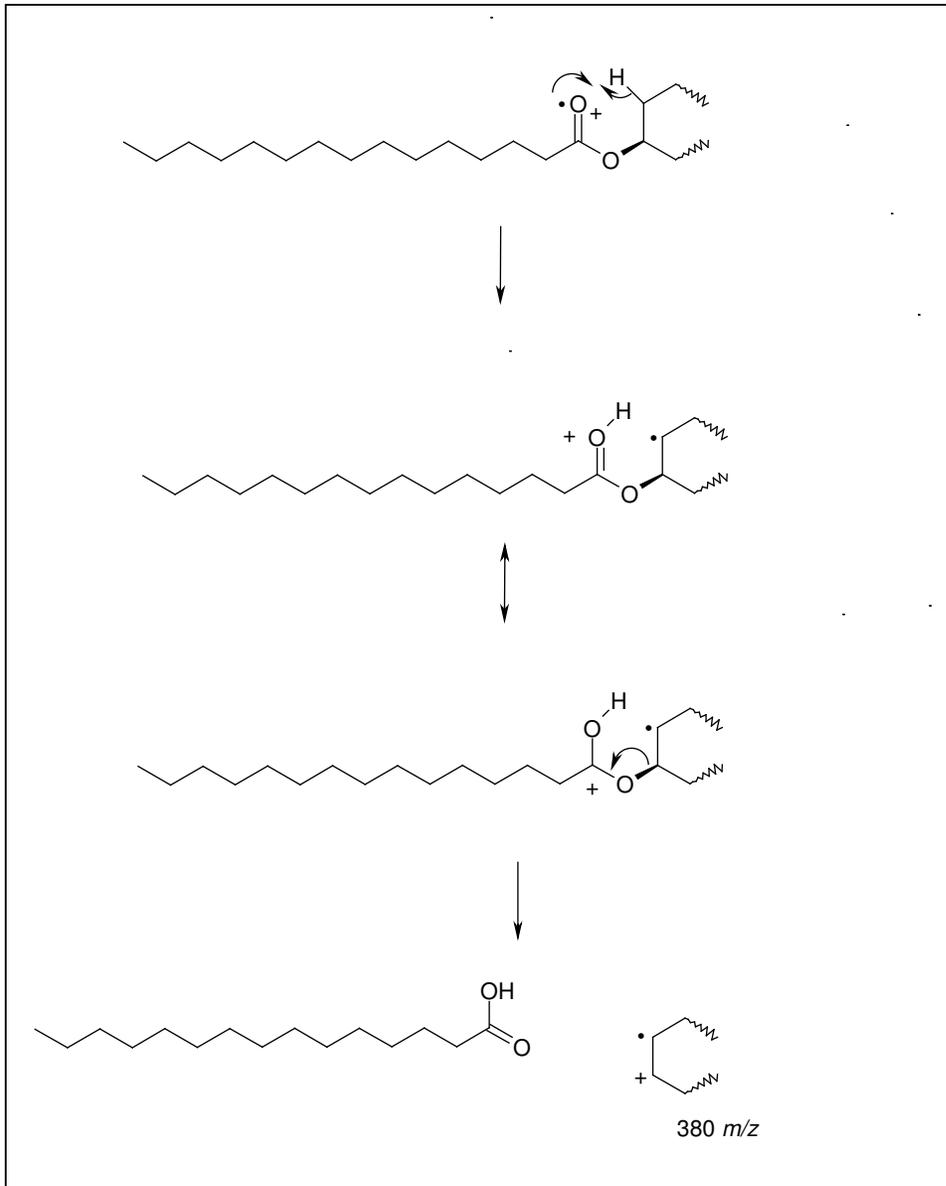


Abb. 4-9 McLafferty-Umlagerung von Ergosta-7,22-dien-3β-ylpentadecanoat

Allylsplattung und  $\sigma$ -Spaltung liefern das Fragmentation 125  $m/z$  (44%) (Abb. 4-10). Das Fragmentation 255  $m/z$  (Basispeak) kann durch Allylsplattung oder  $\sigma$ -Spaltung mit anschließender McLafferty-Umlagerung und Fragmentierung stattfinden.

Derivatisierungen der Verbindung wurden durchgeführt, um weitere Informationen zu erhalten. Mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) wurde eine Umesterung durchgeführt<sup>[46]</sup>. Nach der Reaktion lagen Pentadecansäure als Methylester und das Steroid unverestert vor. Dadurch konnte nach Einengen der Probe durch Zugabe von N-Methyltrimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA) das Steroid zum TMS-Ether derivatisiert werden. Mittels GC-MS-Analyse unter Verwendung der Datenbank MassLib<sup>[47]</sup> wurden sowohl der Methylester von Pentadecansäure und der TMS-Ether von Ergosta-7,22-dien-3β-ol identifiziert. Bei dem Naturstoff handelt es sich demnach tatsächlich um Ergosta-7,22-dien-3β-ylpentadecanoat.

In kleinen Mengen enthalten war eine weitere Substanz zu erkennen (siehe Abschnitt 4.1.1.2.2).

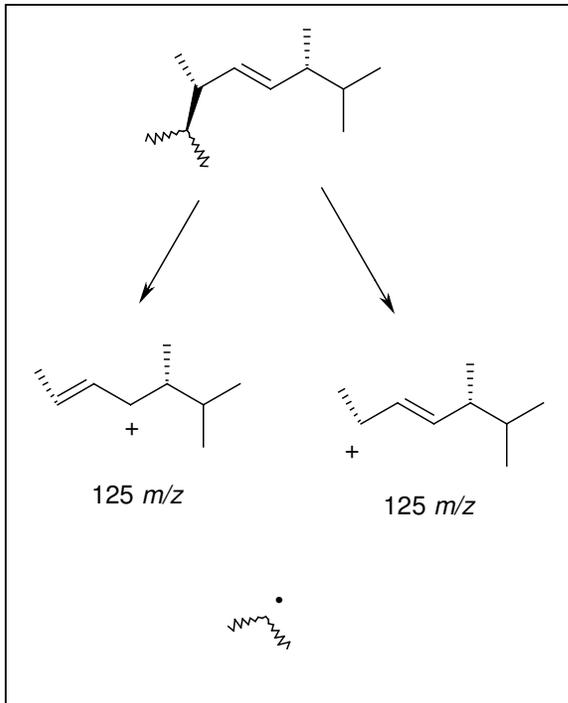


Abb. 4-10 Allylsplattung (links) und  $\sigma$ -Splattung (rechts) von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat

Das  $^1\text{H}$ - und HMQC-Spektrum zeigten die Anwesenheit von 2 Methyl-Singulets ( $\delta$  12.6, 13.4), 4 Methyl-Dubletts ( $\delta$  0.89-0.95, 1.01, 1.11) und ein Methyl-Multipllett ( $\delta$  0.89-0.95). Das  $^{13}\text{C}$ -PENDANT-Spektrum zeigte einen olefinischen quartären Kohlenstoff ( $\delta$  139.5), 3 olefinische Methin-Kohlenstoffe ( $\delta$  117.9, 132.3, 136.3) und ein Ester-Carbonyl-Kohlenstoff ( $\delta$  172.7). Da zwei C-C-Doppelbindungen und eine C-O-Doppelbindung erkannt wurden, müssen die vier restlichen Doppelbindungsäquivalente zu den Ringen gehören. Es handelt sich hier um einen Steroidester. Da der Hinweis aus dem Massenspektrum vorliegt, dass es sich um ein Monoensteroidringsystem handelt, spielen die Fernkopplungen besonders des Methin-Wasserstoffs in Position 5 eine große Rolle (Abb. 4-11).

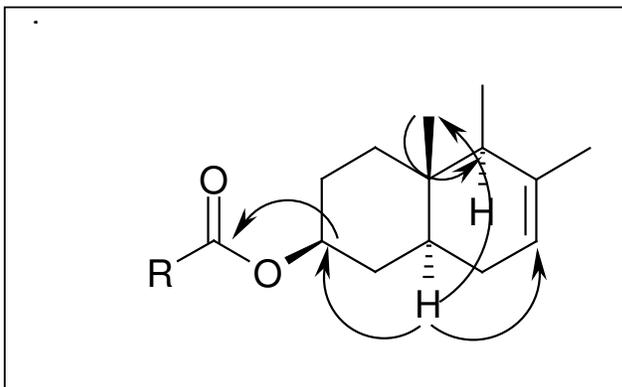


Abb. 4-11 Beobachte Fernkopplungen im A-B-Ringsystem

Das HMBC-Spektrum zeigte eine deutliche Kopplung zu dem olefinischen Kohlenstoff in Position 7 und auch zu einem Methin-Kohlenstoff bei 4.93 ppm, dessen große Tieffeldverschiebung einen Hinweis auf die Position der Esterfunktion gibt. Wiederum gibt es

unter anderem eine Kopplung mit einer der Singulett-Methylgruppen. Die Fernkopplung des Methin-Wasserstoffatoms an Position 3 mit einem Ester-Kohlenstoff bestätigt die Vermutung, dass das Steroid an dieser Position verestert ist. Wichtig ist die Kopplung des Methin-Wasserstoffs an Position 14 (Abb. 4-12) ebenfalls mit dem olefinischen Kohlenstoffatom an Position 7, sowie die Kopplung mit dem Kohlenstoff einer Singulett-Methylgruppe, deren Wasserstoffatome eine Fernkopplung mit einem Methin-Kohlenwasserstoff an Position 17 aufweisen.

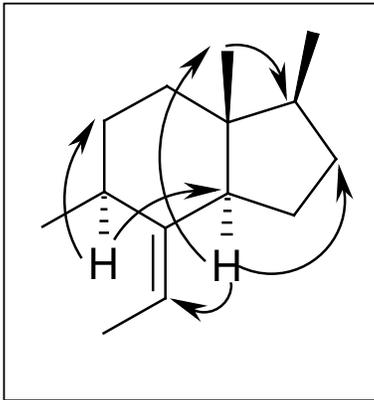


Abb. 4-12 Beobachte Fernkopplungen im C-D-Ringsystem

Das  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY zeigt eine starke Kopplung mit einem weiteren Methin-Wasserstoffatom, was auf eine  $^3\text{J}$ -Kopplung deutet (Abb. 4-13). Dieses Wasserstoffatom an Position 20 koppelt stark mit einer Dublett-Methylgruppe und einem olefinischen Wasserstoffatom, was zu dem Schluss führt, dass sich die zweite Doppelbindung an Position 22 befindet. Der restliche Teil der Seitenkette ist analog zu der Seitenkette eines Ergostansteroids. Man beobachtet Fernkopplungen einer Dublett-Methylgruppe mit dem olefinischen Kohlenstoff an Position 23, sowie mit dem Methin-Kohlenwasserstoff an Position 25, welcher starke Kopplungen im  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY mit zwei Dublett-Methylgruppen zeigt (C-26, C-27). Das NOESY-Spektrum zeigt die relative Konfiguration im Molekül, die mit der relativen Konfiguration des Ergostan-Ringsystems übereinstimmt.

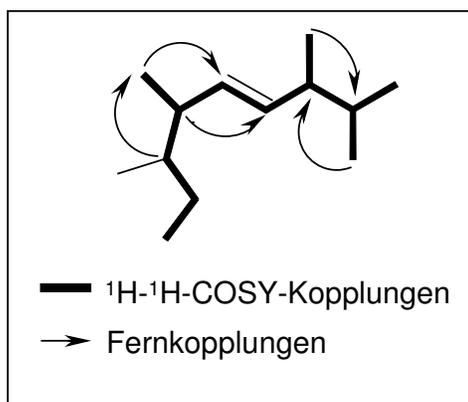


Abb. 4-13  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und Fernkopplungen der Seitenkette

Es handelt sich hier um einen neuen Steroidester, nämlich: Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat (Abb. 4-14). Die Substanz ist bisher weder synthetisiert noch als Naturstoff isoliert worden.

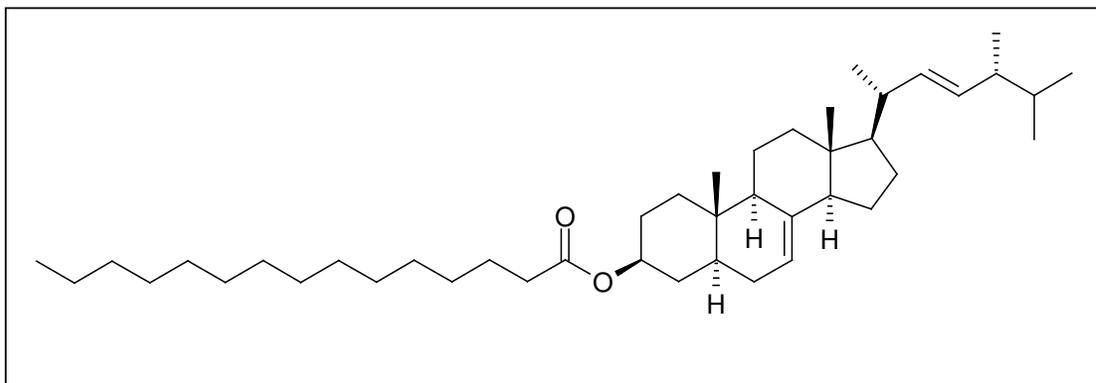


Abb. 4-14 Ergosta-7,22-dien-3β-ylpentadecanoat

Tabelle 4-2 <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten von Ergosta-7,22-dien-3β-ylpentadecanoat

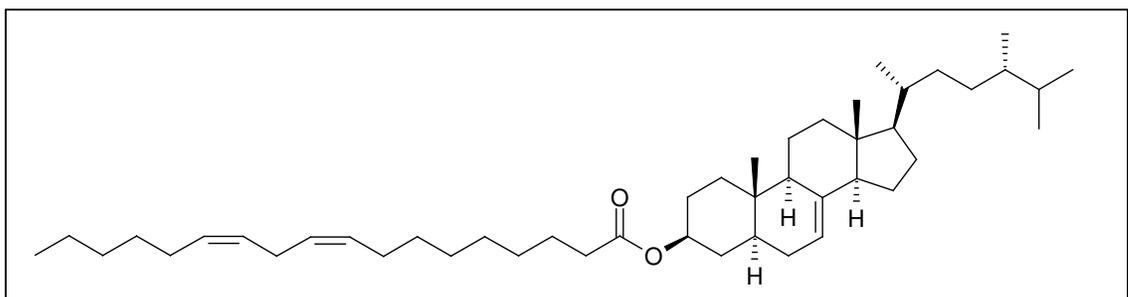
| Atom Nr.       | Ergosta-7,22-dien-3β-ylpentadecanoat<br>(C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) |                 |                   |
|----------------|--|-----------------|-------------------|
|                | δ <sup>1</sup> H   | M (J)           | δ <sup>13</sup> C |
| 1              | 1.65,0.93  | <i>m</i>        | 37.4              |
| 2              | 1.40,1.67  | <i>m</i>        | 30.2              |
| 3              | 4.93   | <i>m</i>        | 73.3              |
| 4              | 1.54,1.93  | <i>m</i>        | 28.05             |
| 5              | 1.53   | <i>m</i>        | 49.70             |
| 6              | 1.66,1.38  | <i>m</i>        | 30.0              |
| 7              | 5.19   | <i>br s</i>     | 117.9             |
| 8              | -  | -               | 139.5             |
| 9              | 1.27   | <i>m</i>        | 40.4              |
| 10             | -  | -               | 34.4              |
| 11             | 1.41   | <i>m</i>        | 22.0              |
| 12             | 1.97,1.17  | <i>m</i>        | 40.1              |
| 13             | -  | -               | 33.7              |
| 14             | 1.81   | -               | 55.6              |
| 15             | 1.69   | <i>m</i>        | 25.8              |
| 16             | 1.57   | <i>m</i>        | 23.5              |
| 17             | 1.25   | <i>m</i>        | 56.4              |
| 18             | 0.60   | <i>s</i>        | 12.6              |
| 19             | 0.75   | <i>s</i>        | 13.4              |
| 20             | 2.05   | <i>m</i>        | 41.2              |
| 21             | 1.11   | <i>d</i> (6.70) | 21.5              |
| 22             | 5.27   | <i>m</i>        | 136.3             |
| 23             | 5.27   | <i>m</i>        | 132.3             |
| 24             | 1.92   | <i>m</i>        | 43.5              |
| 25             | 1.50   | <i>m</i>        | 33.6              |
| 26             | 0.89-0.95  | <i>d</i> (6.87) | 19.2 -21.9        |
| 27             | 0.89-0.95  | <i>d</i> (6.87) | 19.2 -21.9        |
| 28             | 1.01   | <i>d</i> (6.90) | 18.0              |
| 29             | -  | -               | -                 |
| 30             | -  | -               | -                 |
| 31             | -  | -               | -                 |
| 1 (F. a.)      | -  | -               | 172.7             |
| 2              | 2.27   | <i>m</i>        | 35.3              |
| 3-14<br>(F. a) | 1.14-1.44  | <i>m</i>        | 28.7-34.5         |
| 15 (F. a)      | 0.92   | <i>m</i>        | 20.55             |

Tab. 4-3  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und HMBC-Kopplungen

| Wichtige Kopplungen               |                                     |                                       |                               |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY |                                     | HMBC                                  |                               |
| Proton(en)                        | koppeln mit:<br>Proton(en)          | Proton(en):                           | Koppeln mit<br>Kohlenstoff(e) |
| H <sub>1</sub> -25                | H <sub>1</sub> -24                  | H <sub>3</sub> -19                    | C-5,C-9,C1                    |
| H <sub>1</sub> -24                | H <sub>1</sub> -23                  | H <sub>1</sub> -5                     | C-7,C-3                       |
| H <sub>1</sub> -23                | H <sub>1</sub> -22                  | H <sub>1</sub> -3                     | C'-1                          |
| H <sub>1</sub> -20                | H <sub>1</sub> -17                  | H <sub>1</sub> -7                     | C-14                          |
| H <sub>1</sub> -7                 | H <sub>2</sub> -6                   | H <sub>1</sub> -9                     | C-12                          |
| H <sub>1</sub> -9                 | H <sub>2</sub> -11                  | H <sub>1</sub> -14                    | C-18,C-16                     |
| H <sub>1</sub> -5                 | H <sub>2</sub> -6,H <sub>2</sub> -4 | H <sub>3</sub> -18                    | C-12,C-14,C17                 |
| H <sub>1</sub> -3                 | H <sub>2</sub> -2,H <sub>2</sub> -4 | H <sub>1</sub> -17                    | C-21,C15                      |
| H <sub>3</sub> -15                | H <sub>2</sub> '-14                 | H <sub>3</sub> -21                    | C-22                          |
|                                   |                                     | H <sub>1</sub> -23                    | C-28,C-25                     |
|                                   |                                     | H <sub>3</sub> -26,H <sub>3</sub> -27 | C24                           |

#### 4.1.1.2.2 Ergosta-7-en-3 $\beta$ -yllinoleat

Ergosta-7-en-3 $\beta$ -yllinoleat coeluierte zum Teil mit Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat (siehe Abschnitte 4.1.1.2.1 und 6.12.1.2.1). Im Massenspektrum von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat erkennt man einen Molpeak mit 660  $m/z$ . Nach Umesterung mit TMSH und anschließender Silylierung mit MSTFA konnte man mittels GC-MS Linolsäure und den TMS-Ether von Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol identifizieren. Diese Substanz wurde bereits in dem Holz zersetzenden Basidiomyceten *Fomitopsis pinicola* identifiziert. Nun wurde die Substanz jedoch auch erstmalig in *Ganoderma lucidum* identifiziert<sup>[48]</sup>.

Abb. 4-15 Ergosta-7-en-3 $\beta$ -yllinoleat

#### 4.1.1.2.3 Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpalmitat

Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpalmitat wurde ebenfalls aus dem *n*-Hexanextrakt mittels semi-präparativer HPLC isoliert (siehe Abschnitte 4.1.1.2.1 und 6.12.1.2.1). Eine negative optische Drehung der Substanz konnte gemessen werden.

Der Schmelzpunkt betrug 92 °C. Das EI-Massenspektrum der Substanz zeigte einen Molpeak bei 636  $m/z$  (72%). Auch hier ist wie bei der vorherigen Substanz der Peak 255  $m/z$

(Basispeak) enthalten, was auf ein Monoensteroidringsystem deutet. Das Fragmention mit der Masse 380  $m/z$  (12%) ist hier ebenfalls enthalten.

Die Daten aus dem Massenspektrum sowie der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren deuten auf eine Verbindung mit 7 Doppelbindungsäquivalenten. Mit zwei C-C-Doppelbindungen und einer C-O-Doppelbindung kommt man auch hier auf eine Anzahl von vier Ringen. Es wurden alle Konnektivitäten, die bei Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat beschrieben wurden, auch hier bestätigt. Die Substanz wurde mit TMSH umgeestert und anschließend mit MSTFA silyliert. Mittels GC-MS-Analyse konnten Palmitinsäuremethylester und der TMS-Ether von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol identifiziert werden. Ein Vergleich der erhaltenen Spektren mit denen von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpalmitat (Abb. 4-16) lieferte eine vollständige Übereinstimmung. Diese Verbindung wurde bereits zuvor aus *G. lucidum* isoliert<sup>[49]</sup>.

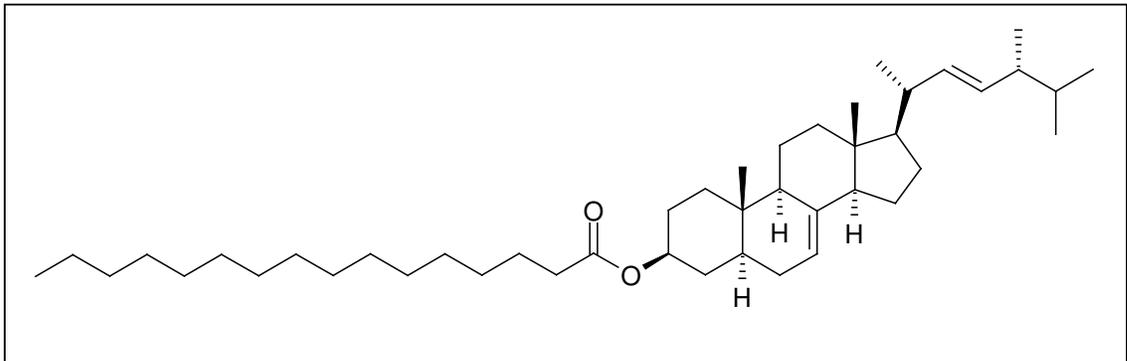
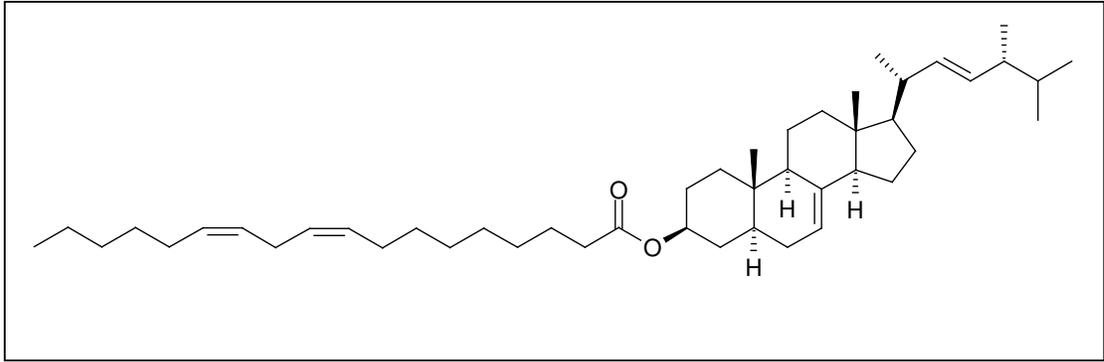


Abb. 4-16 Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpalmitat

#### 4.1.1.2.4 Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -yllinoleat

Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -yllinoleat wurde gleichfalls mittels semi-präparativer HPLC aus dem *n*-Hexanextrakt isoliert (siehe Abschnitte 4.1.1.2.1 und 6.12.1.2.1). Im EI-Massenspektrum konnte man einen Molpeak von 660  $m/z$  (10%) beobachten. Die Fragmentionen 380  $m/z$  (20%) und 255  $m/z$  (52%) sind auch im Spektrum vorhanden, was wiederum auf einen Fettsäureester von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol hindeutet. In diesem Fall erkennt man jedoch im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum 7 olefinische Methin-Protonen. Es sind 4 C-C-Doppelbindungen vorhanden. Die Informationen aus dem Massenspektrum und den NMR-Spektren führten zu der Summenformel  $\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{O}_2$ . Es handelt sich um eine Substanz mit 9 Doppelbindungsäquivalenten. Abzüglich der aus den NMR-Spektren erkannten C-C- und C-O-Doppelbindungen (fünf Doppelbindungen) ergeben sich 4 Ringe. Auch hier konnten alle Konnektivitäten aus den beiden vorherigen Substanzen bestätigt werden. Eine Umesterung mit TMSH mit anschließender GC-MS-Analyse führte zur Identifizierung von Linolsäure. Ein Vergleich der erhaltenen Spektren mit denen des bekannten Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -yllinoleats (Abb. 4-17) lieferte eine vollständige Übereinstimmung. Auch diese Verbindung ist zuvor ebenfalls in *Ganoderma lucidum* nachgewiesen worden<sup>[50]</sup>.

Abb. 4-17 Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -yllinoleat

#### 4.1.2 *Spongiporus leucomallellus*

Dieser Pilz hat 2-5cm breite Fruchtkörper. Sie sind resupinat oder mit 1-3 cm abstehenden Hutkanten. Sie sind oft verwachsen oder dachziegelig und sehr weich. Junge Fruchtkörper sind filzig-faserig mit weißlicher Farbe. Mit fortschreitendem Alter sind sie rostgelb gefleckt und schwach zoniert. Der Pilz ist Saprophyt an feuchtem, schon etwas älterem Kiefernholz (Braunfäuleerreger), besonders an am Boden liegenden Faulstämmen, die er durch eine Braunfäule zersetzt. Er ist überall in Kiefernwäldern im Herbst vorhanden, seltener wächst er auch an Fichte oder an Laubhölzern in Mischwäldern.

Synonyme: - *Tyromyces leucomallellus* Murr.

- *Tyromyces gloeocystidiatus* Kotl. & Pouz.
- *Postia leucomallella* (Murill) Jülich <sup>[12], [27]</sup>

In Abschnitt 4.1.2.1 dieser Arbeit wird die Zusammensetzung des ätherischen Öls besprochen.

Abb. 4-17 *Spongiporus leucomallellus* (Murill) David <sup>[12]</sup>

##### 4.1.2.1 Flüchtige Inhaltsstoffe

Die Hauptkomponente im ätherischen Öl von *S. leucomallellus* ist *R*-(-)-1-Octen-3-ol (37.5%; Enantiomere bestimmt durch enantioselective GC s. Abschnitte 4.1.2.1.1, 6.12.1.1.1 und 6.12.2.1.1), eine weit verbreitete flüchtige Komponente in Pilzen, die den typischen Pilzgeruch verursacht. Das Monoterpen *R*-(-)-Linalool ist mit einem Anteil von 15.8% an zweiter Stelle, gefolgt von 1-Hepten-3-on (5.1%) und (*Z*)-Nerolidol (2.9%).

(*E*)- $\beta$ -Ocimen sowie  $\alpha$ -Copaen sind bisher nicht in Baumpilzen nachgewiesen worden. Eine Identifizierung von (*E*)- $\beta$ -Ocimen wurde in Untersuchungen des Pilzes *Penicillium roqueforti*

mittels Festphasen-Mikroextraktion (SPME: solid-phase microextraction) und anschließender gaschromatographischer Analyse berichtet<sup>[51]</sup>.  $\alpha$ -Copaen wurde aus dem Pilz *Aspergillus fumigatus* identifiziert<sup>[52]</sup>.

In Pilzen noch nicht nachgewiesene Substanzen sind hier die Sesquiterpene  $\alpha$ -Muurolen, Cyclofarnesa-5(14),8,10-trien, Sandvicen und T-Cadinol (Abb. 4-19).

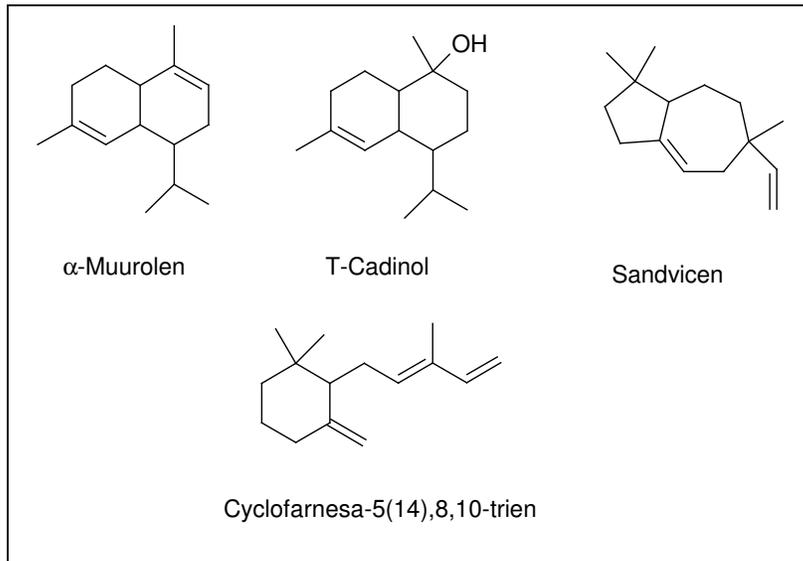


Abb. 4-19 Flüchtige Substanzen aus *S. leucomallellus*

Abbildung 4-20 zeigt das GC-FID-Chromatogramm. Die Substanzen wurden anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert<sup>[41]</sup>.

Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-3 aufgeführt. Für die Substanzen, die in Mengen unter 0.1% vorliegen, werden keine Retentionszeiten im CG-FID angegeben.

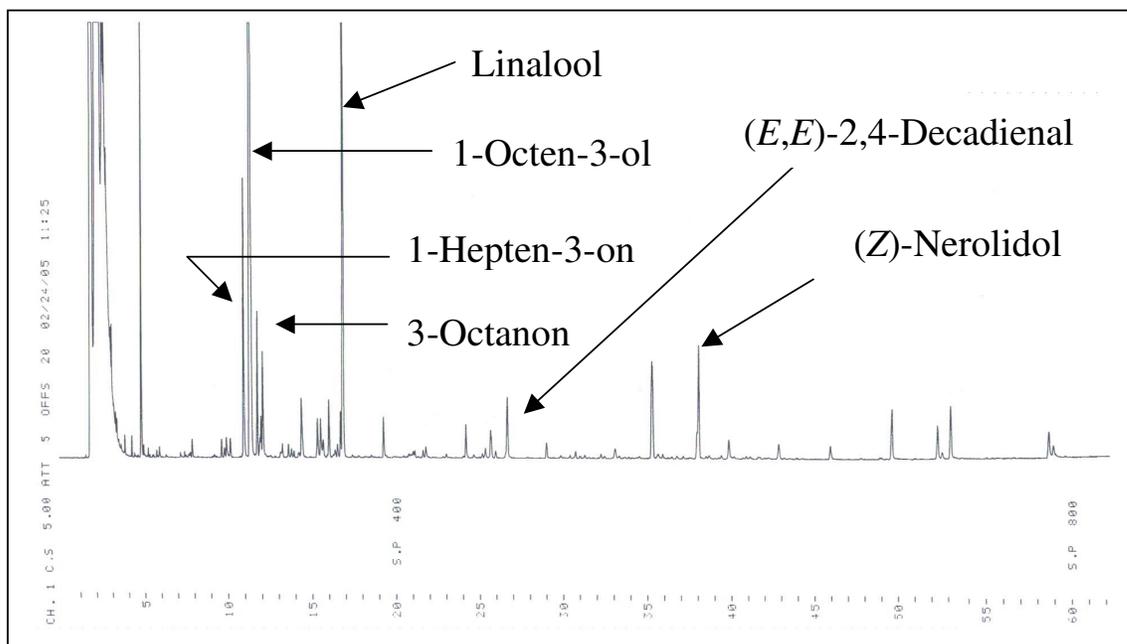


Abb. 4-20 GC-FID-Chromatogramm des ätherischen Öls von *Spongiporus leucomallellus*

Tabelle 4-3 Flüchtige Substanzen und deren prozentuale Anteile aus *S. leucomallellus*

\* Kováts-Index

\*\* Relativer prozentualer Anteil der flüchtigen Substanzen basierend auf GC-FID; mit + markierte Substanzen sind in einer Menge kleiner als 0.1% enthalten

| Peak No. | Substanz                      | GC-MS |                | GC-FID         |      |
|----------|-------------------------------|-------|----------------|----------------|------|
|          |                               | KI*   | M <sup>+</sup> | R <sub>t</sub> | %**  |
| 1        | (E)-2-Heptenal                | 942   | 112            |                | +    |
| 2        | α-Pinen                       | 936   | 136            |                | +    |
| 3        | Camphen                       | 950   | 136            |                | +    |
| 4        | 1-Hepten-3-on                 | 956   | 112            | 10.88          | 5.1  |
| 5        | R-(-)-1-Octen-3-ol            | 962   | 128            | 11.31          | 37.5 |
|          | S-(+)-1-Octen-3-ol            |       |                |                | 2.9  |
| 6        | 3-Octanon                     | 969   | 128            | 11.71          | 2.3  |
| 7        | 2-Pentylfuran                 | 981   | 138            | 12.02          | 2.4  |
| 8        | Phenylacetaldehyd             | 1012  | 120            |                | +    |
| 9        | Limonen                       | 1025  | 136            |                | +    |
| 10       | (E)-β-Ocimen                  | 1029  | 136            |                | +    |
| 11       | (E)-2-Octenal                 | 1034  | 126            | 14.32          | 1.6  |
| 12       | 1-Nonen-3-ol                  | 1058  | 142            | 15.29          | 0.9  |
| 13       | cis-Linalooloxid (furanoid)   | 1072  | 170            |                | +    |
| 14       | n-Nonanal                     | 1076  | 142            | 16.66          | 0.8  |
| 15       | R-(-)-Linalool                | 1086  | 154            | 16.83          | 15.8 |
|          | S-(+)-Linalool                |       |                |                | 1.5  |
| 16       | (E)-2-Nonenal                 | 1139  | 154            | 19.24          | 0.9  |
| 17       | n-Octansäure                  | 1156  | 144            |                | +    |
| 18       | 2-Decanon                     | 1176  | 156            |                | +    |
| 19       | α-Terpineol                   | 1176  | 154            |                | +    |
| 20       | n-Decanal                     | 1180  | 156            | 21.61          | 0.2  |
| 21       | (E,E)-2,4-Nonadienal          | 1188  | 138            | 21.77          | 0.3  |
| 22       | (E)-2-Decenal                 | 1240  | 154            | 24.17          | 0.7  |
| 23       | 2,4-Decadienal                | 1270  | 152            | 25.66          | 0.7  |
| 24       | 2-Undecanon                   | 1273  | 152            | 25.93          | 0.2  |
| 25       | (E,E)-2,4-Decadienal          | 1291  | 152            | 26.63          | 1.7  |
| 26       | α-Copaen                      | 1379  | 204            |                | +    |
| 27       | Sandvicen                     | 1399  | 204            |                | +    |
| 28       | Geranylaceton                 | 1430  | 194            |                | +    |
| 29       | Isobazzanen                   | 1442  | 204            |                | +    |
| 30       | Cyclofarnesa-5(14),8,10-trien | 1441  | 204            |                | +    |
| 31       | β-Barbaten                    | 1445  | 204            |                | +    |
| 32       | α-Muurolen                    | 1496  | 204            |                | +    |
| 33       | (Z)-Nerolidol                 | 1522  | 222            | 38.03          | 2.9  |
| 34       | T-Cadinol                     | 1633  | 222            |                | +    |
| 35       | n-Tetradecansäure             | 1748  | 198            | 45.94          | 0.6  |
| 36       | n-Pentadecansäure             | 1823  | 242            | 49.63          | 1.6  |
| 37       | n-Hexadecansäure              | 1951  | 256            | 53.13          | 1.8  |
| 38       | Linolsäure                    | 2095  | 280            | 58.63          | 0.9  |
| 39       | n-Tetracosan                  | 2400  | 338            |                | +    |
| 40       | Dotriacontan                  | 3200  | 450            |                | +    |

#### 4.1.2.1.1 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Linalool und 1-Octen-3-ol

Die gaschromatographische Analyse der Enantiomeren wurde mit den in Abschnitt 6.2.4.2 genannten Säulen durchgeführt. Die Analyse der Enantiomeren von Linalool wurde analog zu den Abschnitten 4.1.1.1.1 und 6.12.1.1.1 durchgeführt.

Das erhaltene angereicherte 1-Octen-3-ol mußte für die Methode nach König et al. <sup>[53]</sup> zum TFA-Derivat <sup>[54]</sup> derivatisiert werden.

Die Retentionszeiten betragen 9.7 min. respektive 10 min. Der  $\alpha$ -Wert der Trennung betrug  $\alpha=1.030$  [ $R_t R(-)/R_t S(+)$ ].

Durch Coinjektion konnten beide Enantiomere in *S. leucomallellus* zugeordnet werden.

Die Trennung der Enantiomeren von 1-Octen-3-ol (TFA-Derivat) zeigt Abbildung 4-21.

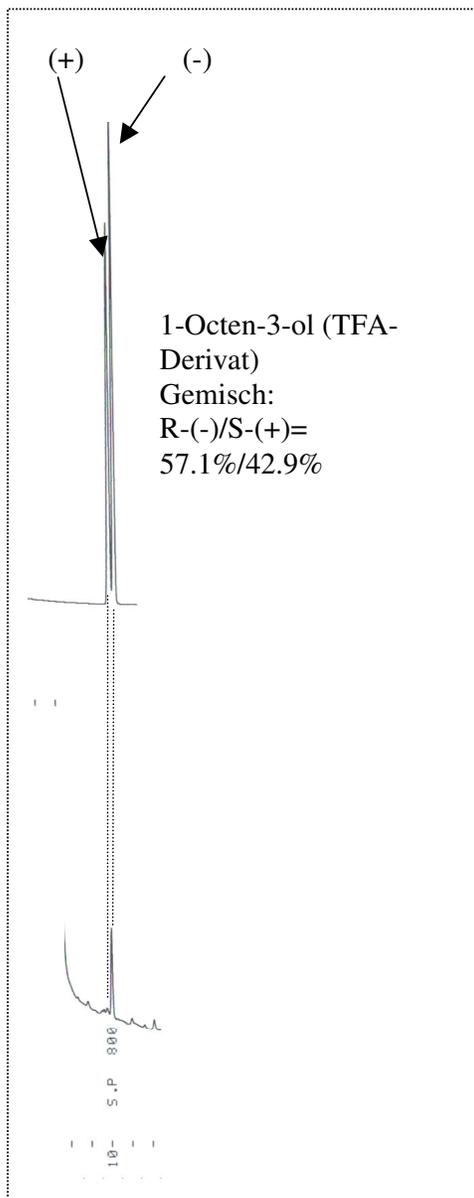


Abb. 4-21 Enantiomerentrennung von 1-Octen-3-ol (TFA-Derivat) im ätherischen Öl von *S. leucomallellus*

#### 4.1.2.2 Nichtflüchtige Inhaltsstoffe

##### 4.1.2.2.1 Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol

Aus dem Dichlormethanextrakt wurde Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol mittels semi-präparativer HPLC isoliert. Abbildung 4-22 zeigt das Chromatogramm der Isolierung. Es wurde die in Abschnitt 6.2.3 genannte RP-18-Säule verwendet. Als Elutionsmittel wurde Acetonitril/*tert*-Butylmethylether (80/20, v/v) bei einem Fluß von 1 ml/min verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektion bei einer Wellenlänge von  $\lambda=210$  nm (s. Abschnitt 6.12.2.2.1).

Da keine NMR-Daten der Substanz in Deuteriobenzol vorliegen, werden sie in Tabelle 4-4 aufgeführt.

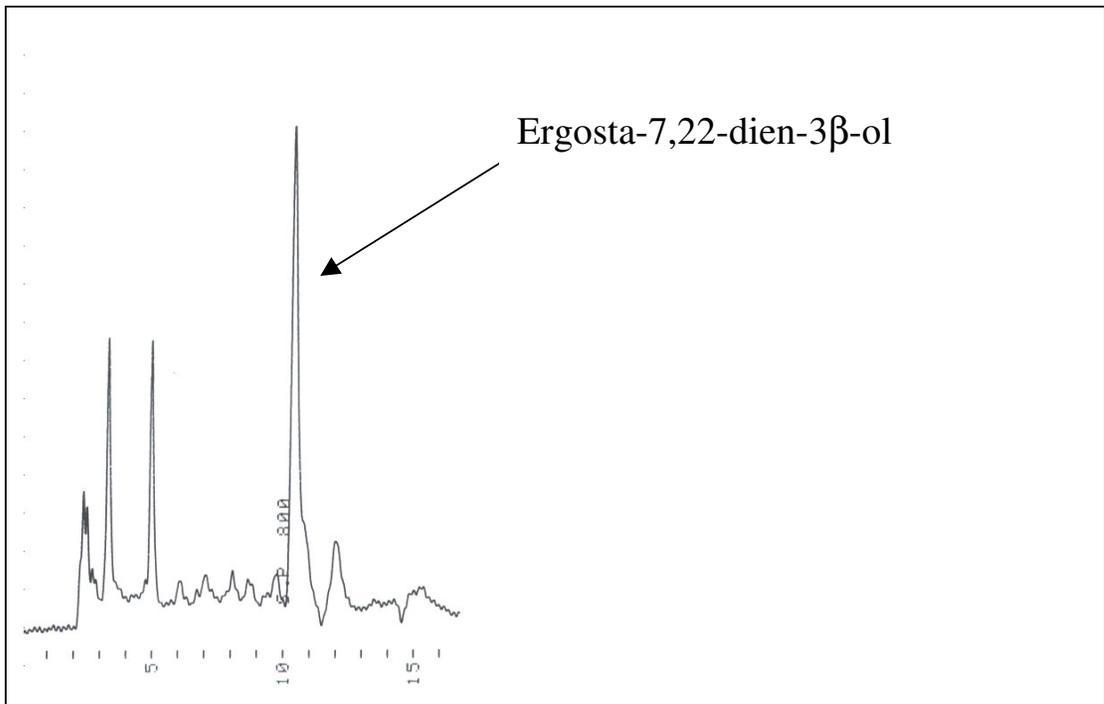


Abb. 4-22 HPLC-Trennung von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol aus *S. leucomallellus*

Das EI-MS-Spektrum zeigte als Molpeak 398  $m/z$  an. Mit einer Intensität von 36% beobachtet man ein Fragmentation bei 255  $m/z$ , was auf ein Monoensteroidringsystem deutet. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum dieser Verbindung weist 45\* Protonen auf. Im  $^{13}\text{C}$ -PENDANT-Spektrum wurden die Signale von 28 Kohlenstoffen identifiziert.

Durch Auswertung zweidimensionaler NMR-Spektren ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, HMBC) konnten alle Konnektivitäten bestimmt und diese Verbindung als Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (Abb. 4-23) identifiziert werden. Da zum Zeitpunkt der Isolierung noch keine NMR-Daten vorlagen, werden die chemischen Verschiebungen in  $\text{C}_6\text{D}_6$  in Tab. 4-4 vorgestellt. Die NMR-Daten  $\text{CDCl}_3$  wurden von Ramirez et al. [55] beschrieben. Dieses Steroid ist schon seit langem als Pilzinhaltsstoff bekannt und kommt in den meisten Pilzen vor [56].

(\* Hydroxylproton wegen Signalverbreiterung nicht sichtbar.)

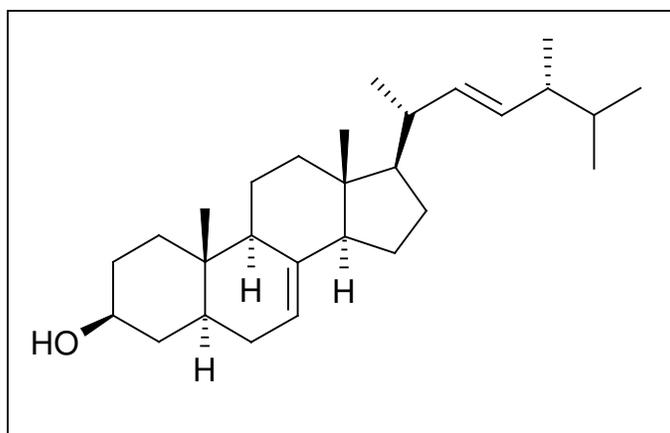


Abb. 4-23 Ergosta-7,22-dien-3β-ol

Tabelle 4-4  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol

| Atom Nr. | Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol<br>( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) |                 |                 |
|----------|---|-----------------|-----------------|
|          | $\delta^1\text{H}$  | M (J)           | $^{13}\text{C}$ |
| 1        | 1.66,<br>0.89   | <i>m</i>        | 37.5            |
| 2        | 1.30,<br>1.66   | <i>m</i>        | 31.9            |
| 3        | 3.35  | <i>m</i>        | 70.8            |
| 4        | 1.15,<br>1.55   | <i>m</i>        | 38.5            |
| 5        | 1.57  | <i>m</i>        | 50.0            |
| 6        | 1.69  | <i>m</i>        | 30.1            |
| 7        | 5.24  | <i>bs</i>       | 118.0           |
| 8        | -   | -               | 139.5           |
| 9        | 1.23  | <i>m</i>        | 40,5            |
| 10       | -   | -               | 34.4            |
| 11       | 1.43  | <i>m</i>        | 21.8            |
| 12       | 1.98,<br>1.18   | <i>m</i>        | 39.9            |
| 13       | -   | -               | 43.6            |
| 14       | 1.82  | -               | 55.6            |
| 15       | 1.49  | <i>m</i>        | 21.9            |
| 16       | 1.59  | <i>m</i>        | 23.3            |
| 17       | 1.23  | <i>m</i>        | 56.3            |
| 18       | 0.60  | <i>s</i>        | 12.2            |
| 19       | 0.75  | <i>s</i>        | 13.2            |
| 20       | 2.06  | <i>m</i>        | 40.6            |
| 21       | 1.11  | <i>d</i> (6.46) | 21.4            |
| 22       | 5.26  | <i>m</i>        | 136.3           |
| 23       | 5.27  | <i>m</i>        | 132.1           |
| 24       | 1.89  | <i>m</i>        | 43.4            |
| 25       | 1.49  | <i>m</i>        | 33.4            |
| 26       | 0.90-<br>0.94   | <i>d</i> (6.82) | 19.6-<br>20.6   |
| 27       | 0.90-<br>0.94   | <i>d</i> (6.82) | 19.6-<br>20.6   |
| 28       | 1.01  | <i>d</i> (6.6)  | 17.9            |

#### 4.1.2.2.2 Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol

Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol wurde mittels semi-präparativer HPLC aus dem Dichlormethanextrakt von Fruchtkörpern von *S. leucomallellus* isoliert (s. Abb. 4-24). Es wurden gleiche HPLC-Bedingungen wie unter Abschnitt 4.1.2.2.1 und 6.12.2.2.1 verwendet.

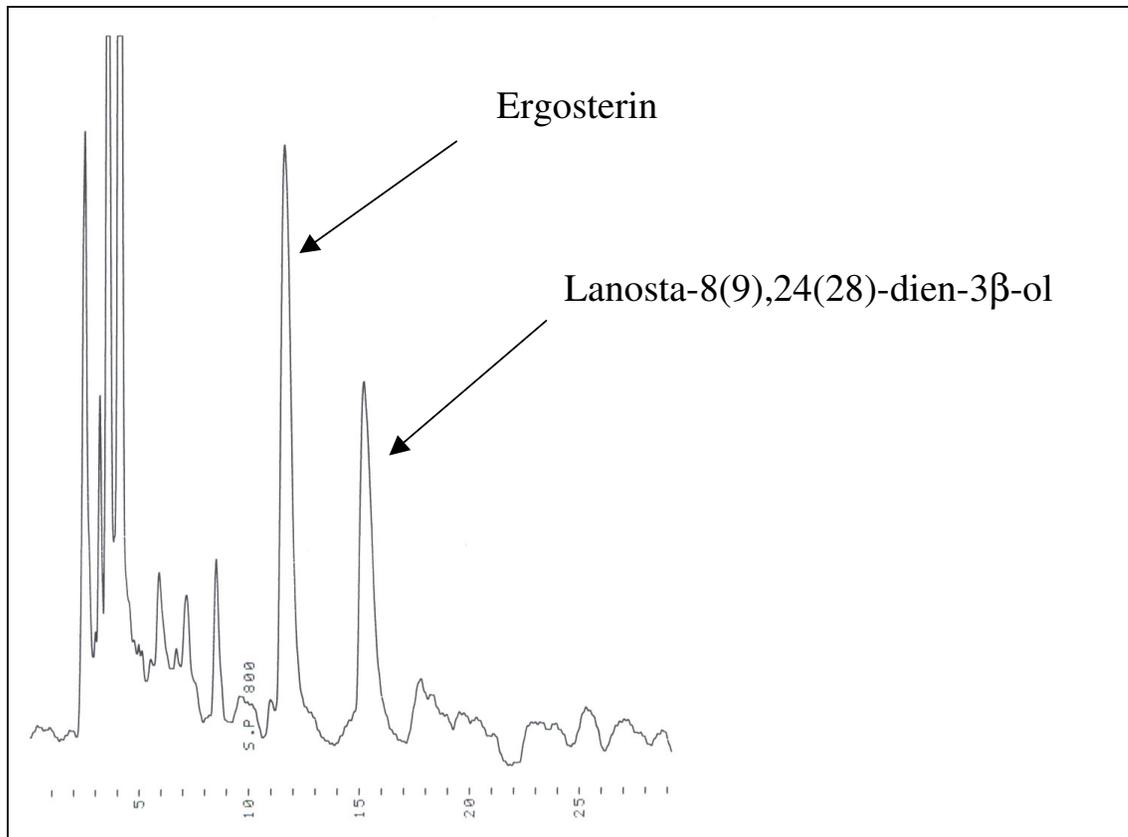


Abb. 4-24 HPLC-Trennung von Ergosterin und Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol aus *S. leucomallellus*

Im EI-Spektrum konnte man einen Molpeak von 440  $m/z$  beobachten und einen Basispeak von 425  $m/z$ , was auf den Verlust einer Methylgruppe hindeutet. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte man die Signale von 51 Protonen\* erkennen. Im  $^{13}\text{C-PENDANT}$ -Spektrum wurden die Signale von 31 Kohlenstoffen identifiziert. Mittels 2D-NMR Methoden konnten die Konnektivitäten sowie die relative Konfiguration ermittelt werden. Ein Vergleich mit den Literaturdaten des aus *Fomes officinalis* isolierten Triterpens Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol (Eburicol, Abb. 4-25) zeigte Übereinstimmung<sup>[57]</sup>.

(\* Hydroxylproton wegen Signalverbreitung nicht sichtbar.)

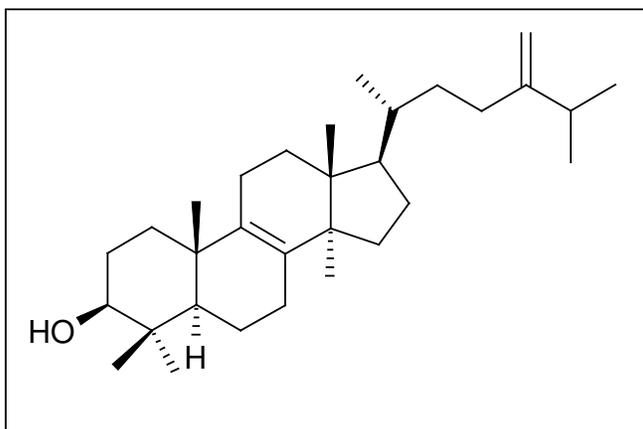


Abb. 4-25 Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol (Eburicol)

#### 4.1.2.2.3 Ergosterin

Ergosterin wurde mittels semi-präparativer HPLC isoliert (siehe Abschnitt 4.1.2.2.2 und 6.12.2.2.2). Der Molpeak der Substanz wurde bei 396  $m/z$  mit einer Intensität von ca. 69% beobachtet. Das Fragmentation 381  $m/z$  (3.7%) entsteht durch den Verlust einer Methylgruppe. Mit einer Intensität von 33% erkennt man ein Fragmentation bei 363  $m/z$  und bei 337 ( $[M-C_3H_7O]^+$ )<sup>[58]</sup>  $m/z$ . Das Fragmentation bei 253  $m/z$  (50%) deutete auf ein Diensteroidringsystem hin<sup>[44]</sup>. Das  $^1H$ -NMR-Spektrum der Verbindung zeigt die Signale von 43 Protonen\*. Das  $^{13}C$ -PENDANT-Spektrum zeigt wiederum die Signale von 28 Kohlenstoffen. Konnektivitäten und relative Konfiguration der Substanz wurden mit Hilfe von 2D-NMR Methoden bestimmt. Da das Massenspektrum eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Massenspektrum von Ergosterin zeigte, wurde das  $^1H$ -NMR-Spektrum der Standardsubstanz Ergosterin gemessen. Eine Übereinstimmung war gegeben, so dass Ergosterin (Abb. 4-26) als Inhaltsstoff von *S. leucomallellus* identifiziert werden konnte. Ergosterin ist wie auch Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol ein in Pilzen häufig vorkommendes Steroid<sup>[56]</sup>. Da keine vollständigen NMR-Daten dieser Substanz vorliegen, werden die chemischen Verschiebungen und Multiplizitäten im Lösungsmittel Deuterobenzol in Tabelle 4-5 aufgeführt.

(\* Hydroxylproton wegen Signalverbreitung nicht sichtbar.)

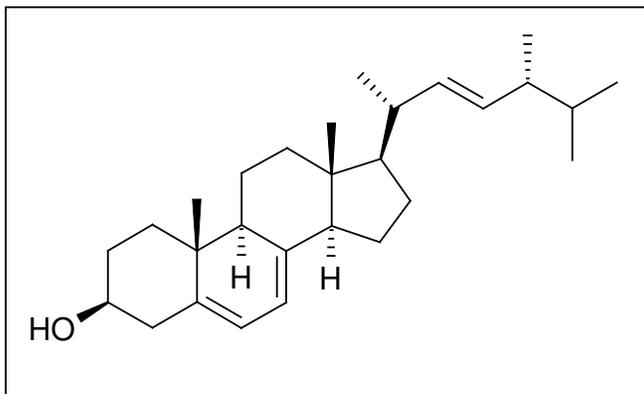


Abb. 4-26 Ergosterin

Tabelle 4-5  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Ergosterin

| Atom Nr. | Ergosterin ( $\text{CDCl}_3$ ) |                 |                 |
|----------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
|          | $\delta^1\text{H}$             | M (J)           | $^{13}\text{C}$ |
| 1        | 1.31                           | <i>m</i>        | 38.67           |
| 2        | 1.50,<br>1.88                  | <i>m</i>        | 32.04           |
| 3        | 3.63                           | <i>m</i>        | 70.85           |
| 4        | 2.28,<br>2.46                  | <i>m</i>        | 41.52           |
| 5        | -                              | -               | 140.13          |
| 6        | 5.57                           | <i>br s</i>     | 119.94          |
| 7        | 5.38                           | <i>br s</i>     | 141.76          |
| 8        | -                              | -               | 141.76          |
| 9        | 1.97                           | -               | 46.72           |
| 10       | -                              | -               | 37.50           |
| 11       | 1.60,<br>1.72                  | <i>m</i>        | 21.60           |
| 12       | 1.27                           | <i>m</i>        | 39.34           |
| 13       | -                              | -               | 43.23           |
| 14       | 1.89                           | <i>m</i>        | 55.19           |
| 15       | 1.38,<br>1.65                  | <i>m</i>        | 23.40           |
| 16       | 1.30,<br>1.76                  | <i>m</i>        | 28.89           |
| 17       | 1.26                           | <i>m</i>        | 56.21           |
| 18       | 0.63                           | <i>s</i>        | 12.46           |
| 19       | 0.94                           | <i>s</i>        | 16.64           |
| 20       | 2.03                           | <i>m</i>        | 41.09           |
| 21       | 1.03                           | <i>d</i> (6.68) | 21.47           |
| 22       | 5.18                           | <i>m</i>        | 135.71          |
| 23       | 5.21                           | <i>m</i>        | 132.43          |
| 24       | 1.85                           | <i>m</i>        | 43.47           |
| 25       | 1.46                           | <i>m</i>        | 33.77           |
| 26       | 0.79-<br>0.85                  | <i>d</i> (6.98) | 20.15           |
| 27       | 0.79-<br>0.85                  | <i>d</i> (6.98) | 20.37           |
| 28       | 0.91                           | <i>d</i> (6.84) | 18.04           |

#### 4.1.2.2.4 Ergosterolperoxid

Ergosterolperoxid, ebenfalls aus dem Dichlormethanextrakt isoliert (s. Abbildung 4-27; HPLC-Bedingungen siehe Abschnitt 4.1.2.2.2 und 6.12.2.2.2), zeigt einen Molpeak im EI-MS bei 428  $m/z$ .

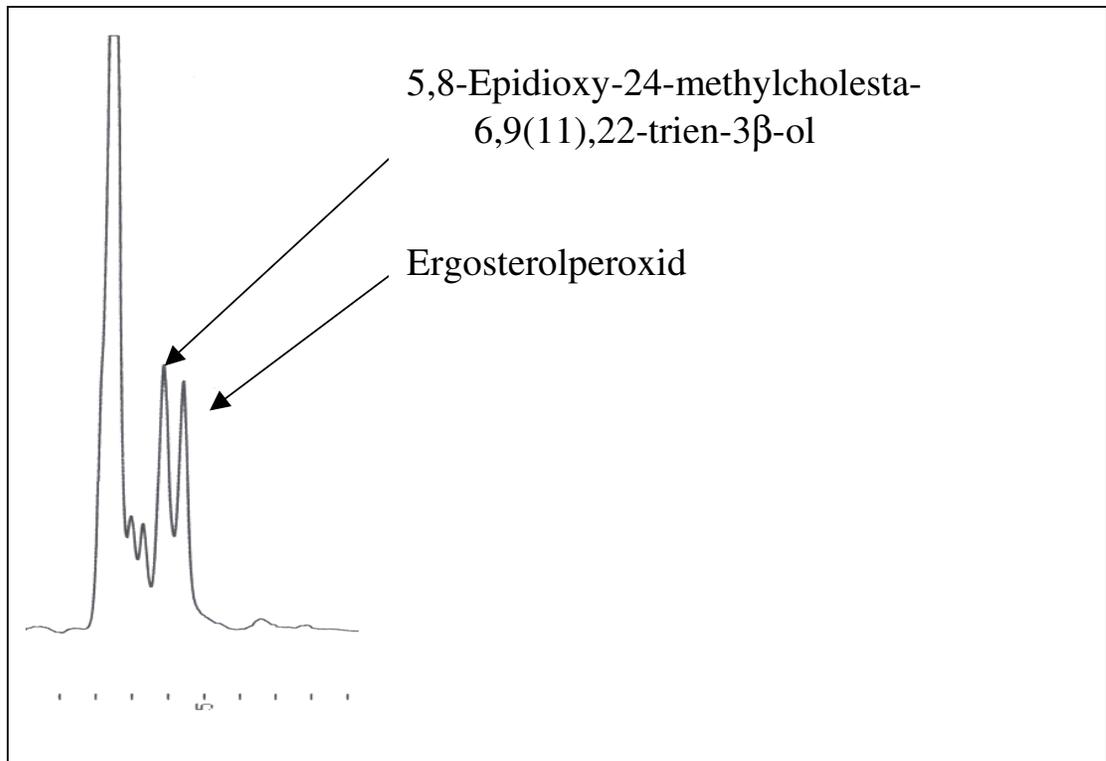


Abb. 4-27 HPLC-Trennung von Ergosterolperoxid und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol aus *S. leucomallellus*

Das Fragmentation mit 410  $m/z$  wird durch Verlust von Wasser gebildet ( $[M-H_2O]^+$ ). Basispeak ist hier 396  $m/z$ , was eine Differenz zum Molpeak von 32  $m/z$  darstellt (siehe unten). Ansonsten zeigt es große Ähnlichkeit mit dem Massenspektrum von Ergosterin. Im  $^1H$ -NMR-Spektrum erkennt man die Signale von 43 Protonen\*. Im  $^{13}C$ -PENDANT-Spektrum erkennt man die Signale von 28 Kohlenstoffen. Aus dem  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR- und den EI-MS-Spektrum kommt man auf eine Summenformel von  $C_{27}H_{42}O_3$ . Es handelt sich um eine Substanz mit 7 Doppelbindungsäquivalenten. Da die Substanz zwei Doppelbindungen besitzt, müssen fünf Ringe vorliegen. Anhand der vorliegenden Daten aller Spektren konnte die Substanz als Ergosterolperoxid (Abb. 4-28) identifiziert werden. Ein Vergleich mit Literaturdaten zeigte Übereinstimmung<sup>[59]</sup>. Die große Ähnlichkeit der EI-MS-Spektren von Ergosterolperoxid und Ergosterin beruht auf der Abspaltung von  $O_2$  ( $[M-O_2]^+$ : 396  $m/z$ ) mit gleichzeitiger Rückbildung des Diensystems.

(\* Hydroxylproton wegen Signalverbreiterung nicht sichtbar.)

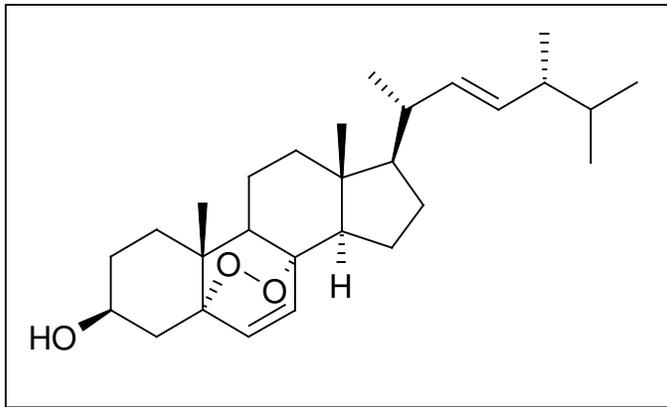


Abb 4-28 Ergosterolperoxid

#### 4.1.2.2.5 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol

Auch 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol konnte mittels semi-präparativer HPLC aus dem Dichlormethanextrakt isoliert werden (s. Abschnitt 4.1.2.2.4; HPLC-Bedingungen siehe Abschnitt 4.1.2.2.2 und 6.12.2.2.2). Das Massenspektrum der Substanz weist einen Molpeak bei 426  $m/z$  auf. Das nächste Fragmentation und gleichzeitig Basispeak ist 394  $m/z$ , was eine Differenz zum Molpeak von 32  $m/z$  bedeutet. Der hochaufgelöste Molpeak (426.3145  $m/z$ ; berechneter Wert: 426.3133  $m/z$ ) ergab die Summenformel  $C_{28}H_{42}O_3$ , eine Substanz mit 8 Doppelbindungsäquivalenten. Im  $^1H$ -NMR-Spektrum erkennt man 41 Protonen\*. Im  $^{13}C$ -PENDANT-Spektrum kann man hingegen 28 Kohlenstoffe erkennen. Mit Hilfe der 2D-NMR-Spektren konnten die Konnektivitäten bestimmt werden. Die Verbindung konnte als 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (Abb. 4-29) identifiziert werden. Von der Substanz liegen keine vollständigen NMR-Daten vor<sup>[50]</sup>. In Tab. 4-6 werden die chemischen Verschiebungen und Multiplizitäten vorgestellt. Es handelt sich hier um ein relativ stabiles Peroxid. Die Tatsache, dass man selbst im EI-MS einen Molpeak beobachten kann verdeutlicht das.

Interessant bei Naturstoffen mit einer Peroxidgruppe ist die damit verbundene biologische Aktivität. Artemisinin ist eine biologisch aktive Substanz mit einer Peroxidgruppe, die gegen Malaria eingesetzt wird<sup>[60]</sup>. Auch die hier isolierte Substanz zeigte bereits schwache Aktivität gegen Krankheiten wie Lungen-, Eierstock-, Haut- und Dickdarmkrebs<sup>[61]</sup>.

Es gibt bis heute keine Daten über antimikrobielle Eigenschaften oder anticancerogene Eigenschaften gegen Cervix-Karzinom und Leukämie. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen diese Eigenschaften betreffend durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 4.2 ausführlich vorgestellt.

(\* Hydroxylproton wegen Signalverbreitung nicht sichtbar.)

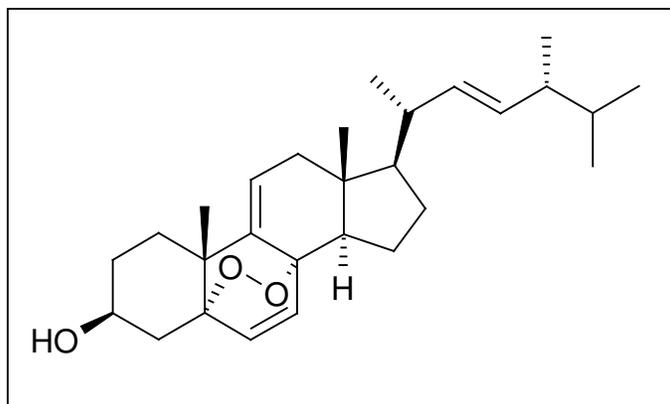


Abb. 4-29 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3β-ol

Tabelle 4-6  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol

| Atom Nr. | 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (CDCl <sub>3</sub> ) |                 |                 |
|----------|--|-----------------|-----------------|
|          | $\delta^1\text{H}$   | M (J)           | $^{13}\text{C}$ |
| 1        | 1.54   | <i>m</i>        | 33.29           |
| 2        | 1.71   | <i>m</i>        | 31.38           |
| 3        | 3.93   | <i>m</i>        | 66.26           |
| 4        | 1.72, 2.02   | <i>m</i>        | 36.81           |
| 5        | -  | -               | 82.40           |
| 6        | 6.0  | <i>d</i> (8.27) | 135.87          |
| 7        | 6.39   | <i>d</i> (8.67) | 130.68          |
| 8        | -  | -               | 78.11           |
| 9        | -  | -               | 144.21          |
| 10       | -  | -               | 38.52           |
| 11       | 5.23   | <i>m</i>        | 119.05          |
| 12       | 1.89, 2.03   | <i>m</i>        | 41.73           |
| 13       | -  | -               | 44.71           |
| 14       | 1.94   | <i>m</i>        | 48.84           |
| 15       | 1.46, 1.72   | <i>m</i>        | 21.42           |
| 16       | 1.24, 1.63   | <i>m</i>        | 29.13           |
| 17       | 1.08   | <i>m</i>        | 56.08           |
| 18       | 0.61   | <i>s</i>        | 13.19           |
| 19       | 0.94   | <i>s</i>        | 25.60           |
| 20       | 1.94   | <i>m</i>        | 40.44           |
| 21       | 0.95   | <i>d</i> (6.63) | 21.07           |
| 22       | 5.10   | <i>m</i>        | 135.92          |
| 23       | 5.22   | <i>m</i>        | 132.43          |
| 24       | 1.87   | <i>m</i>        | 43.59           |
| 25       | 1.47   | <i>m</i>        | 33.67           |
| 26       | 0.88-0.92  | <i>d</i> (6.85) | 20.06           |
| 27       | 0.88-0.92  | <i>d</i> (6.85) | 20.52           |
| 28       | 0.98   | <i>d</i> (7.07) | 18.09           |

#### 4.1.2.2.6 Eburiconsäure

Eburiconsäure wurde ebenfalls mittels semi-präparativer HPLC aus dem Dichlormethanextrakt isoliert. Die in Abschnitt 6.2.3 genannte Kieselgelsäule wurde verwendet, sowie Dichlormethan/Methanol (90/10, v/v) als Eluenten (Abb. 4-30). UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda=254$  nm im UV-Detektor verwendet. Der Fluß betrug 1 ml/min (s. auch Abschnitt 6.12.2.2.4).

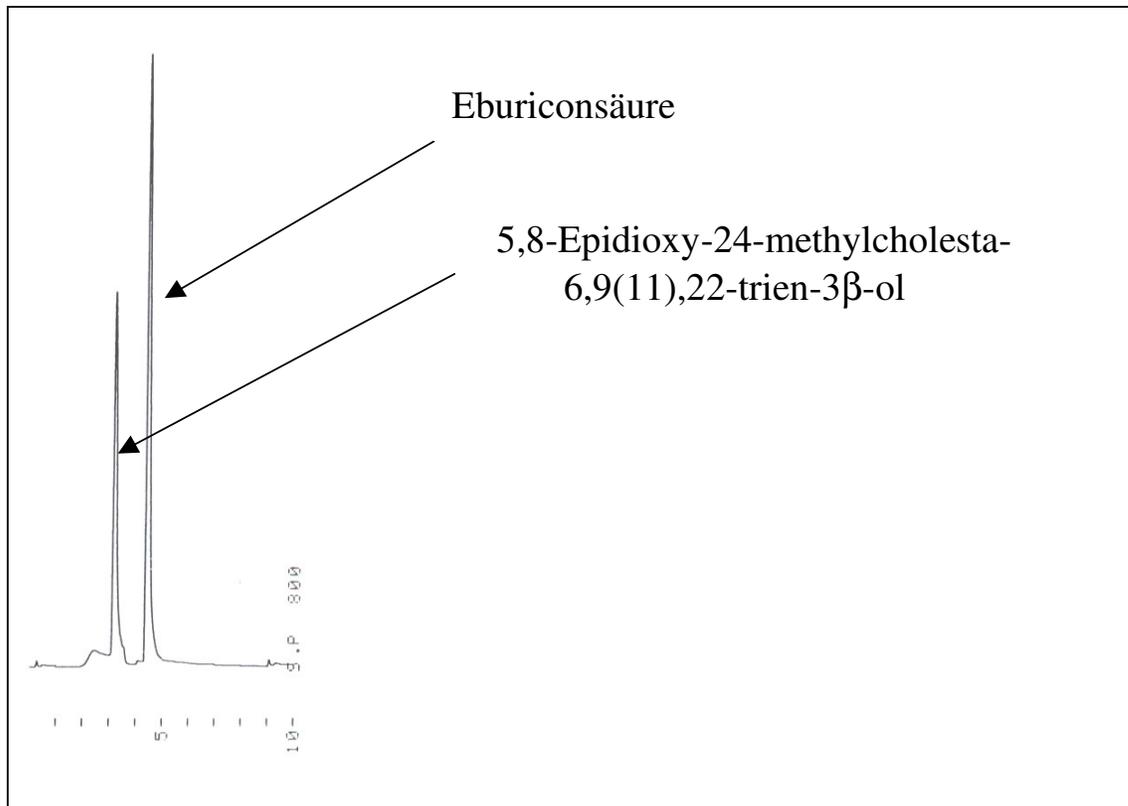


Abb. 4-30 HPLC-Trennung von Eburiconsäure aus *S. leucomallellus*

Das EI-MS-Spektrum zeigt einen Molpeak bei 470  $m/z$ . Das beobachtete Fragmentation bei 455  $m/z$  ist das Resultat des Verlustes einer Methylgruppe. Das Fragmentation 437  $m/z$  (Basispeak) entsteht durch den Verlust einer Methylgruppe mit anschließendem Verlust von Wasser ( $M-CH_3-H_2O^+$ ). Anhand der vorliegenden Daten aller Spektren konnte die Substanz als Eburiconsäure (Abb. 4-31) identifiziert werden. Ein Vergleich mit Literaturdaten konnte dies bestätigen<sup>[62]</sup>.

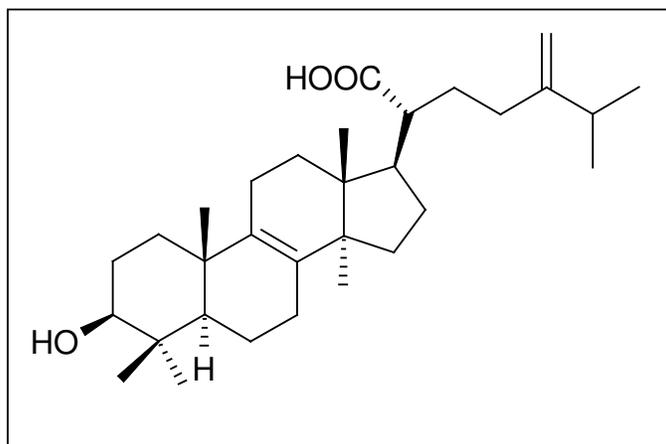


Abb. 4-31 Eburiconsäure

#### 4.1.2.2.7 Spongiporensäure A

Spongiporensäure A wurde mittels semi-präparativer HPLC isoliert. Verwendet wurde eine RP-18-Säule (Abschnitt 6.2.3) und als Eluent Methanol/Wasser (80/20, v/v) bei einem Fluss von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei  $\lambda=254$  nm (s. auch Abschnitt 6.12.2.2.5). Abbildung 4-32 zeigt die HPLC-Trennung der beiden Substanzen, die kleineren Peaks bei 5.4 und 6.3 min. repräsentieren Substanzen, die nicht in ausreichenden Mengen isoliert werden konnten.

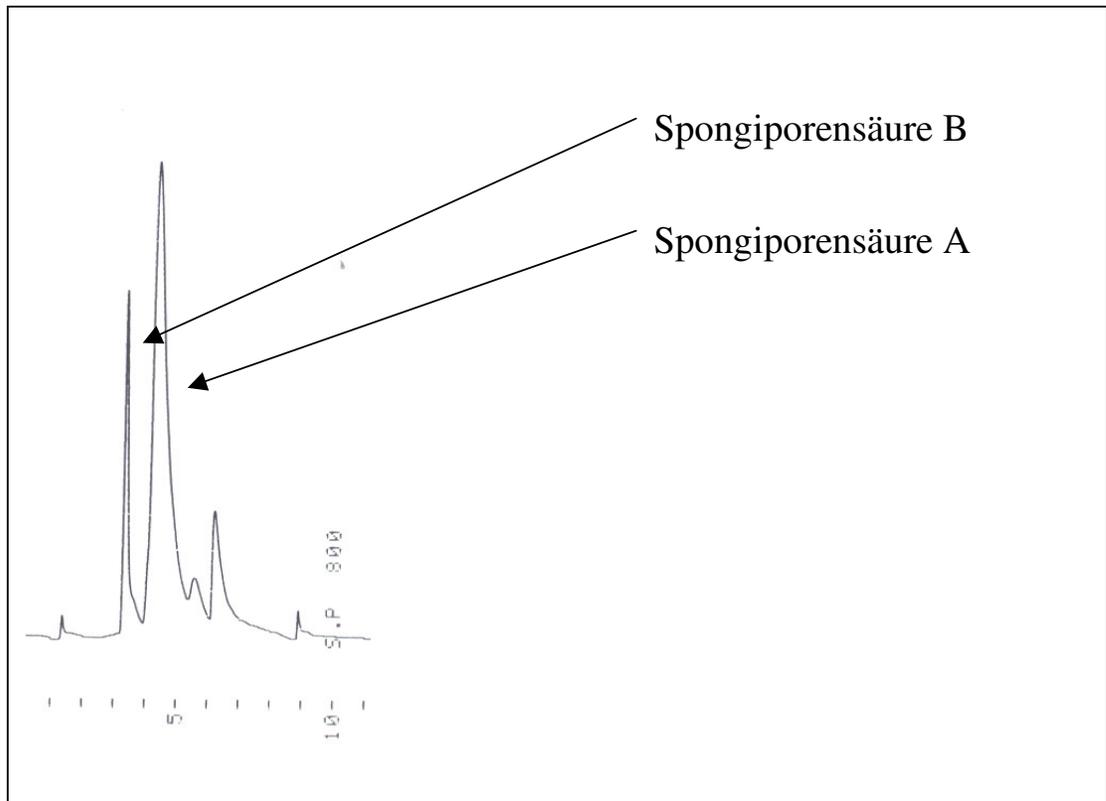


Abb. 4-32 HPLC-Trennung von Spongiporensäure A und B aus *S. leucomallellus*

Eine positive optische Drehung der Substanz konnte bestimmt werden ( $[\alpha]_{20}^{589} = (+) 59$  ( $c=0.18$  Methanol)). Der Schmelzpunkt betrug  $182$  °C. Im EI-Massenspektrum liegt der Molpeak bei  $496$   $m/z$  (10%) gefolgt vom Fragmentation  $478$   $m/z$  (19%). Diese Differenz beträgt  $18$   $m/z$ , was bei der vorliegenden Fragmentierung auf einen Wasserverlust hindeutet. Wasserabspaltung wurde schon oft bei Carbonsäuren mit einer Doppelbindung in  $\beta$ - $\gamma$ -Position beobachtet<sup>[63-65]</sup>. Weitere wichtige Fragmente sind  $423$   $m/z$  (40%)  $[M-C_3H_5O_2]^+$ ,  $327$   $m/z$  (8%)  $[M-C_9H_{13}O_3]^+$  und  $169$   $m/z$   $[M-C_{22}H_{31}O_2]^+$ . Der abgespaltene Rest  $C_3H_5O_2$  könnte einen aliphatischen Rest mit einer Carboxygruppe darstellen. Beim Fragmentation  $169$   $m/z$  scheint es sich um die Seitenkette der Substanz zu handeln.  $C_9H_{13}O_3$  könnte die oben genannte Stelle im Molekül sein, die eine Doppelbindung in  $\beta$ - $\gamma$ -Position besitzt. Solche Seitenketten sind aus Triterpenoiden aus Baumpilzen bereits bekannt. Zu nennen wären die Seitenketten aus den Substanzen Quercinsäure B und  $3\alpha$ -Carboxyacetoxy-24-methylen-23-oxolanost-8-en-26-carbonsäure<sup>[48]</sup> (Abb. 4-33). Diese Seitenkette würde mit dem Fragmentation übereinstimmen.

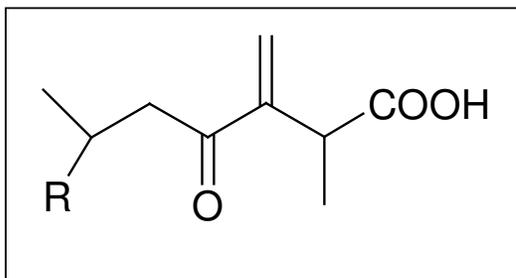


Abb. 4-33 Mögliche Seitenkette der Substanz

Im ESI-MS-Spektrum konnte man ein Peak bei 519  $m/z$  ( $[M+Na^+]$ ) erkennen. Der  $m/z$ -Wert des hochaufgelösten Na-Addukt-Ions (519.3102  $m/z$ ; Berechneter Wert: 519.3086  $m/z$ ) führte zu einer Summenformel von  $C_{31}H_{44}O_5$  und 10 Doppelbindungsäquivalenten.

Ein ATR-IR-Spektrum der Substanz wurde aufgenommen. Es konnten charakteristische IR-Banden erkannt werden. Bei einer Wellenzahl von 1706  $cm^{-1}$  befindet sich die Carbonylbande. Charakteristisch für Doppelbindungen ist die Bande bei 1667  $cm^{-1}$ . Im  $^1H$ -NMR-Spektrum konnte man 6 Methylgruppen (4  $\times$  s, 2  $\times$  d), 2 olefinische Methylengruppen ( $\delta$  4.82, 4.77, 6.37, 6.02) und 2 olefinische Methinprotonen ( $\delta$  5.34, 5.24) erkennen. Im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum konnte man einen Ketokohlenstoff bei 202.3 ppm, 2 Carboxykohlenstoffe bei 177.5 ppm und 177.4 ppm, 8 olefinische Kohlenstoffe, wobei es sich um zwei Methin- (113.0, 118.8 ppm), zwei Methylen- (121.1, 125.2 ppm) und vier quartäre Kohlenstoffe (138.4, 142.7, 150.1, 151.0 ppm) handelt, erkennen.

Bei sieben Doppelbindungen müssen die restlichen 3 Doppelbindungsäquivalente Ringen zugeordnet werden. Bei Auswertung der im HMBC-Spektrum sichtbaren Fernkopplungen erkennt man nur eine Kopplung zwischen den Protonen einer Singulett-Methylgruppe mit einem Methinkohlenstoff (Abb. 4-34), was typisch für ein Lanostan-Triterpen ist. Bei den Protonen handelt es sich um die Methylgruppe am C-19 und die Methingruppe am C-5. Diese Methylgruppe koppelt auch mit einem quartären olefinischen Kohlenstoff und einem Methylenkohlenstoff, dessen Protonen wiederum mit einem Carboxylkohlenstoff koppeln. Benachbart zu dieser Methylengruppe ist ebenfalls eine Methylengruppe. Eine starke Kopplung wird im  $^1H$ - $^1H$ -COSY beobachtet. Das Methinproton koppelt im HMBC-Spektrum mit einem olefinischen Methylenkohlenstoff, einem Methylenkohlenstoff und einem olefinischen Methinkohlenstoff. Es handelt sich hier also um einen 3,4-*seco*-Ring.

Im TOCSY-Spektrum erkennt man die Zugehörigkeit des Methinprotons zu einem Spinsystem, dem eine Methylengruppe (C-6) und das zuvor genannte olefinische Proton angehören (C-7). Das  $^1H$ - $^1H$ -COSY zeigt deutlich die Kopplung des Methinprotons mit der Methylengruppe. Das olefinische Methinproton zeigt eine Fernkopplung mit dem quartären olefinischen Kohlenstoff, der mit der Singulett-Methylgruppe koppelte (C-9) (Abb. 4-34).

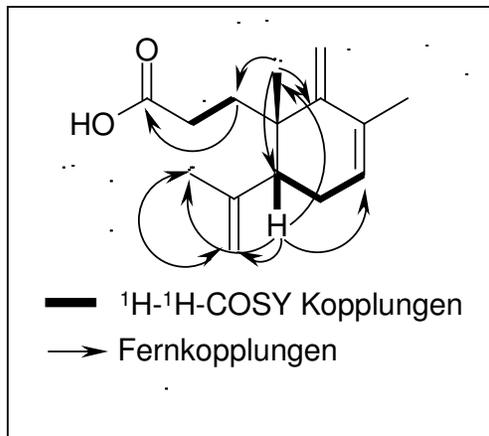


Abb. 4-34 Wichtige  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und Fernkopplungen des *seco*-Ring-A und des B-Rings

Das zugehörige Methinproton (C-11) koppelt ebenfalls mit dem quartären olefinischen Kohlenstoff der zuvor genannten Methingruppe (C-7) und mit 2 quartären Kohlenstoffen (C-10, C-13). Das Spektrum des C-D-Ringsystems entspricht dem des typischen Lanostan-Ringsystems mit Fernkopplungen der Singulett-Methylgruppe am C-18 mit dem quartären Kohlenstoff C-14, dem Methylenkohlenstoff C-12 und dem Methinkohlenstoff C17. Die Singulett-Methylgruppe am C-28 koppelt mit dem quartären Kohlenstoff C-13, dem olefinischen quartären Kohlenstoff C-8 und dem Methylen Kohlenstoff (Abb. 4-35).

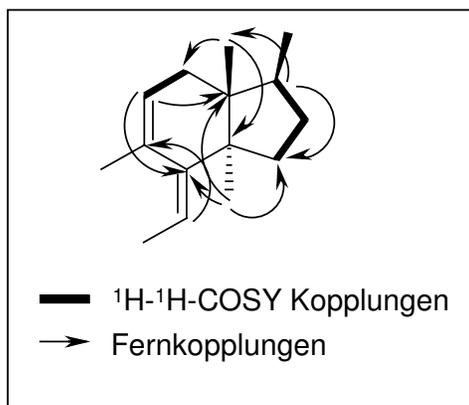


Abb. 4-35 Wichtige  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und Fernkopplungen des C-D-Ringsystems

Das  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und das TOCSY-Spektrum zeigt, dass das Methinproton am C-17 Teil eines Spinsystems zusammen mit den Methylenprotonen an C-16 und C-15 im Ringsystem einerseits und mit dem Methinproton am C-20 und den Methylenprotonen am C-22 andererseits ist. Abbildung 4-36 zeigt die wichtigsten  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und Fernkopplungen in der Seitenkette.

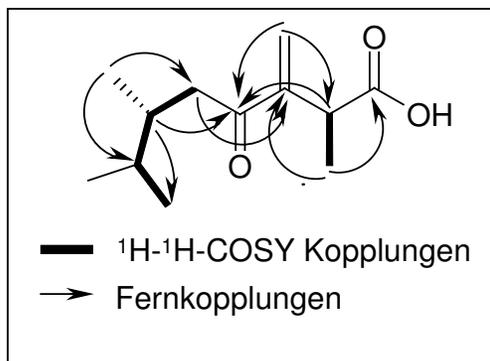


Abb. 4-36 Wichtige  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und Fernkopplungen der Seitenkette

Man erkennt Fernkopplungen der Methylprotonen am C-21 mit den C-17 und C-22 Kohlenstoffen. Das Methinproton am C-20 zeigt eine Fernkopplung mit einem Ketokohlenstoff. Weitere Kopplungen mit diesem Kohlenstoff zeigen olefinische Methylenprotonen (am C-31) und einem weiteren Methinproton (am C-25). Das Ende der Seitenkette wird von der Fernkopplung der C-27 Methylprotonen mit dem Carboxykohlenstoff C-26 angezeigt. Im NOESY-Spektrum erkennt man anhand der Kopplungen die relative Konfiguration des Moleküls. Diese entspricht weitgehend der des Lanostan-Ringsystems. Das Signal des Methinprotons am C-5 weicht ein wenig von der üblichen Konfiguration ab (Abb. 4-37). Es gibt eine schwache Kopplung mit der C-19-Methylgruppe. Bei einer trans-Konfiguration könnte eine solche Kopplung nicht beobachtet werden. Das Methinproton muss annähernd cis-Konfiguration besitzen.

NMR-Kopplungen und NMR-Daten sind in Tab. 4-7 und 4-8 und 4-9 aufgelistet.

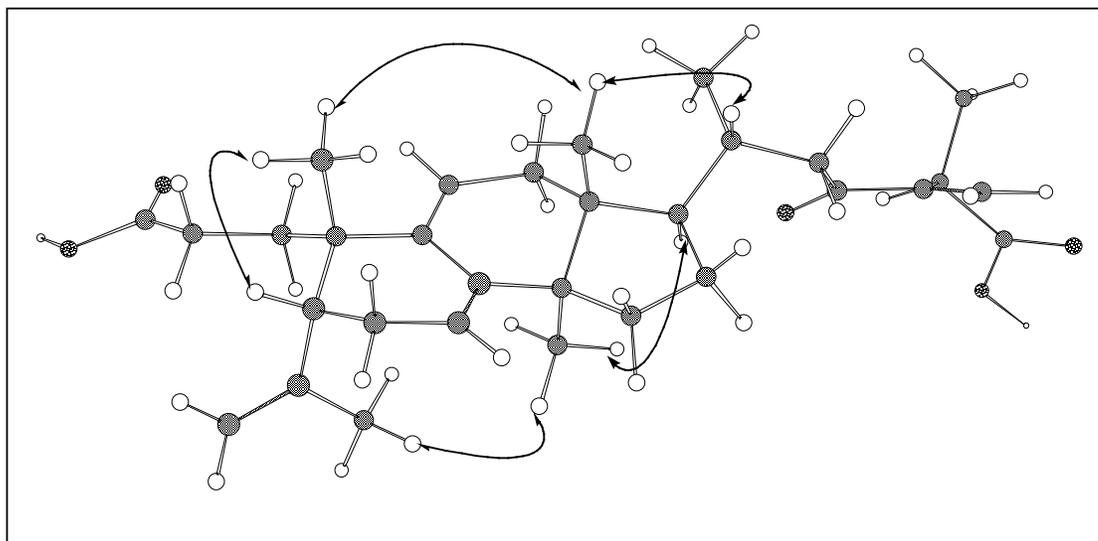


Abb. 4-37 Wichtige NOE-Wechselwirkungen in Spongiporensäure A (Molekül-Modell: MOPAC, AM1 (CS Chem3D Pro® Version 5.0; 1999))

Es handelt sich hier um eine neue Substanz: (+)-23-Oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraen-3,26-dicarbonsäure (Abb. 4-38). Der Name Spongiporensäure A wird vorgeschlagen.

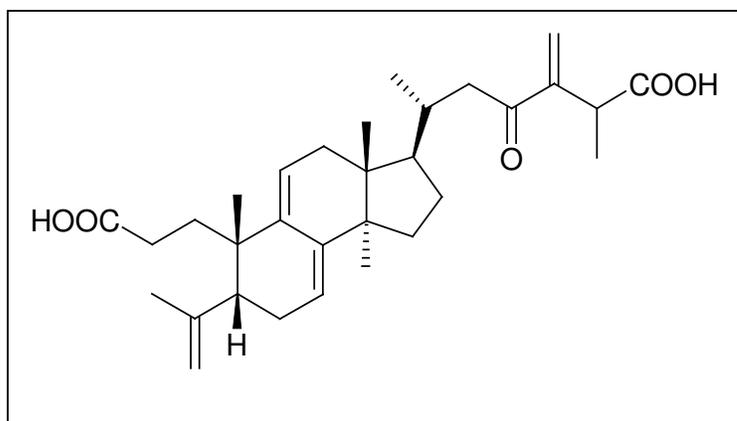


Abb. 4-38 Spongiporensäure A

Tabelle 4-7 Wichtige  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und HMBC-Kopplungen von Spongiporensäure A

| Wichtige Kopplungen               |                             |                    |                                  |
|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------------------|
| $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY |                             | HMBC               |                                  |
| Proton(en)                        | Kopplung mit:<br>Proton(en) | Proton(en)         | Kopplung mit:<br>Kohlenstoff(en) |
| H <sub>3</sub> -27                | H <sub>1</sub> -25          | H <sub>1</sub> -5  | C-29,C-30,C-19,C-7,              |
| H <sub>3</sub> -21                | H <sub>1</sub> -20          | H <sub>3</sub> -19 | C-1,C-9                          |
| H <sub>1</sub> -20                | H <sub>1</sub> -17          | H <sub>2</sub> -1  | C-3                              |
| H <sub>2</sub> -16                | H <sub>2</sub> -15          | H <sub>1</sub> -7  | C-14,C-9                         |
| H <sub>1</sub> -11                | H <sub>2</sub> -12          | H <sub>1</sub> -11 | C-13,C-8                         |
| H <sub>1</sub> -7                 | H <sub>2</sub> -6           | H <sub>3</sub> -18 | C-17,C-14                        |
| H <sub>2</sub> -1                 | H <sub>2</sub> -2           | H <sub>3</sub> -28 | C-15,C-8,C-13                    |
|                                   |                             | H <sub>1</sub> -17 | C-15,C21,C-22                    |
|                                   |                             | H <sub>2</sub> -22 | C-24                             |
|                                   |                             | H <sub>2</sub> -31 | C-23,C-25                        |
|                                   |                             | H <sub>3</sub> -27 | C-26,C-24                        |

Tabelle 4-8 Wichtige TOCSY-Kopplungen von Spongiporensäure A

| Wichtige Kopplungen |  |
|---------------------|--|
| TOCSY               |  |
| Proton(en)          | Kopplung mit: Proton(en)   |
| H <sub>3</sub> -27  | H <sub>1</sub> -25   |
| H <sub>2</sub> -22  | H <sub>1</sub> -20,H <sub>3</sub> -21,H <sub>1</sub> -17,H <sub>2</sub> -16,H <sub>2</sub> -15 |
| H <sub>2</sub> -12  | H <sub>1</sub> -11   |
| H <sub>1</sub> -7   | H <sub>2</sub> -6,H <sub>1</sub> -5  |
| H <sub>2</sub> -1   | H <sub>2</sub> -2  |

Tabelle 4-9 NMR-Daten für Spongiporensäure A

| Atom Nr. | Spongiporensäure A (d <sub>5</sub> -Pyridin) |                      |                       |
|----------|--|----------------------|-----------------------|
|          | $\delta^1\text{H}$                           | M (J)                | $\delta^{13}\text{C}$ |
| 1        | 2.58, 2.50                                   | <i>m</i>             | 31.0                  |
| 2        | 1.90, 2.14                                   | <i>m</i>             | 37.2                  |
| 3        | -  | -                    | 177.5                 |
| 4        | -  | -                    | 150.1                 |
| 5        | 2.34   | <i>m</i>             | 51.5                  |
| 6        | 2.06, 2.55                                   | <i>m</i>             | 29.4                  |
| 7        | 5.24   | <i>br s</i>          | 118.8                 |
| 8        | -  | -                    | 142.7                 |
| 9        | -  | -                    | 138.4                 |
| 10       | -  | -                    | 39.5                  |
| 11       | 5.34   | <i>br s</i>          | 121.1                 |
| 12       | 2.16   | <i>m</i>             | 39.6                  |
| 13       | -  | -                    | 45.4                  |
| 14       | -  | -                    | 51.3                  |
| 15       | 1.62   | <i>m</i>             | 32.0                  |
| 16       | 2.50   | <i>m</i>             | 29.0                  |
| 17       | 1.66   | <i>m</i>             | 52.3                  |
| 18       | 0.69   | <i>s</i>             | 17.6                  |
| 19       | 1.09   | <i>s</i>             | 23.1                  |
| 20       | 2.29   | <i>m</i>             | 34.7                  |
| 21       | 1.07   | <i>d</i> (6.4)       | 20.5                  |
| 22       | 2.74, 2.85                                   | <i>m</i>             | 45.7                  |
| 23       | -  | -                    | 202.3                 |
| 24       | -  | -                    | 151.0                 |
| 25       | 4.13   | <i>q</i> (7.3)       | 42.0                  |
| 26       | -  | -                    | 177.4                 |
| 27       | 1.56   | <i>d</i> (7.1)       | 17.6                  |
| 28       | 0.97   | <i>s</i>             | 25.1                  |
| 29       | 4.82, 4.77                                   | <i>s</i><br><i>s</i> | 113.0                 |
| 30       | 1.72   | <i>s</i>             | 23.0                  |
| 31       | 6.37, 6.02                                   | <i>s</i><br><i>s</i> | 125.2                 |

#### 4.1.2.2.8 Spongiporensäure B

Spongiporensäure B wurde aus dem Dichlormethanextrakt anfangs mittels semi-präparativer HPLC isoliert (siehe Abschnitt 4.1.2.2.7 und 6.12.2.2.5). Eine positive optische Drehung der Substanz konnte bestimmt werden. Der Schmelzpunkt betrug 218 °C ( $[\alpha]_{20}^{589} = (+) 145$  (c=0.02 methanol)). Das EI-MS-Spektrum zeigte einen Peak bei 370 *m/z* (42%). Eine Masse,

die jedoch im Kontrast zu der Summenformel von  $C_{31}H_{44}O_6$  (512  $m/z$ , 10 Doppelbindungsäquivalente) stand, zu der man aufgrund der NMR-Spektren kam. Es wurde ein ESI-MS-Spektrum aufgenommen, wobei sich der Negativ-Ion-Modus als die Ionisierungsmethode der Wahl herausstellte. Das erhaltene Spektrum zeigte einen Peak bei 511  $m/z$ . Bei dem Peak bei 511  $m/z$  handelt es sich um  $[M-H]^-$ , was für Carbonsäuren typisch in diesem Ionisierungsmodus ist. Der  $m/z$ -Wert des hochaufgelösten Ions (511.2999  $m/z$ ; Berechneter Wert: 511.3059  $m/z$ ) bestätigte die vorgeschlagene Summenformel.

Die Substanz scheint entweder zu labil oder zu schwer flüchtig für EI-MS zu sein. Im  $^1H$ -NMR-Spektrum kann man 6 Methylgruppen ( $5 \times s$ ,  $1 \times d$ ), 2 olefinische Methylengruppen ( $\delta$  4.68, 4.62, 5.96, 6.25) und 2 olefinische Methinprotonen ( $\delta$  5.32, 5.39) erkennen. Im HMBC-Spektrum konnte man einen Ketokohlenstoff bei 202.3 ppm, 2 Carboxykohlenstoffe bei 177.9 ppm und 177.7 ppm, 8 olefinische Kohlenstoffe [zwei olefinische Methin- (111.4, 117.7 ppm), zwei Methylen- (120.0, 125.5 ppm) und vier quartäre Kohlenstoffe (137.6, 142.1, 149.20, 150.3 ppm)] und einen oxygenierten Kohlenstoff bei 75.3 ppm feststellen. Da sieben Doppelbindungen erkannt wurden, muss die Substanz drei Ringe besitzen. Es handelt sich hier ebenfalls wie bei Spongiporensäure A um ein 2,4-*seco*-Lanostan Triterpen. Sämtliche Kopplungen von Spongiporensäure A können auch hier beobachtet werden. Fernkopplungen ( $^3J$ ) des C-17-Methinprotons mit der C-21-Methylgruppe und der C-22-Methylengruppe können beobachtet werden, jedoch gehören die Protonen nicht zu einem Spinsystem wie bei Spongiporensäure A. Man kann auch im  $^1H$ - $^1H$ -COSY-Spektrum keine starke Kopplung des C-17 Methinprotons mit einem benachbarten Methinproton des C-20 Kohlenstoffs beobachten. Eine starke Fernkopplung zeigt die Methylengruppe C-16 mit C-20. Die chemische Verschiebung des C-20-Kohlenstoffs liegt bei 75.3 ppm, in einem Bereich der chemischen Verschiebung von Kohlenstoffen an die ein Sauerstoff gebunden ist<sup>[66]</sup>. Es handelt sich um einen oxygenierten Kohlenstoff. Die starke Tieffeldverschiebung des Methylkohlenstoffs C-21 (26.0 ppm) deutet ebenfalls darauf hin. Aufgrund der vorhandenen NMR- und MS-Daten muss der C-20 Kohlenstoff eine Hydroxylgruppe tragen. Abbildung 4-39 veranschaulicht die  $^1H$ - $^1H$ -COSY- und Fernkopplungen im besprochenen Bereich. Die im NOESY-Spektrum von Spongiporensäure A beobachteten Kopplungen entsprechen denen dieser Verbindung. Die vorliegende Verbindung besitzt die gleiche relative Konfiguration. NMR-Kopplungen und NMR-Daten sind in Tab. 4-0 und 4-11 aufgelistet.

Es handelt sich hier um (+)-20-Hydroxy-23-oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraen-3,26 dicarbonsäure (Abb. 4-40), eine neue Substanz für die der Name Spongiporensäure B vorgeschlagen wird.

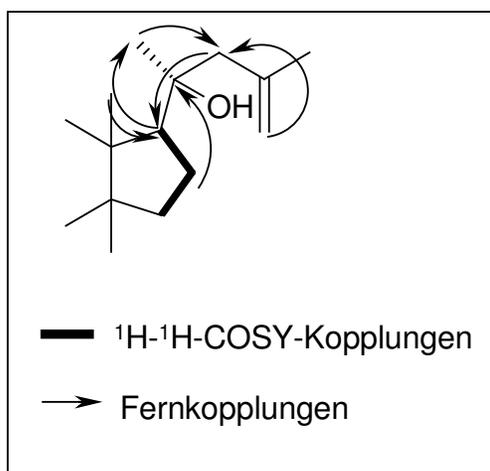


Abb. 4-39 Wichtige  $^1H$ - $^1H$ -COSY- und Fernkopplungen in Spongiporensäure B

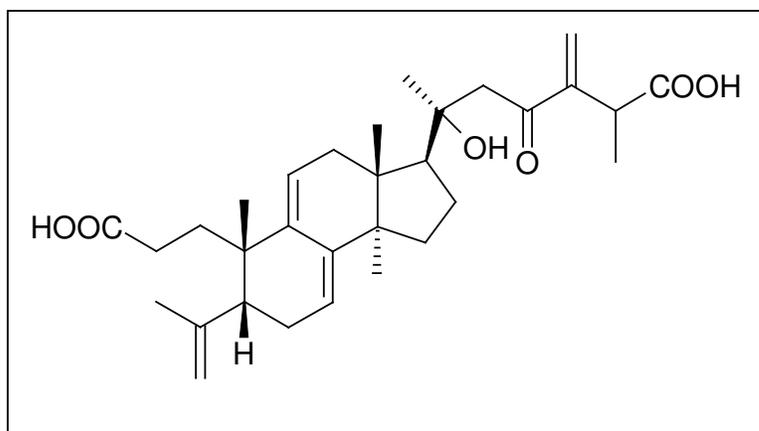


Abb. 4-40 Spongiporensäure B

Tabelle 4-10 Wichtige Kopplungen von Spongiporensäure B

| Wichtige Kopplungen                 |                             |                    |                                  |
|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------------------|
| <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY |                             | HMBC               |                                  |
| Proton(en)                          | Kopplung mit:<br>Proton(en) | Proton(en)         | Kopplung mit:<br>Kohlenstoff(en) |
| H <sub>3</sub> -27                  | H <sub>1</sub> -25          | H <sub>1</sub> -5  | C-29,C-30,C-19,C-7,              |
| H <sub>2</sub> -16                  | H <sub>2</sub> -15          | H <sub>3</sub> -19 | C-1,C-9                          |
| H <sub>1</sub> -11                  | H <sub>2</sub> -12          | H <sub>2</sub> -1  | C-3                              |
| H <sub>1</sub> -7                   | H <sub>2</sub> -6           | H <sub>1</sub> -7  | C-14,C-9                         |
| H <sub>1</sub> -5                   | H <sub>2</sub> -6           | H <sub>1</sub> -11 | C-13,C-8                         |
| H <sub>2</sub> -1                   | H <sub>2</sub> -2           | H <sub>3</sub> -18 | C-17,C-14                        |
|                                     |                             | H <sub>3</sub> -28 | C-15,C-8,C-13                    |
|                                     |                             | H <sub>3</sub> -21 | C-20                             |
|                                     |                             | H <sub>1</sub> -17 | C-15,C-20,C21,C-22               |
|                                     |                             | H <sub>2</sub> -22 | C-20,C-24                        |
|                                     |                             | H <sub>2</sub> -31 | C-23,C-25                        |
|                                     |                             | H <sub>3</sub> -27 | C-26,C-24                        |

Tabelle 4-11 NMR-Daten für Spongiporensäure B

| Spongiporensäure B (d <sub>4</sub> -Methanol) |                      |                       |
|---|----------------------|-----------------------|
| $\delta^1\text{H}$                            | M (J)                | $\delta^{13}\text{C}$ |
| 2.24,<br>1.72                                 | <i>m</i>             | 30.7                  |
| 1.84,<br>1.58                                 | <i>m</i>             | 36.2                  |
| -   | -                    | 177.9                 |
| -   | -                    | 149.2                 |
| 2.29  | <i>m</i>             | 51.2                  |
| 2.60,<br>2.04                                 | <i>m</i>             | 28.8                  |
| 5.32  | <i>br s</i>          | 117.7                 |
| -   | -                    | 142.1                 |
| -   | -                    | 137.6                 |
| -   | -                    | 38.4                  |
| 5.39  | <i>br s</i>          | 120.0                 |
| 2.37,<br>2.30                                 | <i>m</i>             | 38.9                  |
| -   | -                    | 44.8                  |
| -   | -                    | 50.6                  |
| 1.75  | <i>m</i>             | 31.2                  |
| 1.97  | <i>m</i>             | 22.3                  |
| 2.12  | <i>m</i>             | 53.5                  |
| 0.84  | <i>s</i>             | 17.9                  |
| 0.99  | <i>s</i>             | 21.4                  |
| -   | -                    | 75.3                  |
| 1.35  | <i>s</i>             | 26.0                  |
| 2.90  | <i>m</i>             | 49.4                  |
| -   | -                    | 202.3                 |
| -   | -                    | 150.3                 |
| 3.59  | <i>q(6.0)</i>        | 41.5                  |
| -   | -                    | 177.7                 |
| 1.30  | <i>d(6.1)</i>        | 15.5                  |
| 0.90  | <i>s</i>             | 33.9                  |
| 4.68,<br>4.62                                 | <i>s</i><br><i>s</i> | 111.4                 |
| 1.67  | <i>s</i>             | 21.1                  |
| 6.25,<br>5.96                                 | <i>s</i><br><i>s</i> | 125.5                 |

### 4.1.3 *Bjerkandera adusta*

*Bjerkandera adusta* hat einen halbkreisförmigen bis rosettigen Fruchtkörper. Er ist 3-7 cm breit und bis zu 4 cm vom Substrat abstehend. Die Dicke beträgt 2-6 mm. Frisch ist der Fruchtkörper ledrig, weich zäh, und biegsam. Im trockenen Zustand ist er sehr hart. Die Fruchtkörper sind oft in seitlich verwachsenen Reihen oder dachziegelig geschichtet größere Flächen überwachsend angeordnet. Die Oberseite ist haarig-faserig, hellbraun bis nussbraun, manchmal dunkler gezont.

*Bjerkandera adusta* ist ein sehr häufiger Pilz, der überall in Laubwäldern als Saprophyt (Weißfäuleerreger) totes Holz aller Art (besonders Laubholzarten) besiedelt. Bisweilen wächst er auch als Wundparasit an rindengeschädigten lebenden Bäumen. Man findet ihn das ganze Jahr über.

Synonyme: - <sup>[27]</sup>

Flüchtige Substanzen von auf bestimmten Medien gezüchteten Pilzen wurden bereits untersucht <sup>[67]</sup>. Aromatische Verbindungen (z.B. Benzaldehyd), Lactone (z.B. 4-Butanolid), Alkohole (1-Octen-3-ol) und weitere Substanzen wurden identifiziert. Der Pilz ist jedoch, was terpenoide Substanzen anbetrifft, bislang kaum untersucht worden.



Abb. 4-41 *Bjerkandera adusta* (Willd.: Fr.) Foto: © André Biemans <sup>[68]</sup>

#### 4.1.3.1 Flüchtige Inhaltsstoffe

Im ätherischen Öl von *Bjerkandera adusta* (Tabelle 4-3) stellt *R*-(-)-1-Octen-3-ol mit 22.7% die Hauptkomponente dar. Mit 11.3% vertreten ist *n*-Hexadecansäure, gefolgt von 1-Hepten-3-on (8.0%). Weitere Komponenten mit einem hohen Anteil am Öl sind 2-Pentylfuran (7.7%), (*E,E*)-2,4-Decadienal (6.4%) und *n*-Pentadecansäure (4.8%).

Zwei Komponenten sind bisher in Baumpilzen unbekannt. Es handelt sich dabei einerseits um 2-Butylfuran, das als flüchtige Substanz des Trüffel-ähnlichen Pilzes *Mesophellia glauca* bekannt ist <sup>[69]</sup> und andererseits um  $\alpha$ -Cadinol. Eine Substanz, die in den Schimmelpilzen *Trichoderma harzianum* und *Trichoderma hamatum* identifiziert wurde <sup>[70]</sup>.

Unbekannt in Pilzen ist *m*-Cymen (Abb. 4-42).

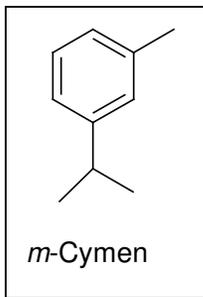
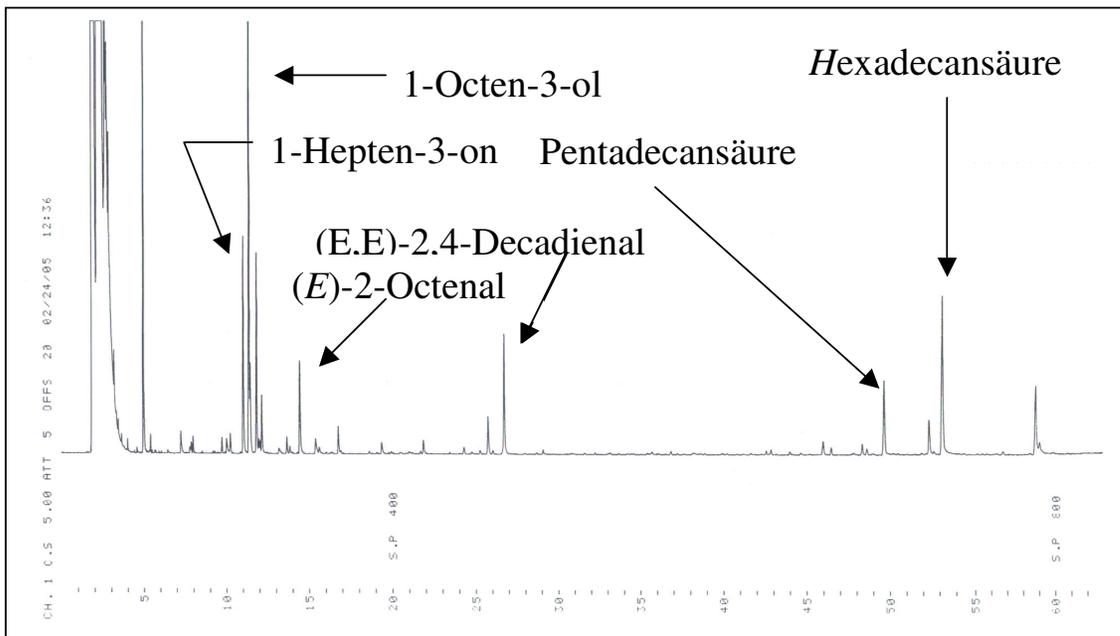
Abb. 4-42 Flüchtige Substanz aus *B. adusta*

Abbildung 4-43 zeigt das GC-FID-Chromatogramm. Die Substanzen wurden anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert<sup>[41]</sup>.

Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-12 aufgeführt. Für die Substanzen, die unter 0.1% vorliegen, werden keine Retentionszeiten im GC-FID angegeben.

Abb. 4-43 GC-FID-Chromatogramm des ätherischen Öls von *Bjerkandera adusta*Tabelle 4-12 Flüchtige Substanzen und deren prozentuale Anteile aus *B. adusta*

\* Kováts-Index

\*\* Relativer prozentualer Anteil der flüchtigen Substanzen basierend auf GC-FID; mit + markierte Substanzen sind in einer Menge kleiner als 0.1% enthalten

| Peak No. | Substanz                   | GC-MS |                | GC-FID         |      |
|----------|----------------------------|-------|----------------|----------------|------|
|          |                            | KI*   | M <sup>+</sup> | R <sub>t</sub> | %**  |
| 2        | 2-Heptanon                 | 871   | 114            |                | +    |
| 3        | 2-Butylfuran               | 869   | 124            |                | +    |
| 4        | Tricyclen                  | 963   | 136            |                | +    |
| 5        | ( <i>E</i> )-2-heptenal    | 942   | 112            |                | +    |
| 6        | α-Pinen                    | 936   | 136            |                | +    |
| 7        | Camphen                    | 950   | 136            |                | +    |
| 8        | 1-Hepten-3-on              | 956   | 112            | 10.96          | 8.0  |
| 9        | <i>R</i> -(-)-1-Octen-3-ol | 962   | 128            | 11.31          | 22.7 |
|          | <i>S</i> -(+)-1-Octen-3-ol |       |                |                | 3.7  |

|    |                                  |      |     |       |      |
|----|----------------------------------|------|-----|-------|------|
| 10 | 3-Octanon                        | 969  | 128 | 11.40 | 1.2  |
| 11 | 2-Pentylfuran                    | 981  | 138 | 11.77 | 7.7  |
| 12 | 3-Octanol                        | 981  | 130 |       | +    |
| 13 | 5-Ethylcyclopenten-1-carbaldehyd | 1010 | 124 |       | +    |
| 14 | <i>m</i> -Cymen                  | 1013 | 134 |       | +    |
| 15 | 1,8-Cineol                       | 1024 | 154 |       | +    |
| 17 | ( <i>E</i> )-2-Octenal           | 1034 | 126 | 14.38 | 4.4  |
| 18 | 1-Nonen-3-ol                     | 1058 | 142 |       | +    |
| 19 | <i>n</i> -Nonanal                | 1076 | 142 | 16.72 | 1.3  |
| 20 | Campher                          | 1123 | 152 |       | +    |
| 21 | <i>n</i> -Nonanol                | 1149 | 144 |       | +    |
| 22 | 2,4-Nonadienal                   | 1170 | 138 |       | +    |
| 23 | <i>n</i> -Decanal                | 1180 | 156 |       | +    |
| 24 | ( <i>E,E</i> )-2,4-Nonadienal    | 1188 | 138 |       | +    |
| 25 | ( <i>E</i> )-2-Decenal           | 1240 | 154 |       | +    |
| 26 | 2,4-Decadienal                   | 1270 | 152 | 25.71 | 1.9  |
| 27 | ( <i>E,E</i> )-2,4-Decadienal    | 1291 | 152 | 26.67 | 6.4  |
| 28 | <i>trans</i> -dauca-4(11),8-dien | 1529 | 204 |       | +    |
| 29 | ( <i>E</i> )-Nerolidol           | 1553 | 222 |       | +    |
| 30 | $\alpha$ -cadinol                | 1643 | 222 |       | +    |
| 31 | <i>n</i> -Tetradecansäure        | 1748 | 228 |       | +    |
| 32 | Hexadecanal                      | 1782 | 240 |       | +    |
| 33 | <i>n</i> -Pentadecansäure        | 1823 | 242 | 49.72 | 4.8  |
| 34 | <i>n</i> -Hexadecansäure         | 1951 | 256 | 53.27 | 11.3 |
| 35 | Linolsäure                       | 2095 | 280 | 58.74 | 4.9  |

#### 4.1.3.2 Nichtflüchtige Inhaltsstoffe

##### 4.1.3.2.1 Ergosterolperoxid

Ergosterolperoxid konnte mittels semi-präparativer HPLC wie in Abschnitt 4.1.2.2.4 isoliert werden. Das Massen- sowie das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigten eine gute Übereinstimmung mit Literaturdaten<sup>[59]</sup>.

##### 4.1.3.2.2 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol

Ebenfalls analog zu Abschnitt 4.1.2.2.5 konnte 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol isoliert werden. Auch hier gab es eine gute Übereinstimmung des Massenspektrums und des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums mit der zuvor isolierten Substanz (Abschnitt 4.1.2.2.5).

##### 4.1.3.2.3 Cholesterin

Nach Fraktionierung des Dichlormethanextraktes mittels Säulenchromatographie erhielt man eine Fraktion, die silyliert und anschließend mittels GC-MS analysiert wurde. Mehrere TMS-

Ether von Steroiden konnten identifiziert werden. Das MS zeigte eine deutliche Übereinstimmung mit dem Massenspektrum des TMS-Ethers von Cholesterin. GC-FID-Analysen der Fraktion, der Standardsubstanz und einer Coinjektion bestätigten Cholesterin (Abb. 4-44) in der Fraktion. Cholesterin wurde bereits aus Basidiomyceten identifiziert<sup>[71]</sup>. Zum ersten Mal wurde hier die Substanz in *Bjerkandera adusta* gefunden.

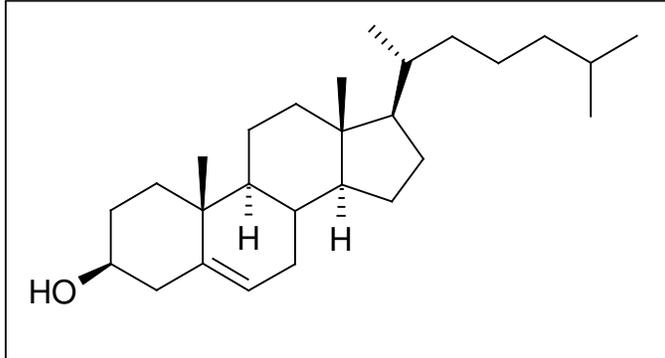


Abb. 4-44 Cholesterin

#### 4.1.3.2.4 Stigmasterin

Die GC-MS-Analyse zeigte den TMS-Ether eines Steroids mit einem Molpeak bei 484  $m/z$ . Das Fragmentation bei 469  $m/z$  deutlich die Abspaltung einer Methylgruppe. Das Fragmentation bei 255  $m/z$  deutet auf ein Monoensteroidringsystem<sup>[44]</sup>. Das Massenspektrum zeigte eine gute Übereinstimmung mit der Massenspektrum des TMS-Ethers der Referenzsubstanz Stigmasterin (Abb. 4-45). Bei gaschromatographischer Analyse mit Coinjektion von Standardsubstanz und Analyt konnte Stigmasterin als Inhaltsstoff von *B. adusta* bestätigt werden. Stigmasterin ist bereits aus den Basidiomyceten *Leccinum quercinum* und *Hydnum repandum* bekannt<sup>[72]</sup>. Zum ersten Mal wurde hier die Substanz in *B. adusta* gefunden.

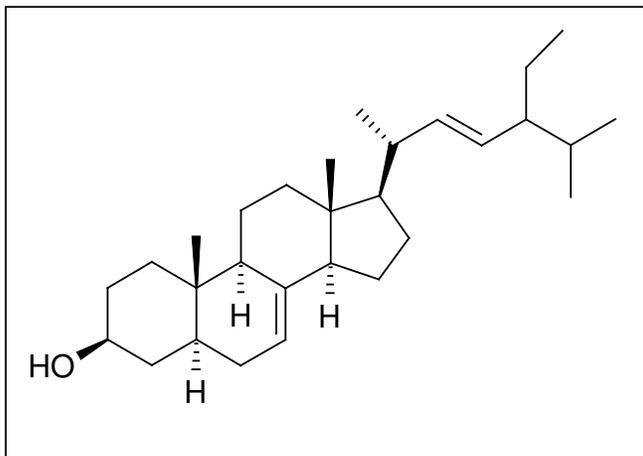


Abb. 4-45 Stigmasterin

#### 4.1.3.2.5 Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol

Die GC-MS-Analyse zeigte den TMS-Ether eines Steroids mit einem Molpeak bei 484  $m/z$ . Man erkennt einen Fragmentation bei 471  $m/z$  ( $[M-CH_3]^+$ ). Hier ebenfalls zu erkennen ist das

Fragmentation bei 255  $m/z$ , was auf ein Monoensteroidringsystem deutet<sup>[44]</sup>. Ein Vergleich mit dem Massenspektrum der Referenzsubstanz Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol (Abb. 4-46) nach vorausgegangener Silylierung zeigte gute Übereinstimmung. Bei gaschromatographischer Analyse mit Coinjektion von Standardsubstanz und Analyt konnte Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol als Inhaltsstoff von *B. adusta* bestätigt werden. Die Substanz ist bereits aus dem Basidiomyceten *Clitocybe aurantica*, *Clitocybe candida*, *Clitocybe cinerascens*, *Clitocybe geotropa* und *Clitocybe nebularis*<sup>[73]</sup> identifiziert worden. Auch hier wurde diese Substanz zum ersten Mal als Inhaltsstoff von *Bjerkandera adusta* identifiziert.

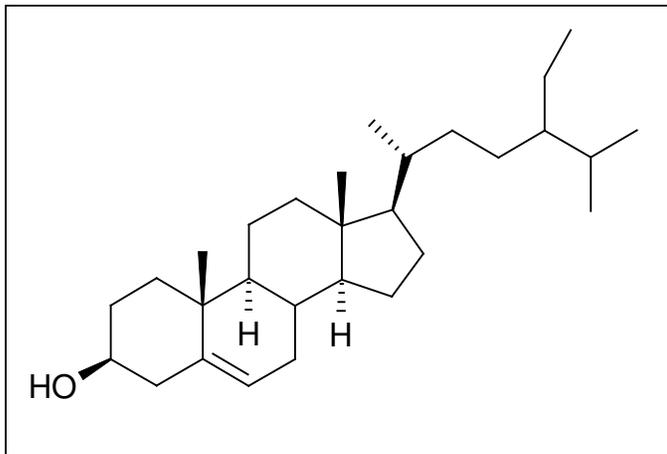


Abb. 4-46 Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol

#### 4.1.3.2.6 Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol

Das Massenspektrum des TMS-Ethers des in in Abschnitt 4.1.2.2.1 isolierten Steroids Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol glich dem Massenspektrum eines der Peaks der silylierten Fraktion. Nach Silylierung der zuvor isolierten Substanz und Coinjektion mit der Fraktion wurde Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol als Inhaltsstoff dieses Pilzes bestätigt.

#### 4.1.4 *Laetiporus sulphureus*

Der Pilz wächst meist dachziegelartig und besitzt fächer- bis halbkreisförmige Fruchtkörper, die 10-50 cm breit werden können. Die Dicke beträgt 1-4 cm. Bei jungen Fruchtkörpern ist die Oberfläche leuchtend schwefelgelb bis orange gelb, samtig und unregelmäßig wellig. Alte Fruchtkörper sehen blassgelb oder grauweiß aus. Das Fleisch ist bei jungen Fruchtkörpern weich saftig und elastisch. Bei älteren ist es jedoch hart, trocken oder brüchig. Der Pilz kommt vornehmlich von Mai bis September vor. Er lebt parasitisch an Laub- (besonders Eiche), seltener an Nadelbäumen. Er ist einjährig. Der Pilz verursacht im befallenen Holz eine intensive Braunfäule. Dabei werden Splintholz und Rinde kaum angegriffen, so dass der Baum trotz offensichtlichen starken Befalls gesund aussieht. Erst nach einigen Jahren bricht der Baum zusammen. Am umgestürzten Baum fruktifiziert der Pilz noch in den folgenden Jahren. Der Pilz ist gut gekocht essbar.

Synonyme: - <sup>[12], [27]</sup>

Es wurden bisher 4 Triterpene aus diesem Pilz isoliert (Abb. 4-48). Sie zeigen Apoptose-induzierende Wirkung in Leukämie Zellen<sup>[74]</sup>.



Abb. 4-47 *Laetiporus sulphureus*  
(Bull.: Fr.) Murr.

Foto: © Pamela Kaminski <sup>[75]</sup>

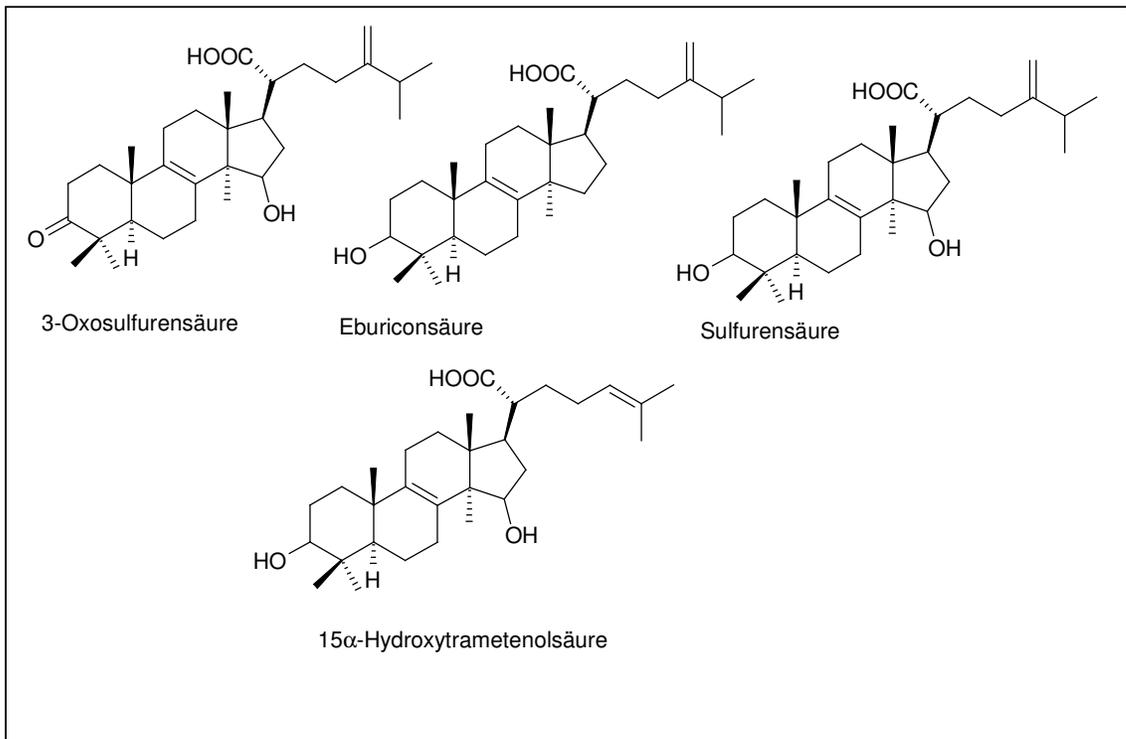


Abb. 4-48 Aus *Laetiporus sulphureus* bisher isolierten Substanzen

#### 4.1.4.1 Flüchtige Inhaltsstoffe

*Laetiporus sulphureus* enthielt keine signifikante Menge an ätherischem Öl. Eingesetzt wurden 62.8 g Probenmaterial (s. Abschnitt 6.10). In Spuren enthalten waren *n*-Nonanal, *n*-Hexadecansäure und Linolsäure. Der Pilz wird häufig als aromatisch beschrieben<sup>[27]</sup>. Die geringe Menge an ätherischem Öl könnte jahreszeitlich oder altersbedingt sein.

#### 4.1.4.2 Nichtflüchtige Inhaltsstoffe

##### 4.1.4.2.1 Eburiconsäure

Eburiconsäure wurde aus dem Dichlormethanextrakt mittels semi-präparativer DC mit anschließender semi-präparativer HPLC isoliert werden. Das Massen- und das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigten gute Übereinstimmung mit den Daten der Standardsubstanz<sup>[62]</sup>.

##### 4.1.4.2.2 Trametenolsäure B

Trametenolsäure B wurde aus dem Dichlormethanextrakt mittels Dünnschichtchromatographie isoliert. Das EI-MS-Spektrum zeigte ein Molekülion bei 456  $m/z$ . Mittels ESI-MS wurde ein Ion bei 479  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) beobachtet. Der  $m/z$ -Wert des hochaufgelösten Na-Addukt-Ions (479.3518  $m/z$ ; berechneter Wert: 479.3500  $m/z$ ) führte zu einer Summenformel von  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ , eine Substanz mit 7 Doppelbindungsäquivalenten. Anhand der vorliegenden Daten aller Spektren konnte die Substanz als Trametenolsäure B (Abb. 4-49) identifiziert werden. Diese Substanz ist noch nicht als Inhaltsstoff des Baumpilzes *Laetiporus sulphureus*,<sup>[76-78]</sup> aber schon zuvor aus dem Baumpilz *Fomitopsis pinicola* isoliert und identifiziert worden<sup>[77]</sup>.

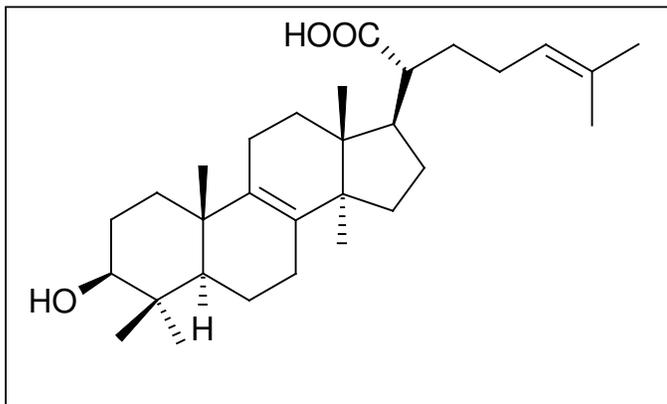


Abb. 4-49 Trametenolsäure B

##### 4.1.4.2.3 Ergosta-7,22-dien-3-on

Aus dem Dichlormethanextrakt konnte Ergosta-7,22-dien-3-on (Abb. 4-55) identifiziert werden. Es wurde die GC-MS-Analyse einer silylierten Fraktion durchgeführt. Als einzige Substanz zeigte diese Substanz im Massenspektrum keinen Peak bei 73  $m/z$  (Verlust der Trimethylsilylgruppe), es handelt sich also um ein Triterpenoid ohne Hydroxylgruppe oder andere silylierbare Gruppen. Der Molpeak beträgt 396  $m/z$ . Fragmentationen wie 381  $m/z$  können sowohl von einer Allyl- als auch von einer  $\sigma$ -Fragmentierung herrühren (Abb. 4-50, 4-51). Der Basispeak 269  $m/z$  stammt aus der in Abschnitt 4.1.1.2.1 beschriebenen Fragmentierung (Abb. 4-52) nach Wyllie und Djerassi (1968)<sup>[45]</sup>. Weitere wichtige Fragmente sind 109  $m/z$ , das aus einer Retro-Diels-Alder Reaktion (Abb. 4-53) stammen kann, sowie 55  $m/z$ , das ein Acyliumion (Abb. 4-54) darstellt, was typisch für ein Keton ist. Ergosta-7,22-dien-3-on ist schon als Inhaltsstoff von Holz zersetzenden Basidiomyceten (*Ganoderma*

*applanatum*) identifiziert worden<sup>[79]</sup>. Ein Vergleich mit den massenspektrometrischen Daten zeigte eine befriedigende Übereinstimmung<sup>[79], [80]</sup>.

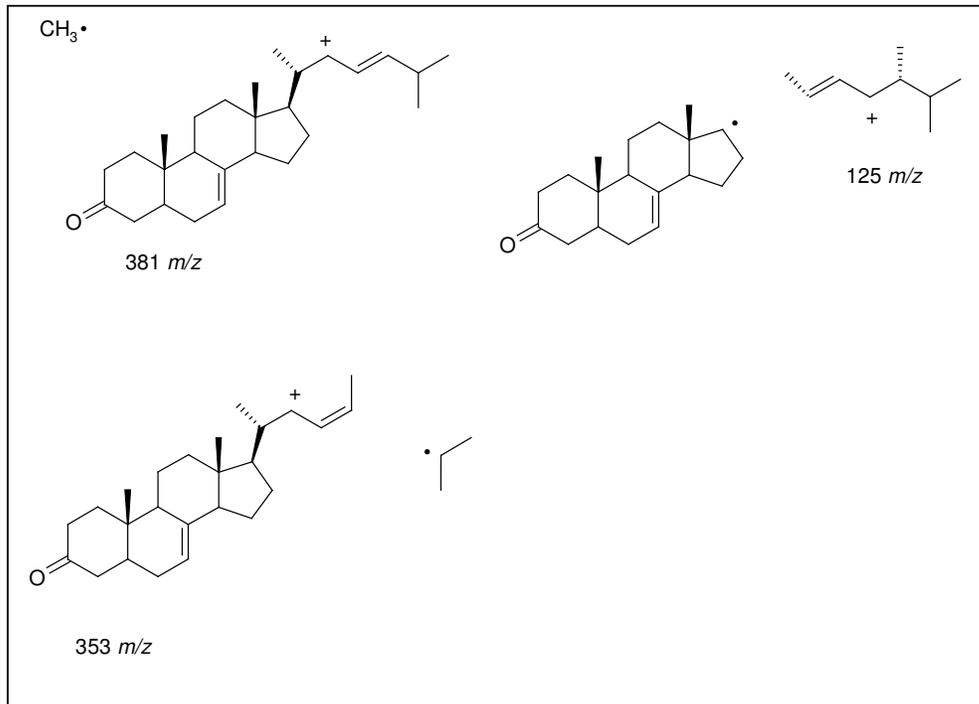


Abb. 4-50 Wichtige Allylsplattungen von Ergosta-7,22-dien-3-on

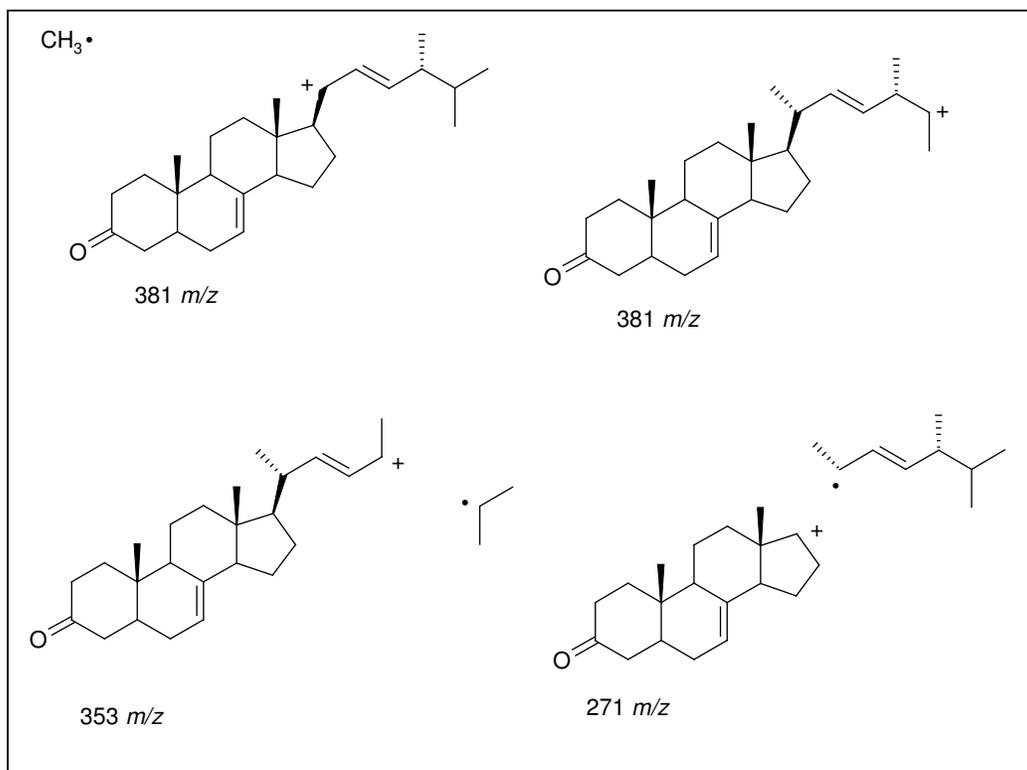


Abb. 4-51 Wichtige  $\sigma$ -Splattungen von Ergosta-7,22-dien-3-on

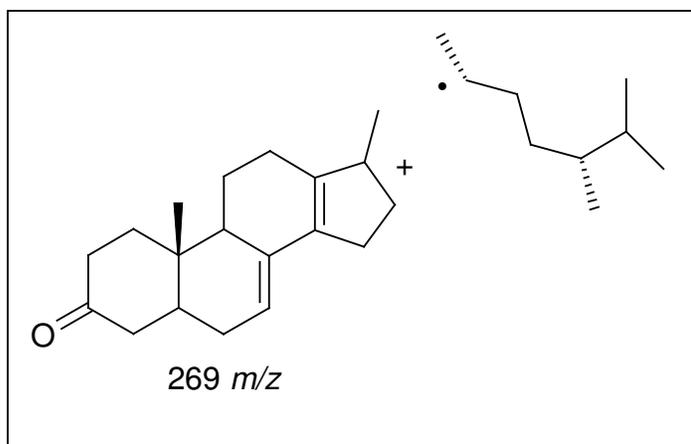


Abb. 4-52 Fragmentierung von Ergosta-7,22-dien-3-on nach Wyllie und Djerassi (1968)

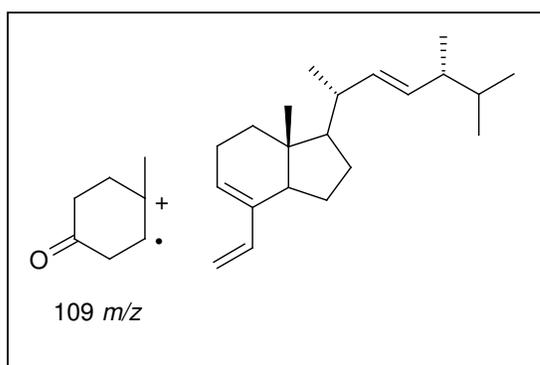
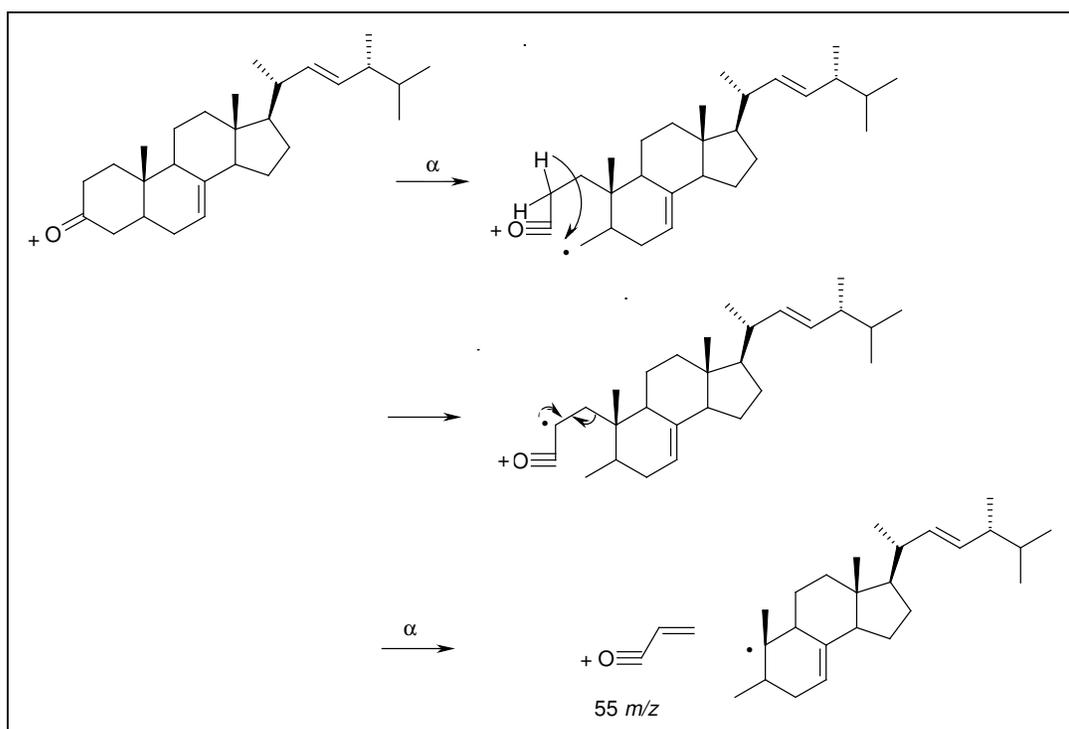


Abb. 4-53 Retro-Diels-Alder-Spaltung von Ergosta-7,22-dien-3-on

Abb. 4-54  $\alpha$ -Spaltungen und Bildung des Acyliumions

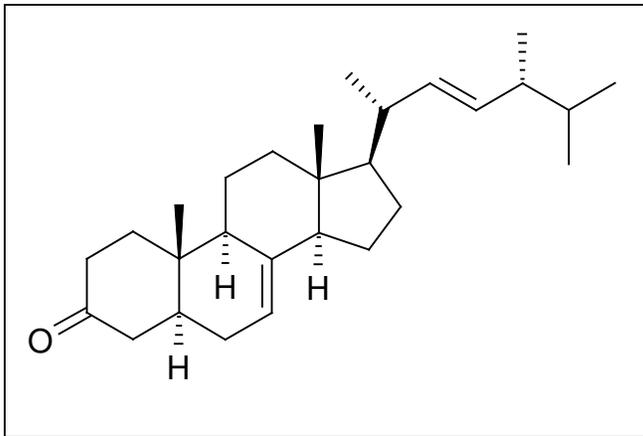


Abb. 4-55 Ergosta-7,22-dien-3-on

#### 4.1.4.2.4 Cholesterin

Mittels GC-MS-Analyse konnte Cholesterin in der silylierten Fraktion identifiziert werden. Die Retentionszeit und das Massenspektrum des TMS-Ethers zeigten gute Übereinstimmung mit der Retentionszeit und dem Massenspektrum von Cholesterin. Einspritzungen des Standards, der Fraktion und eines Gemischs aus beiden bestätigten das Vorhandensein von Cholesterin in der Fraktion. Cholesterin wird hier zum ersten Mal als Inhaltsstoff von *Laetiporus sulphureus* identifiziert.

#### 4.1.4.2.5 Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol

Das Massenspektrum eines TMS-Ethers einer mittels GC-MS-Analyse untersuchten Substanz zeigte einen Molpeak bei 470  $m/z$ . Das Fragmention 255  $m/z$  deutet auf ein Monoensteroidringsystem<sup>[44]</sup>. Das Massenspektrum zeigte eine gute Übereinstimmung mit dem Massenspektrum des in Abschnitt 4.1.2.2.1 isolierten Steroids Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol nach Silylierung. Bei gaschromatographischer Analyse mit Coinjektion von Standardsubstanz und Analyt konnte Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol als Inhaltsstoff von *L. sulphureus* identifiziert werden.

#### 4.1.4.2.6 Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol

Die Retentionszeit und die GC-MS-Daten dieser Substanz stimmten mit denen von Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol (Abb. 4-56) aus Abschnitt 4.1.1.2.2 überein. Eine Coinjektion am GC konnte dies bestätigen. Diese Substanz ist zuvor aus dem Holz zersetzenden Pilz *Lenzites trabea* identifiziert worden<sup>[81]</sup>.

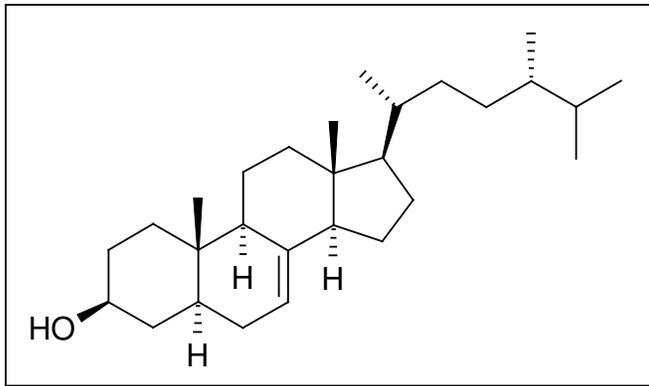


Abb. 4-56 Ergosta-7-en-3β-ol

#### 4.1.4.2.7 Ergosterin

Die GC-MS-Analyse des TMS-Derivates zeigte gute Übereinstimmung des Massenspektrums eines Peaks mit dem Massenspektrum des TMS-ethers von Ergosterin. Coinjektion bestätigte Ergosterin als Inhaltsstoff dieses Basidiomyceten.

#### 4.1.4.2.8 Lanosta-8(9),24(28)-dien-3β-ol

Auch hier gab es gute Übereinstimmungen im Massenspektrum des TMS-Ethers eines Peaks mit dem Massenspektrum des TMS-Ethers von Lanosta-8(9),24(28)-dien-3β-ol, das zuvor isoliert wurde (s. Abschnitt 4.1.2.2.2). Durch Coinjektion der Fraktion und des Standards sowie separate Injektionen konnte der Peak als TMS-Ether von Lanosta-8(9),24(28)-dien-3β-ol identifiziert werden. Hier wird diese Substanz zum ersten Mal als Inhaltsstoff von *Laetiporus sulphureus* identifiziert.

#### 4.1.4.2.9 3-Phenylpropanol

Mittels Säulenchromatographie wurde eine polarere Fraktion erhalten, in der zusätzlich zu den bereits identifizierten Substanzen eine Substanz enthalten war, deren Massenspektrum (nach Silylierung) gute Übereinstimmungen mit dem Massenspektrum des TMS-Ethers von 3-Phenylpropanol (Abb. 4-57) zeigte. Da 3-Phenylpropanol als Standardsubstanz verfügbar war, wurde eine bestimmte Menge der Standardsubstanz silyliert. Die Injektion des Standards, der Fraktion und Coinjektion der beiden bestätigte 3-Phenylpropanol als Inhaltsstoff von *Laetiporus sulphureus*. Diese Substanz wurde zuvor aus dem Holz zersetzenden Basidiomyceten *Gloeophyllum odoratum* identifiziert<sup>[82]</sup>. Erstmals wurde 3-Phenylpropanol als Inhaltsstoff von *Laetiporus sulphureus* identifiziert.

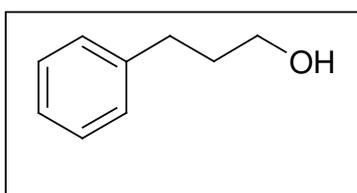


Abb. 4-57 3-Phenylpropanol

### 4.1.5 *Schizophyllum commune*

Die muschel-fächerförmigen Fruchtkörper von *Schizophyllum commune* sind oft gelappt, lederartig, zäh und mit verschmälter Basis am Substrat angewachsen. Die Oberfläche ist filzig-striegelig, trocken weißlich, feucht schmutzig graubräunlich und undeutlich gezont. Der Rand ist etwas eingebogen und gekerbt. Bei alten Fruchtkörpern oft gelappt und eingeschnitten. Die Fruchtkörper besitzen Pseudolamellen, die von der Anwachsstelle fächerförmig ausstrahlen, verschieden lang sind und eine längs gespaltene Schneide (rosa-fleischfarben bis fleischbräunlich) besitzen. Bei Trockenheit öffnet sich diese Scheide und rollt sich über das Hymenium; sie schließt sich bei Feuchtigkeit wieder. Das ockerfarbene Fleisch ist sehr dünn und zäh. *Schizophyllum commune* ist weit verbreitet und kommt ganzjährig meist gesellig an totem Laub- und Nadelholz vor (Weißfäuleerreger). Er ist sonnigen Standorten besonders angepasst. Bei Trockenheit schrumpft er zusammen, bis er knochenhart ist, bei Feuchtigkeit lebt er auch nach Monaten wieder auf. In China wird er als Heilpilz gegen Leukorrhö und zur Stärkung des Körpers verwendet<sup>[83]</sup>.

Synonyme: -<sup>[27]</sup>

Dieser Pilz ist bislang noch nicht auf Sekundärmetabolite hin untersucht worden.



Abb. 4-57 *Schizophyllum commune*  
(Fr.: Fr.)

Foto: © Michael Wood<sup>[84]</sup>

#### 4.1.5.1 Flüchtige Inhaltsstoffe

Das Öl von *Schizophyllum commune* zeigt als Hauptkomponenten 1-Hepten-3-on (21.1%), *R*-(-)-1-Octen-3-ol (9.4%), Linolsäure (9.9%), *n*-Hexadecansäure und  $\alpha$ -Bisabolol (2.2%).

Bisher nicht bekannte flüchtige Komponenten des ätherischen Öls von Baumpilzen stellen die Substanzen Tetradecanal, Hexadecanal und Piperiton dar. Die beiden erstgenannten Substanzen wurden bereits in *Cercospora arachidola* identifiziert<sup>[85]</sup>. Piperiton wurde aus dem besonders auf saurem Boden wachsenden Basidiomyceten *Boletus erythropus* identifiziert<sup>[86]</sup>.

Substanzen, die zum ersten Mal als Pilzinhaltsstoffe in *S. commune* nachgewiesen wurden, sind:  $\alpha$ -Thujen, (*Z,E*)- $\alpha$ -Farnesen,  $\beta$ -Curcumen, (*E*)- $\gamma$ -Bisabolen, *trans*-Dauca-4(11),8-dien, Globulol, (*Z*)-Heptadec-8-en und 6,10,14-Trimethylpentadeca-2-on (Abb. 4-59).

Dieses ätherische Öl enthält wie das von *Ganoderma lucidum* das antiphlogistische sowie spasmolytische  $\alpha$ -Bisabolol und das Antiasthmatikum Piperiton.



Tabelle 4-13 Flüchtige Substanzen und deren prozentuale Anteile aus *S. commune*

\* Kováts-Index

\*\* Relativer prozentualer Anteil der flüchtigen Substanzen basierend auf GC-FID; mit + markierte Substanzen sind in einer Menge kleiner als 0.1% enthalten.

| Peak No. | Substanz                           | GC-MS |                | GC-FID         |      |
|----------|------------------------------------|-------|----------------|----------------|------|
|          |                                    | KI*   | M <sup>+</sup> | R <sub>t</sub> | %**  |
| 1        | 2-Heptanon                         | 871   | 144            |                | +    |
| 2        | <i>n</i> -Nonan                    | 906   | 128            |                | +    |
| 3        | Tricyclen                          | 936   | 136            | 8.95           | 0.3  |
| 4        | $\alpha$ -Thujen                   | 936   | 136            | 9.20           | 1.9  |
| 5        | Benzaldehyd                        | 941   | 106            | 9.29           | 2.3  |
| 6        | 1-Hepten-3-on                      | 956   | 112            | 10.43          | 21.1 |
| 7        | <i>R</i> (-)-1-Octen-3-ol          | 962   | 128            | 10.79          | 9.4  |
|          | <i>S</i> (+)-1-Octen-3-ol          |       |                |                | 1.0  |
| 8        | 3-Octanon                          | 969   | 128            | 10.90          | 3.7  |
| 9        | $\beta$ -Pinen                     | 978   | 136            |                | +    |
| 10       | 2-Pentylfuran                      | 981   | 138            | 11.48          | 0.5  |
| 11       | Phenylacetaldehyd                  | 1012  | 120            | 11.53          | 3.4  |
| 12       | ( <i>E</i> )-2-Octenal             | 1034  | 126            | 12.67          | 1.4  |
| 13       | 2-Nonanon                          |       | 142            |                | +    |
| 14       | <i>n</i> -Nonanal                  | 1076  | 142            | 13.86          | 1.0  |
| 15       | <i>n</i> -Undecan                  | 1100  | 156            |                | +    |
| 16       | <i>n</i> -Nonanol                  | 1149  | 144            |                | +    |
| 17       | <i>n</i> -Decanal                  | 1180  | 156            | 16.16          | 0.7  |
| 18       | <i>n</i> -Dodecan                  | 1200  | 170            | 16.31          | 0.5  |
| 19       | Piperiton                          | 1226  | 152            |                | +    |
| 20       | <i>n</i> -Tridecan                 | 1292  | 184            |                | +    |
| 21       | <i>n</i> -Tetradecan               | 1392  | 198            |                | +    |
| 22       | Geranylaceton                      | 1430  | 194            |                | +    |
| 23       | $\alpha$ -Guaien                   | 1440  | 204            |                | +    |
| 24       | <i>ar</i> -Curcumen                | 1473  | 202            | 32.40          | 1.2  |
| 25       | Germacren D                        | 1479  | 204            |                | +    |
| 26       | ( <i>Z,E</i> )- $\alpha$ -Farnesen | 1477  | 204            | 33.57          | 1.8  |
| 27       | <i>n</i> -Pentadecan               | 1500  | 212            | 34.00          | 0.6  |
| 28       | $\beta$ -Curcumen                  | 1503  | 204            | 34.71          | 0.8  |
| 29       | $\delta$ -Cadinen                  | 1520  | 204            | 35.19          | 0.5  |
| 30       | ( <i>E</i> )- $\gamma$ -Bisabolen  | 1521  | 204            | 35.37          | 0.7  |
| 31       | <i>trans</i> -Dauca-4(11),8-dien   | 1529  | 204            |                | +    |
| 32       | ( <i>E</i> )-Nerolidol             | 1553  | 222            | 36.23          | 0.8  |
| 33       | Tetradecanal                       | 1596  | 194            | 39.51          | 0.5  |
| 34       | Globulol                           | 1589  | 204            | 40.91          | 0.2  |
| 35       | $\alpha$ -Bisabolol                | 1613  | 204            | 42.11          | 2.2  |
| 36       | ( <i>Z</i> )-Heptadec-8-en         | 1666  | 238            |                | +    |
| 37       | <i>n</i> -Tetradecansäure          | 1748  | 228            | 45.32          | 1.5  |
| 38       | Hexadecanal                        | 1782  | 222            |                | +    |
| 39       | <i>n</i> -Octadecan                | 1792  | 254            |                | +    |
| 40       | 6,10,14-Trimethylpentadeca-2-on    | 1817  | 250            |                | +    |
| 41       | Pentadecansäure                    | 1823  | 242            | 48.99          | 2.4  |
| 42       | Palmitoleinsäure                   | 1911  | 254            | 51.69          | 1.   |

|    |                          |      |     |       |     |
|----|--------------------------|------|-----|-------|-----|
| 43 | <i>n</i> -Hexadecansäure | 1951 | 256 | 52.56 | 8.5 |
| 44 | Linolsäure               | 2095 | 280 | 58.02 | 9.9 |

#### 4.1.6 *Datronia mollis*

Der Fruchtkörper ist resupinat bis effuso-reflex, kann bis zu einem Meter lang werden und ist 15 cm breit. Die Hutkanten sind schmal, bis 1.5 cm abstehend und lederig. Die Oberfläche der Hutkanten ist dunkelbraun bis fast schwarz, feinfilzig und eng zoniert. Kommt ganzjährig in Laub-, Auen- und Nadelwäldern an liegenden Ästen und Stümpfen verschiedener berindeter oder entrindeter Laubhölzer, seltener Nadelhölzer vor. Der Pilz ist einjährig und ein Weißfäuleerreger.

Synonyme: - *Antrodia mollis* (Sommerf.: Fr.)<sup>[27]</sup>

Dieser Pilz ist bislang nicht auf Sekundärmetabolite hin untersucht worden.



Abb. 4-61 *Datronia mollis* (Sommerf.: Fr.)

Foto: © Laurent Galliot<sup>[87]</sup>

##### 4.1.6.1 Flüchtige Inhaltsstoffe

Hauptkomponenten im ätherischen Öl von *Datronia mollis* sind *n*-Nonanal (9.4%), *R*-(-)-1-Octen-3-ol (5.1%), (*E,E*)-2,4-Decadienal (4.6%),  $\beta$ -Barbaten (2.6%) und  $\alpha$ -Pinen (2.3%).

Linolsäuremethylester wurde bereits in einem Holz zersetzenden Ascomyceten identifiziert<sup>[88]</sup>. Erstmals nachgewiesene Substanzen in Pilzen in dem ätherischen Öl dieses Pilzes sind der Alkohol 1-Nonen-3-ol, der Monoterpenalkohol Terpinen-4-ol, die Sesquiterpene Gymnomitra-3(15),4-dien, Carota-5,8-dien, der Aromat *p*-Methylanisol und 5-Ethylcyclopent-1-en-carbaldehyd (Abb. 4-62). Ethylcyclopent-1-en-carbaldehyd wurde bereits als Reaktionsprodukt der Erwärmung von fleischähnlichen Matrices, die Cystein, Ribose und mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthielten, identifiziert<sup>[89]</sup>.

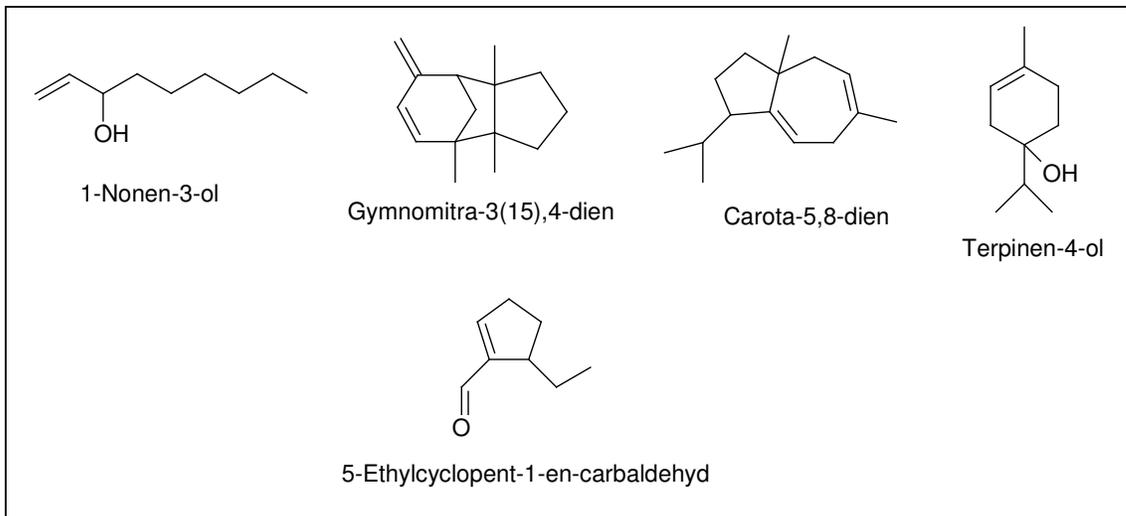
Abb. 4-62 Flüchtige Substanzen aus *D. mollis*

Abbildung 4-63 zeigt das GC-FID-Chromatogramm. Die Substanzen wurden anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert<sup>[41]</sup>. Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-14 aufgeführt. Für die Substanzen, die in Mengen unter 0.1% vorliegen, werden keine Retentionszeiten im GC-FID angegeben.

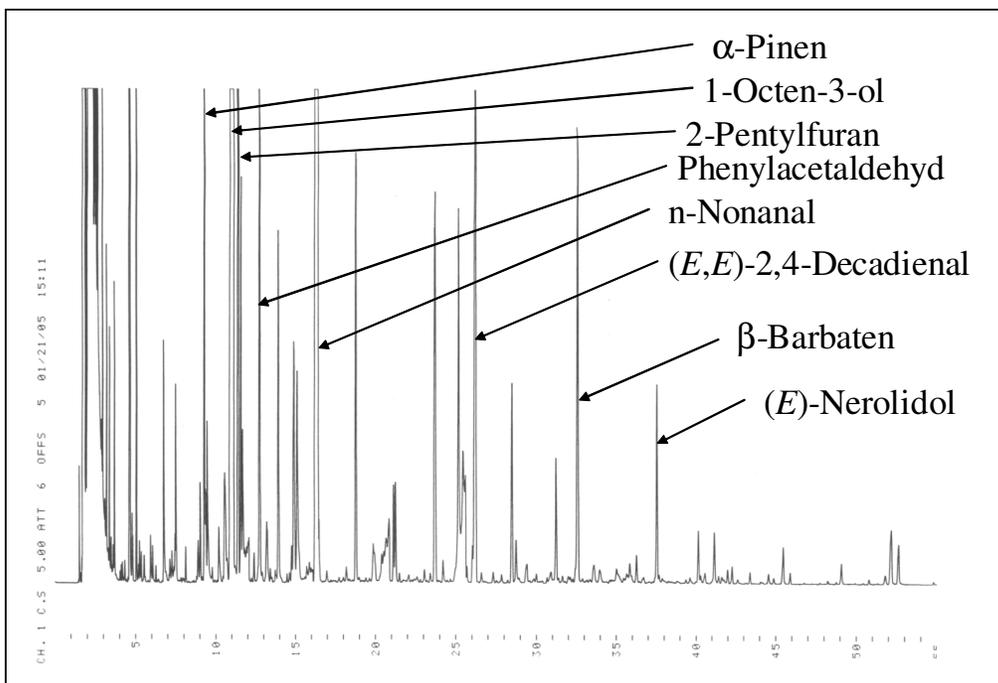
Abb. 4-63 GC-FID-Chromatogramm des ätherischen Öls von *Datronia mollis*

Tabelle 4-14 Flüchtige Substanzen und deren prozentuale Anteile aus *D. mollis*

\* Kováts-Index

\*\* Relativer prozentualer Anteil der flüchtigen Substanzen basierend auf GC-FID; mit + markierte Substanzen sind in einer Menge kleiner als 0.1% enthalten

| Peak No. | Substanz                           | GC-MS |                | GC-FID         |      |
|----------|------------------------------------|-------|----------------|----------------|------|
|          |                                    | KI*   | M <sup>+</sup> | R <sub>t</sub> | %**  |
| 1        | 1-Hexanol                          |       | 102            |                | +    |
| 2        | <i>n</i> -Nonan                    | 906   | 128            | 8.09           | 0.1  |
| 3        | Tricyclen                          | 927   | 136            | 9.00           | 0.3  |
| 4        | $\alpha$ -Pinen                    | 936   | 136            | 9.26           | 2.30 |
| 5        | Benzaldehyd                        | 941   | 106            | 9.44           | 0.7  |
| 6        | Camphen                            | 950   | 136            |                | +    |
| 7        | 1-Hepten-3-on                      | 956   | 112            | 10.55          | 0.5  |
| 8        | <i>R</i> -(-)-1-Octen-3-ol         | 962   | 128            | 11.40          | 5.1  |
|          | <i>S</i> -(+)-1-Octen-3-ol         |       |                |                | 0.1  |
| 9        | 2-Pentylfuran                      | 981   | 138            | 11.56          | 1.3  |
| 10       | 3-Octanol                          | 981   | 130            | 11.67          | 0.9  |
| 11       | <i>p</i> -Methylanisol             | 1004  | 122            |                | +    |
| 12       | $\Delta$ 3-Caren                   | 1012  | 136            |                | +    |
| 13       | 5-Ethylcyclopentene-1-carbaldehyd  | 1010  | 124            |                | +    |
| 14       | Phenylacetaldehyd                  | 1012  | 120            | 12.73          | 2.5  |
| 15       | Limonen                            | 1025  | 136            | 13.17          | 0.2  |
| 16       | ( <i>E</i> )-2-Octenal             | 1034  | 126            | 13.91          | 1.5  |
| 17       | Acetophenon                        | 1036  | 120            |                | +    |
| 18       | 1-Nonen-3-ol                       | 1058  | 142            | 14.90          | 0.6  |
| 19       | <i>n</i> -Nonanal                  | 1076  | 142            | 16.36          | 9.4  |
| 21       | ( <i>E</i> )-2-Nonenal             | 1139  | 140            | 18.77          | 1.1  |
| 22       | Terpinene-4-ol                     | 1164  | 154            |                | +    |
| 23       | <i>n</i> -Octansäure               | 1156  | 144            |                | +    |
| 24       | <i>n</i> -Decanal                  | 1180  | 156            | 21.13          | 0.4  |
| 25       | ( <i>E,E</i> )-2,4-Nonadienal      | 1188  | 138            | 21.25          | 0.5  |
| 26       | ( <i>E</i> )-2-Decenal             | 1240  | 154            | 23.71          | 2.0  |
| 27       | <i>n</i> -Nonansäure               | 1263  | 158            |                | +    |
| 28       | 2,4-Decadienal                     | 1270  | 152            | 25.17          | 2.2  |
| 29       | ( <i>E,E</i> )-2,4-Decadienal      | 1291  | 152            | 26.22          | 4.6  |
| 30       | Daucen                             | 1380  | 204            |                | +    |
| 31       | Gymnomitra-3(15),4-dien            | 1413  | 202            |                | +    |
| 32       | $\alpha$ -Barbaten                 | 1414  | 204            | 31.21          | 0.7  |
| 33       | $\beta$ -Cedren                    | 1424  | 204            |                | +    |
| 34       | Geranylaceton                      | 1430  | 194            |                | +    |
| 35       | Isobazzanen                        | 1442  | 204            |                | +    |
| 36       | $\beta$ -Barbaten                  | 1445  | 204            | 32.57          | 2.6  |
| 37       | $\beta$ -Acoradien                 | 1465  | 204            |                | +    |
| 38       | Carota-5,8-dien                    | 1465  | 204            |                | +    |
| 39       | ( <i>E,Z</i> )- $\alpha$ -Farnesen | 1475  | 204            |                | +    |
| 40       | Cuparen                            | 1498  | 202            |                | +    |
| 41       | $\beta$ -Bazzanen                  | 1519  | 204            |                | +    |
| 42       | ( <i>Z</i> )-Nerolidol             | 1522  | 222            | 37.53          | 1.1  |

|    |                                  |      |     |       |     |
|----|----------------------------------|------|-----|-------|-----|
| 43 | <i>trans</i> -Dauca-4(11),8-dien | 1529 | 204 |       | +   |
| 44 | Aromadendra-4,9-dien             | 1534 | 202 |       | +   |
| 45 | 1- <i>epi</i> -Cubenol           | 1623 | 222 | 40.12 | 0.3 |
| 46 | Pentadecanal                     | 1702 | 226 | 43.39 | 0.1 |
| 47 | <i>n</i> -Tetradecansäure        | 1748 | 228 | 45.45 | 0.2 |
| 48 | <i>n</i> -Pentadecansäure        | 1823 | 242 | 49.08 | 0.1 |
| 49 | Palmitoleinsäure                 | 1923 | 254 | 52.17 | 0.4 |
| 50 | <i>n</i> -Hexadecansäure         | 1958 | 256 | 52.63 | 0.3 |
| 51 | Linolsäuremethylester            | 2046 | 294 | 56.80 | +   |
| 52 | Methyloleat                      | 2082 | 296 | 57.11 | +   |
| 53 | Linolsäure                       | 2095 | 280 | 58.31 | 0.1 |

#### 4.1.7 *Stereum hirsutum*

*Stereum hirsutum* besitzt einen ledrig, elastisch-zähen, halbrunden bis fächerförmigen Fruchtkörper. Er steht bis 3 cm vom Substrat ab, läuft am Substrat herab oder liegt resupinat auf der Unterseite des Substrats an. Die Fruchtkörper wachsen rasig-dachziegelig, sie sind oft seitlich verwachsen und bilden wellig-geschwungene Reihen, dabei überziehen sie ganze Äste und Stämme. Die Oberseite ist zottig-striegelig, konzentrisch gezont, gelborange und gelbbraun. Die Unterseite mit einem Hymenium frisch lebhaft ockerfarben bis gelborange. Der Hutrand ist zur Wachstumszeit geblich-orange. Das Fleisch ist dünn, zäh und hellbräunlich. Der Pilz kommt ganzjährig an totem berindetem oder unberindetem Holz vor, besonders an Stämmen von Eiche, Rotbuche und anderen Laubhölzern (Weißfäuleerreger).

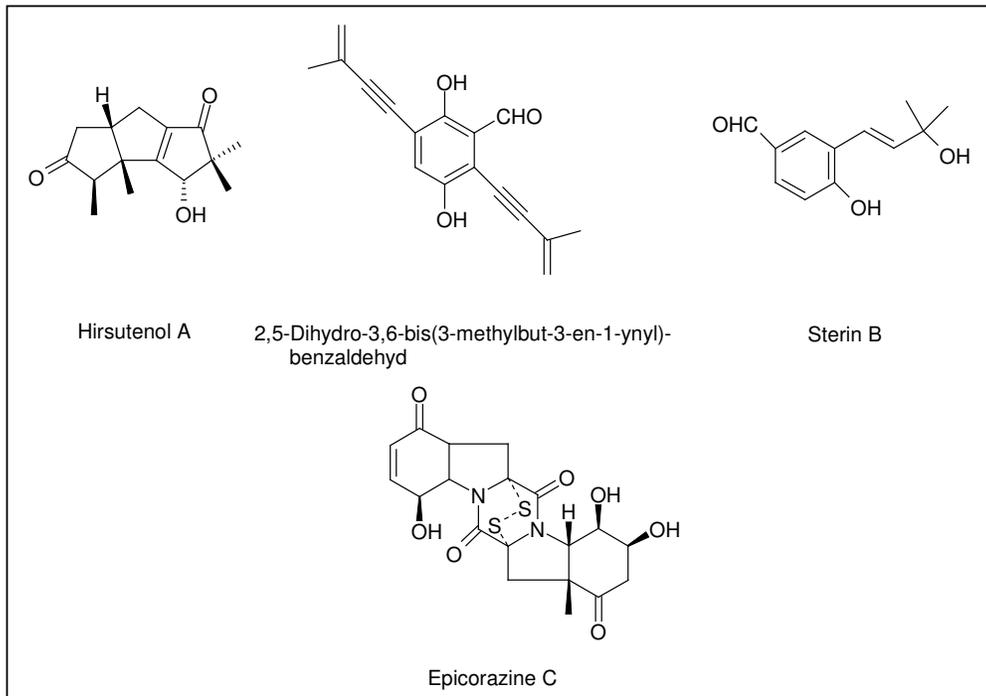
Synonyme: - <sup>[27]</sup>

Aus diesem Pilz wurden einige Aromaten mit Alkinylseitenketten, tricyclische Sesquiterpene, Fettsäuren, Antioxidantien und eine Diketopiperazin isoliert (Abb. 4-65) <sup>[90-94]</sup>.



Abb. 4-64 *Stereum hirsutum* (Willd.)  
Pers.

Foto: © A. J. Silverside <sup>[95]</sup>

Abb. 4-65 Einige isolierte Substanzen aus *Stereum hirsutum*

#### 4.1.7.1 Flüchtige Inhaltsstoffe

*Stereum hirsutum* war, was flüchtige Substanzen anbetrifft, Gegenstand einiger Untersuchungen. Aquino et al.<sup>[92]</sup> identifizierten einige freie Fettsäuren wie *n*-Hexadecansäure, Palmitoleinsäure, Ölsäure und Linolsäure. In Abschnitt 4.1.7 wurden bereits einige identifizierte bzw. isolierte flüchtige Substanzen aus diesem Pilz besprochen. Zur Zusammensetzung des ätherischen Öls gibt es bisher keine Informationen. Wie man aus Tabelle 4-6 entnehmen kann, stellt (*E,E*)-2,4-Decadienal mit 24.4% die Hauptkomponente dar. Mit 7.6% ist (*Z,Z*)-2,4-Decadienal die zweite Hauptkomponente, gefolgt von 1-Hepten-3-on (6.6%), Pentylfuran (6.5%) und (*E*)-2-Octenal (5.6%).

6-Methyl-5-hepten-2-on wurde bereits aus dem bodenbewohnenden Basidiomyceten *Suillus grevillei* identifiziert<sup>[96]</sup>.

(*Z*)-Asaron und  $\beta$ -Ionon konnten hier zum ersten Mal als flüchtige Inhaltsstoffe von Pilzen identifiziert werden (Abb. 4-66).

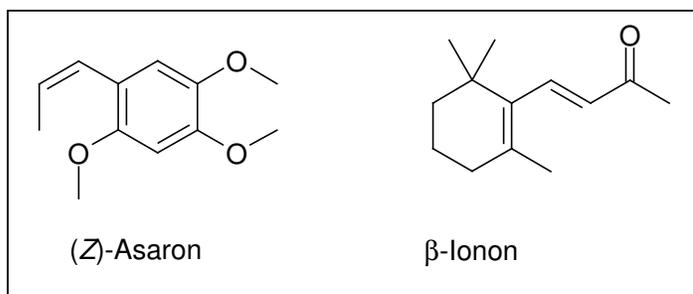
Abb. 4-66 Flüchtige Substanzen aus *S. hirsutum*

Abbildung 4-67 zeigt das GC-FID-Chromatogramm. Die Substanzen wurden anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert<sup>[41]</sup>.

Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-15 aufgeführt. Für die Substanzen, die in Mengen unter 0.1% vorliegen, werden keine Retentionszeiten im GC-FID angegeben.

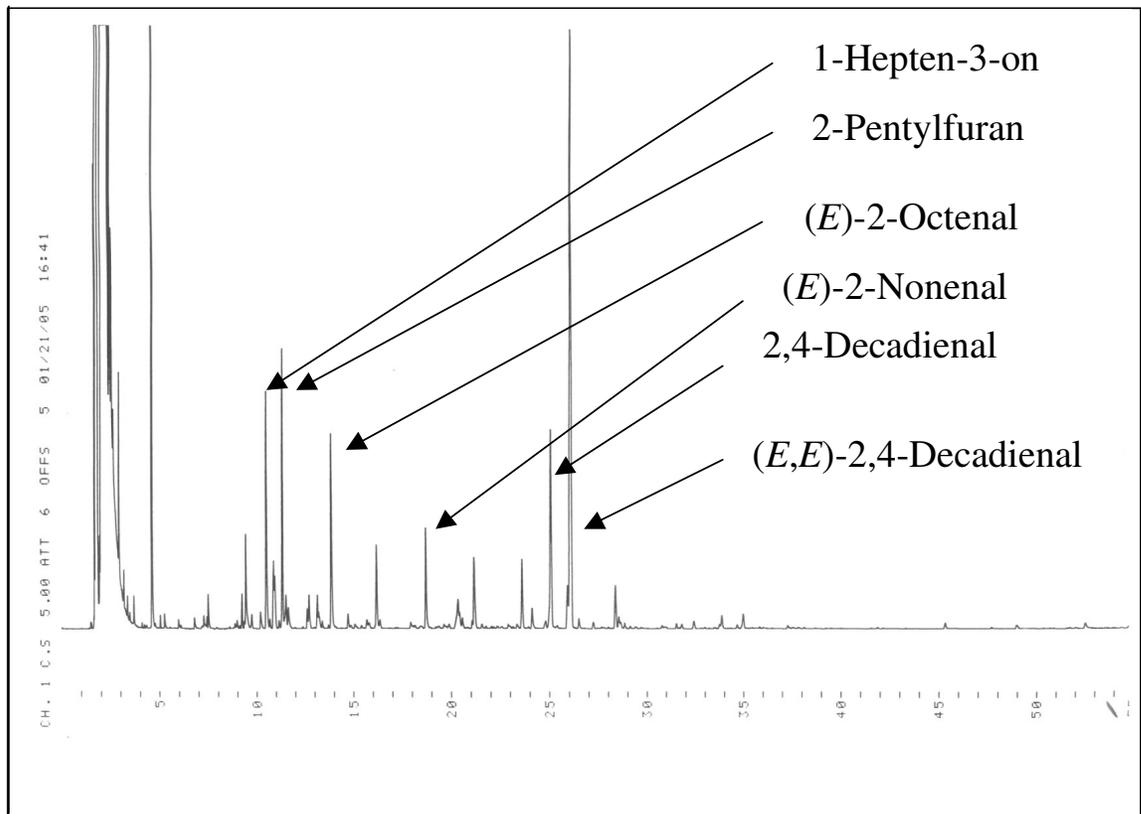


Abb.4-67 GC-FID-Chromatogramm des ätherischen Öls von *Stereum hirsutum*

Tabelle 4-15 Flüchtige Substanzen und deren prozentuale Anteile aus *S. hirsutum*

\* Kováts-Index

\*\* Relativer prozentualer Anteil der flüchtigen Substanzen basierend auf GC-FID; mit + markierte Substanzen sind in einer Menge kleiner als 0.1% enthalten

| Peak No. | Substanz               | GC-MS |                | GC-FID         |     |
|----------|------------------------|-------|----------------|----------------|-----|
|          |                        | KI*   | M <sup>+</sup> | R <sub>t</sub> | %** |
| 1        | 2-Heptanon             | 871   | 114            |                | +   |
| 2        | (E)-2-Heptenal         | 942   | 112            | 9.43           | 2.7 |
| 3        | Camphen                | 950   | 136            |                | +   |
| 4        | 1-Hepten-3-on          | 956   | 112            | 10.48          | 6.6 |
| 5        | 6-Methyl-5-hepten-2-on | 978   | 126            | 10.86          | 1.9 |
| 6        | 3-Octanon              | 969   | 128            | 10.93          | 1.5 |
| 7        | 2-Octanon              | 964   | 128            |                | +   |
| 8        | β-Pinen                | 978   | 136            |                | +   |
| 9        | 2-Pentylfuran          | 981   | 138            | 11.31          | 6.5 |
| 10       | Δ 3-Caren              | 1010  | 136            |                | +   |
| 11       | m-Cymen                | 1013  | 134            |                | +   |
| 12       | Limonen                | 1025  | 136            |                | +   |
| 13       | (E)-2-Octenal          | 1034  | 126            | 13.85          | 5.6 |
| 14       | 2-Nonanon              | 1074  | 142            |                | +   |

|    |                               |      |     |       |      |
|----|-------------------------------|------|-----|-------|------|
| 15 | <i>n</i> -Nonanal             | 1076 | 142 | 16.16 | 2.5  |
| 16 | Campher                       | 1123 | 152 |       | +    |
| 17 | ( <i>E</i> )-2-Nonenal        | 1139 | 140 |       | +    |
| 18 | <i>n</i> -Nonanol             | 1149 | 144 |       | +    |
| 19 | 2,4-Nonadienal                | 1170 | 138 |       | +    |
| 20 | $\alpha$ -Terpineol           | 1176 | 154 |       | +    |
| 21 | <i>n</i> -Decanal             | 1180 | 156 |       | +    |
| 22 | ( <i>E,E</i> )-2,4-Nonadienal | 1188 | 138 | 21.16 | 2.7  |
| 23 | $\beta$ -Cyclocitral          | 1195 | 152 |       | +    |
| 24 | ( <i>E</i> )-2-Decenal        | 1240 | 154 | 23.61 | 2.2  |
| 25 | 2,4-Decadienal                | 1270 | 152 | 25.09 | 7.6  |
| 26 | ( <i>E,E</i> )-2,4-Decadienal | 1291 | 152 | 26.12 | 24.4 |
| 27 | (+)-Himalacha-2,4-dien        | 1433 | 204 |       | +    |
| 28 | $\beta$ -Ionon                | 1468 | 192 |       | +    |
| 29 | <i>z</i> -Asaron              | 1584 | 208 |       | +    |

#### 4.1.8 *Ganoderma applanatum*

Der Fruchtkörper ist rundlich bis nierenförmig, bis 30 cm breit, 2-5 cm dick (Anwachsstelle) und 4-15 cm vom Holz abstehend. Einzeln oder dachziegelig über- und nebeneinander wachsend. Die Oberseite ist konzentrisch gefurcht oder unregelmäßig höckerig, matt. Junge Fruchtkörper haben eine hellbraune Farbe. Sporenreif sind sie mit einem rostbraunen Staub bedeckt. Alte Fruchtkörper sind graubraun gefärbt. Während des Wachstumsstadiums ist der Rand weiß gefärbt. Der ganzjährig an Laubhölzern, selten Nadelhölzern vorkommt. Es handelt sich hier um einen Weißfäuleerreger.

Synonyme: *Ganoderma lipisiense* (Batch: Pers.) Atk. <sup>[27]</sup>

Einige flüchtige Komponenten konnten bereits identifiziert werden. Abraham und Berger <sup>[97]</sup> konnten einige Alkohole (z.B. 2-Methyl-1-propanol), Ketone (z.B. 1-Phenylethanon) und Monoterpene (z.B. Linalool) identifizieren. Fäldt et al. <sup>[98]</sup> konnten 1-Octen-3-ol und 3-Octanon mittels Headspace-Analysen am lebenden Fruchtkörper identifizieren. Außerdem konnte eine Vielzahl von Triterpenen isoliert werden. Viele auch in *Ganoderma lucidum* enthaltene Triterpene, wie die zuvor genannten Ganoderische-Säuren, wurden isoliert. Die sogenannten Applanoxidische-Säuren wurden aus *Ganoderma applanatum* isoliert (Abb. 4-69) <sup>[99], [100]</sup>.



Abb. 4-68 *Ganoderma applanatum*  
(Pers.:Wallr.) Pat.

Foto: © Nathan Wilson <sup>[101]</sup>

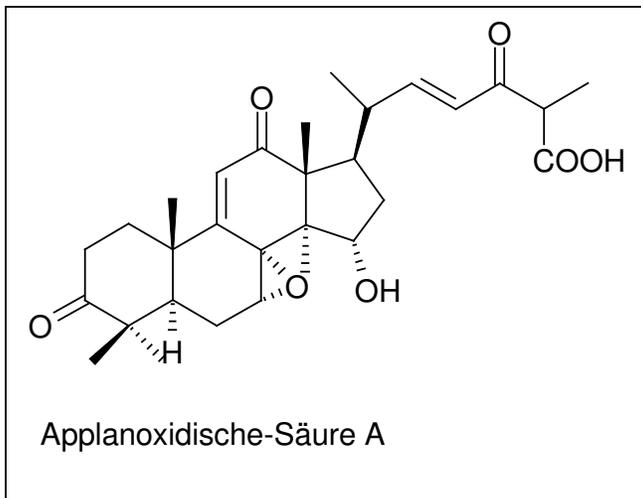


Abb. 4-69 Ein aus *Ganoderma applanatum* isoliertes Triterpen

#### 4.1.8.1 Flüchtige Inhaltsstoffe

Im ätherischen Öl von *Ganoderma applanatum* ist *R*-(-)-1-Octen-3-ol die Hauptkomponente mit 15.7%. Weitere Hauptkomponenten sind Phenylacetaldehyd (15.4%), (*E,E*)-2,4-Decadienal (7.4%), (*E*)-2-Octenal (7.2%) und (*E*)-2-Nonenal (5.1%).

Abbildung 4-70 zeigt das GC-FID-Chromatogramm. Die Substanzen wurden anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert<sup>[41]</sup>.

Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-16 aufgeführt. Für die Substanzen, die in Mengen unter 0.1% vorliegen, werden keine Retentionszeiten im CG-FID angegeben.

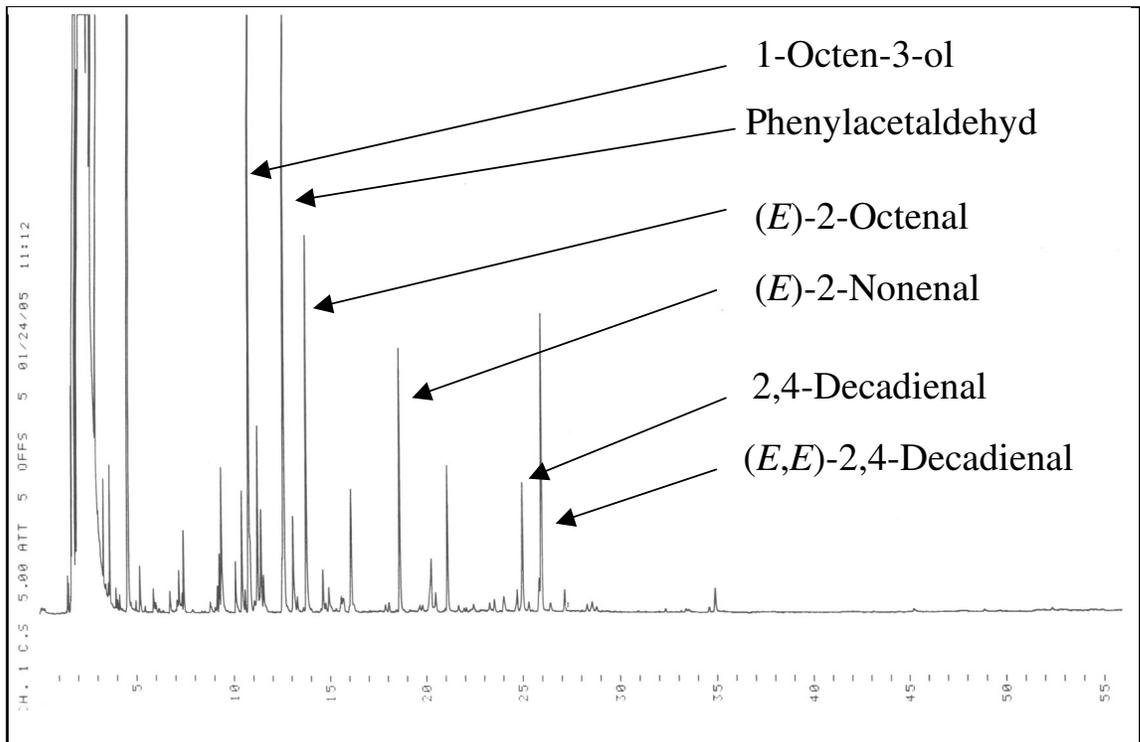


Abb. 4-70 GC-FID-Chromatogramm des ätherischen Öls von *Ganoderma applanatum*Tabelle 4-16 Flüchtige Substanzen und deren prozentuale Anteile aus *G. applanatum*

\* Kováts-Index

\*\* Relativer prozentualer Anteil der flüchtigen Substanzen basierend auf GC-FID; mit + markierte Substanzen sind in einer Menge kleiner als 0.1% enthalten

| Peak No. | Substanz                         | GC-MS |                | GC-FID         |      |
|----------|----------------------------------|-------|----------------|----------------|------|
|          |                                  | KI*   | M <sup>+</sup> | R <sub>t</sub> | %**  |
| 1        | 2-Heptanon                       | 871   | 114            | 7.14           | 0.9  |
| 2        | <i>n</i> -Heptanal               | 882   | 114            | 7.38           | 1.2  |
| 3        | α-Fenchon                        | 941   | 136            | 9.23           | 1.0  |
| 4        | ( <i>E</i> )-2-Heptenal          | 942   | 112            | 9.32           | 3.4  |
| 5        | 1-Hepten-3-on                    | 956   | 112            | 10.38          | 2.1  |
| 6        | <i>R</i> (-)-1-Octen-3-ol        | 962   | 128            | 10.73          | 15.7 |
|          | <i>S</i> (+)-1-Octen-3-ol        |       |                |                | 1.6  |
| 7        | 3-Octanon                        | 969   | 128            |                | +    |
| 8        | 2-Octanon                        | 964   | 128            |                | +    |
| 9        | <i>n</i> -Octanal                | 981   | 128            | 11.19          | 3.7  |
| 10       | 2-Pentylfuran                    | 981   | 138            | 11.37          | 2.1  |
| 11       | 5-Ethylcyclopenten-1-carbaldehyd | 1010  | 124            |                | +    |
| 12       | Phenylacetaldehyd                | 1012  | 120            | 12.54          | 15.4 |
| 13       | ( <i>E</i> )-2-Octenal           | 1034  | 126            | 13.72          | 7.2  |
| 14       | 2-Nonanon                        | 1074  | 142            |                | +    |
| 15       | <i>n</i> -Nonanal                | 1076  | 142            | 16.05          | 3.3  |
| 16       | ( <i>E</i> )-2-Nonenal           | 1139  | 140            | 18.58          | 5.1  |
| 17       | 2,4-Nonadienal                   | 1170  | 138            | 20.24          | 2.0  |
| 18       | 2-Decanon                        | 1176  | 156            | 20.45          | 0.7  |
| 19       | ( <i>E,E</i> )-2,4-Nonadienal    | 1188  | 138            | 21.07          | 3.2  |
| 20       | ( <i>E</i> )-2-Decenal           | 1240  | 154            |                | +    |
| 21       | 2,4-Decadienal                   | 1270  | 152            | 24.97          | 3.1  |
| 22       | ( <i>E,E</i> )-2,4-Decadienal    | 1291  | 152            | 25.95          | 7.4  |

#### 4.1.9 *Pycnoporus cinnabarinus*

Der Fruchtkörper ist konsolenförmig, halbrund bis fächerförmig, 2-10 cm breit am Holz angewachsen, 0.5-2 cm dick und 2-6 cm vom Substrat abgehend. Die Oberfläche ist runzelig uneben, höckerig, bisweilen undeutlich konzentrisch gezont und frisch lebhaft orange-zinnoberrot (Farbstoff: Cinnabarin<sup>[102]</sup>; Abb. 4-72). Der Pilz kommt ganzjährig an Stümpfen und auf toten Ästen und Stämmen vieler Laubholzarten (Weißfäuleerreger) vor, aber sehr selten an Nadelholz. Der Zinnoberschwamm ist eine lichtliebende Art und wächst gern an sonnenexponierten Standorten.

Synonyme: -<sup>[27]</sup>



Abb. 4-71 *Pycnoporus cinnabarinus*  
(Jacq.: Fr.) Karst.

Foto: © Raymond Boyer<sup>[103]</sup>

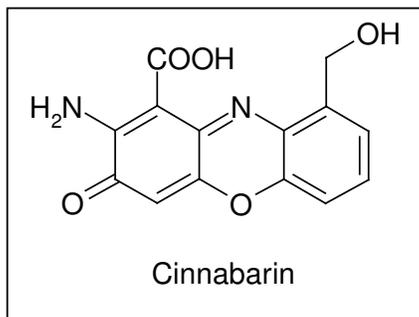


Abb. 4-72 Isolierte Substanz aus *Pycnoporus cinnabarinus*

#### 4.1.9.1 Flüchtige Inhaltsstoffe

2-Pentylfuran ist die Hauptkomponente (9.2%) des ätherischen Öls von *Pycnoporus cinnabarinus*. Man findet auch mit 7.6% (*E*)- $\beta$ -Farnesen, mit 5.2% *R*-(-)-1-Octen-3-ol, mit 5.9% *n*-Octansäure und mit 3.4% (*E*)-2-Octenal.

Tricyclen, Dodecanal und (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen sind bisher noch nicht in Pilzen identifiziert worden (Abb. 4-73).

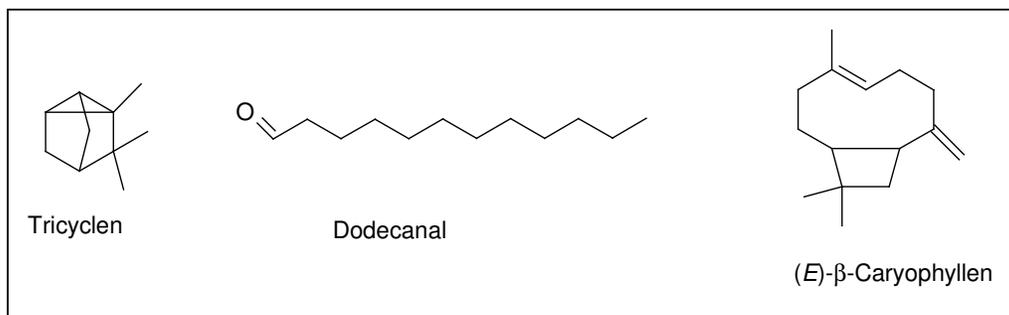


Abb. 4-73 Flüchtige Substanzen aus *P. cinnabarinus*

Abbildung 4-74 zeigt das GC-FID-Chromatogramm. Die Substanzen wurden anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert<sup>[41]</sup>.

Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-17 aufgeführt. Für die Substanzen, die in Mengen unter 0.1% vorliegen, werden keine Retentionszeiten im CG-FID angegeben.

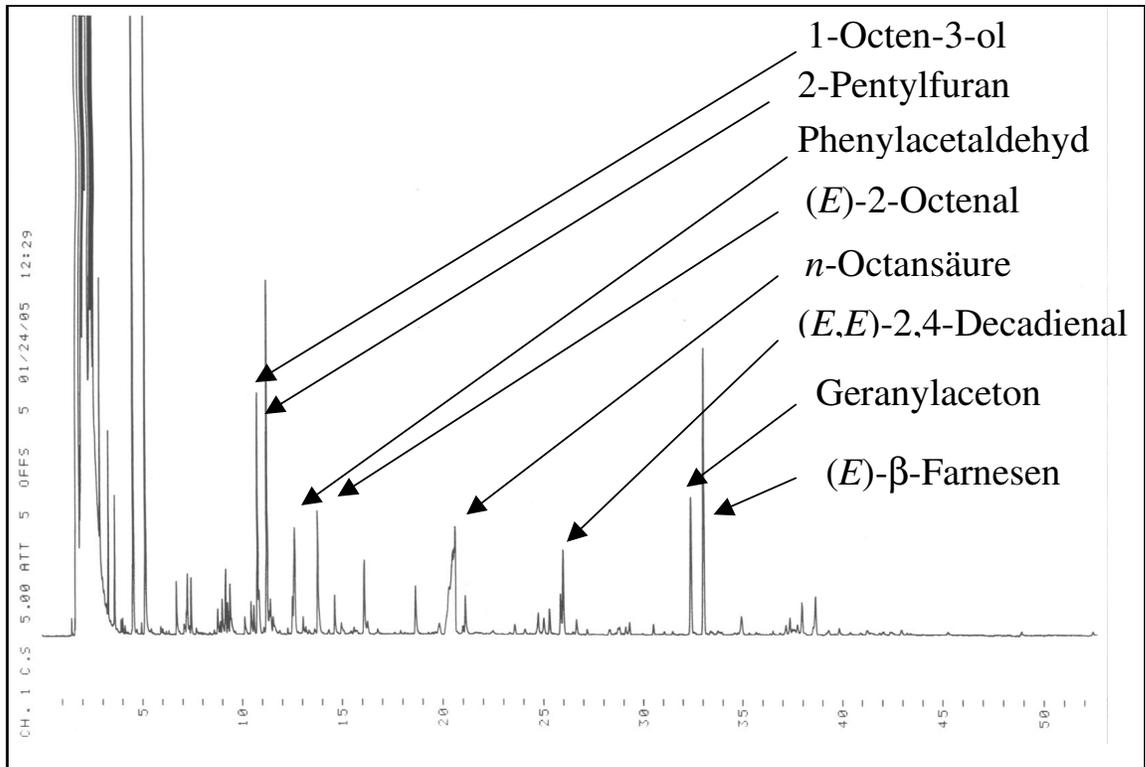


Abb. 4-74 GC-FID-Chromatogramm des ätherischen Öls von *Pycnoporus cinnabarinus*

Tabelle 4-17 Flüchtige Substanzen und deren prozentualen Anteile aus *P. cinnabarinus*

\* Kováts-Index

\*\* Relativer prozentualer Anteil der flüchtigen Substanzen basierend auf GC-FID; mit + markierte Substanzen sind in einer Menge kleiner als 0.1% enthalten

| Peak No. | Substanz                         | GC-MS |                | GC-FID<br>R <sub>t</sub> | %** |
|----------|----------------------------------|-------|----------------|--------------------------|-----|
|          |                                  | KI*   | M <sup>+</sup> |                          |     |
| 1        | 2-Heptanon                       | 871   | 114            |                          | +   |
| 3        | Tricyclen                        | 927   | 136            | 8.98                     | 0.8 |
| 4        | α-Pinen                          | 936   | 136            | 9.37                     | 1.5 |
| 5        | 1-Hepten-3-on                    | 956   | 112            | 10.42                    | 0.8 |
| 6        | R(-)-1-Octen-3-ol                | 962   | 128            | 10.74                    | 5.2 |
|          | S(+)-1-Octen-3-ol                |       |                |                          | 0.6 |
| 7        | 3-Octanon                        | 969   | 128            | 10.82                    | 0.4 |
| 8        | 2-Octanon                        | 964   | 128            |                          | +   |
| 9        | Sabinen                          | 973   | 136            |                          | +   |
| 10       | 2-Pentylfuran                    | 981   | 138            | 11.21                    | 9.2 |
| 11       | n-Octanal                        | 981   | 128            |                          | +   |
| 12       | p-Methylanisol                   | 1004  | 122            |                          | +   |
| 13       | Δ 3-Caren                        | 1010  | 136            |                          | +   |
| 14       | 5-Ethylcyclopenten-1-carbaldehyd | 1010  | 124            |                          | +   |
| 15       | Phenylacetaldehyd                | 1012  | 120            | 12.59                    | 3.6 |
| 16       | m-Cymen                          | 1013  | 134            |                          | +   |
| 17       | Limonen                          | 1025  | 136            |                          | +   |
| 18       | (E)-2-Octenal                    | 1034  | 126            | 13.75                    | 3.4 |
| 19       | 2-Nonanon                        | 1074  | 142            |                          | +   |

|    |                                    |      |     |       |     |
|----|------------------------------------|------|-----|-------|-----|
| 20 | <i>n</i> -Nonanal                  | 1076 | 142 | 16.09 | 2.1 |
| 21 | $\alpha$ -Thujon                   | 1089 |     |       | +   |
| 22 | ( <i>E</i> )-2-Nonenal             | 1139 | 140 | 18.63 | 1.3 |
| 23 | <i>n</i> -Octansäure               | 1156 | 144 | 20.49 | 3.8 |
| 24 | ( <i>E,E</i> )-2,4-Nonadienal      | 1188 | 138 | 21.11 | 1.1 |
| 25 | ( <i>E</i> )-2-Decenal             | 1240 | 154 | 23.57 | 0.3 |
| 26 | <i>n</i> -Nonansäure               | 1263 | 158 | 24.74 | 0.7 |
| 27 | 2,4-Decadienal                     | 1270 | 152 | 25.06 | 0.5 |
| 28 | 2-Undecanon                        | 1273 | 170 | 25.30 | 0.7 |
| 29 | ( <i>E,E</i> )-2,4-Decadienal      | 1291 | 152 | 25.98 | 2.3 |
| 30 | Dodecanal                          | 1389 | 184 |       | +   |
| 31 | $\alpha$ -Barbaten                 | 1414 | 204 |       | +   |
| 32 | Isocaryophyllen                    | 1409 | 204 |       | +   |
| 33 | $\beta$ -Duprezianen               | 1423 | 204 |       | +   |
| 34 | Geranylaceton                      | 1430 | 194 | 32.38 | 4.5 |
| 35 | Isobazzanen                        | 1442 | 204 |       | +   |
| 36 | ( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesen    | 1446 | 204 | 33.03 | 7.6 |
| 37 | $\beta$ -Acoradien                 | 1465 | 204 |       | +   |
| 38 | <i>ar</i> -Curcumen                | 1473 | 202 |       | +   |
| 39 | ( <i>E,Z</i> )- $\alpha$ -Farnesen | 1475 | 204 |       | +   |
| 40 | ( <i>E</i> )-Nerolidol             | 1553 | 222 |       | +   |
| 41 | ( <i>E</i> )-Dendrolasin           | 1566 | 218 | 37.95 | 1.2 |
| 43 | <i>n</i> -Heptadecan               | 1700 | 240 |       | +   |
| 44 | <i>n</i> -Pentadecansäure          | 1823 | 242 |       | +   |
| 45 | <i>n</i> -Hexadecansäure           | 1951 | 256 |       | +   |

#### 4.1.10 *Spongiporus caesius*

Der Fruchtkörper ist halbrund, 2-6 cm breit, 0.5-1 cm dick. Die Oberseite ist zottig. Junge Fruchtkörper sind weißlich, ältere bläulich. Das Fleisch ist weich und weißbläulich. Kommt ganzjährig an Stümpfen und toten Stämmen von Nadel (Braunfäuleerreger), selten Laubholz, meist an Fichte vor. Der Piklz hat Ähnlichkeit mit dem vorzugsweise an toten Ästen der Rotbuche wachsenden *Spongiporus subcaesius* (Fastblauer Saftporling).

Synonyme: - *Postia caesia* (Schrad.: Fr.) Karst.

- *Oligoporus caesius* (Schrad.: Fr.) Gilbert. & Ryv. <sup>[27]</sup>

Früher wurden 3-Heptanon, 6-Methylheptan-3-on, 1-Octen-3-ol und Methyl2,4-dihydroxybenzoat identifiziert <sup>[104]</sup>.



Abb. 4-75 *Spongiporus caesius*  
(Schrad.: Fr.) David  
Foto: © Johan Duinkerken <sup>[105]</sup>

#### 4.1.10.1 Flüchtige Inhaltsstoffe

Bei der Untersuchung des ätherischen Öls von *Spongiporus caesius* (Tabelle 4-9) konnte die Hauptkomponente nicht identifiziert werden. Ihr prozentualer Anteil beträgt 27,9%. Sie zeigt einen Molpeak bei 204  $m/z$  und einen Basispeak bei 71  $m/z$  (Abb. 4-76). Obwohl der Basispeak nicht eindeutig einem Fragment zugeordnet werden konnte, weisen weitere Fragmentierungen Ähnlichkeiten mit dem des Sesquiterpenkohlenwasserstoffs (*Z*)- $\alpha$ -Bisabolen auf. So ist das Fragmentation 109  $m/z$  ebenfalls bei der unbekannt Substanz vorhanden, was auf eine Allylsplaltung bei (*Z*)- $\alpha$ -Bisabolen hindeutet ( $[M-C_7H_{11}]^+$ ). Auch das Fragmentation 93  $m/z$ , welches bei (*Z*)- $\alpha$ -Bisabolen den Basispeak darstellt <sup>[106]</sup>, ist deutlich sichtbar und hat die zweithöchste Intensität nach 71  $m/z$ . Es handelt sich hier möglicherweise um einen Bisabolen-Sesquiterpenkohlenwasserstoff, der strukturelle Gemeinsamkeiten mit (*Z*)- $\alpha$ -Bisabolen besitzt.

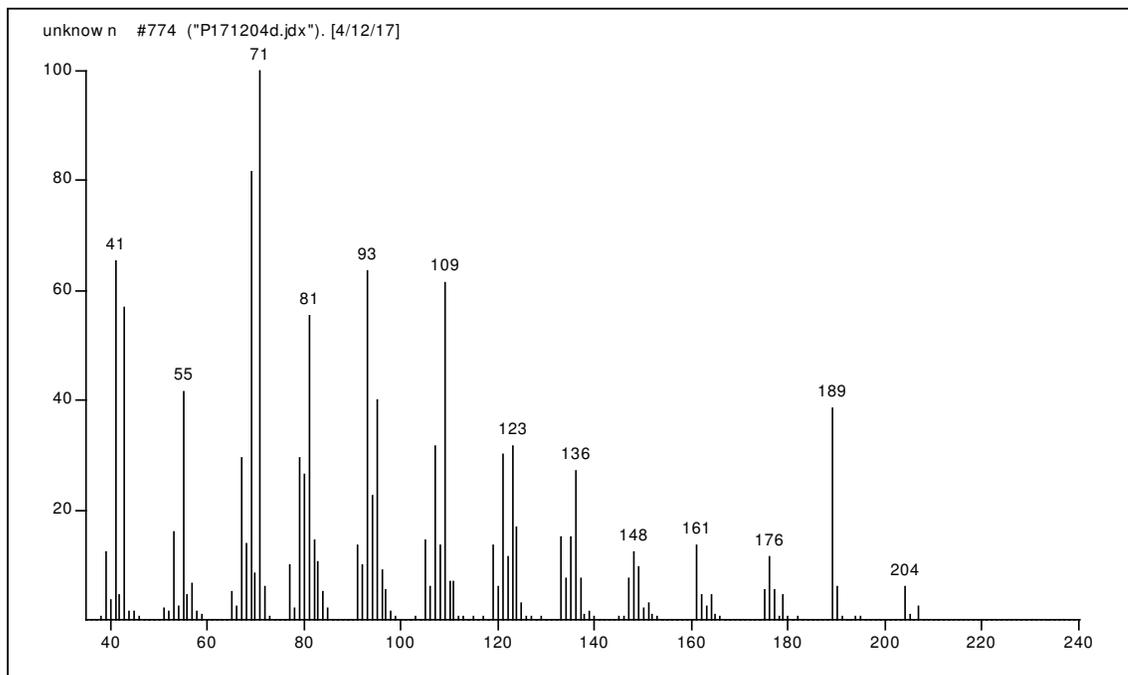


Abb. 4-76 Massenspektrum der Hauptkomponente im Öl von *S. caesius*

Die zweite Hauptkomponente ist Striatol (s. Abb. 4-80), mit einem Anteil von 16,5%.

Die dritte Hauptkomponente ist ebenfalls eine unbekannt Substanz, mit einem Anteil von 4,1% des ätherischen Öls. Man erkennt im Massenspektrum der Substanz den Basispeak mit 109  $m/z$  (Abb. 4-77), der bei Eudesm-3-en-6-ol (Abb. 4-78) ebenfalls sichtbar ist. Bei Eudesm-3-en-6-ol ist das Fragmentation das Ergebnis des Verlustes von Wasser (Abb. 4-78), der Isopropylgruppe und einer anschließender Retro-Diels-Alder-Fragmentierung. Des Weiteren erkennt man, dass das erste Fragmentation bei Eudesm-3-en-6-ol aus einer Wasserabspaltung stammt ( $[M-H_2O]^+$ ). Das zweite Fragmentation stammt hingegen aus dem Verlust einer Methylgruppe.

Bei der unbekannt Substanz ist die Reihenfolge der Fragmentierung vertauscht. Die unbekannt Substanz spaltet erst eine Methylgruppe ab und danach Wasser. Die Hydroxylgruppe in der unbekannt Substanz muß also eine sterisch ungünstigere Position

besitzen. Es handelt sich hier möglicherweise um ein oxygeniertes Eudesman-Sesquiterpen, dass strukturelle Gemeinsamkeiten mit Eudesm-3-en-6-ol (Abb. 4-79) besitzt.

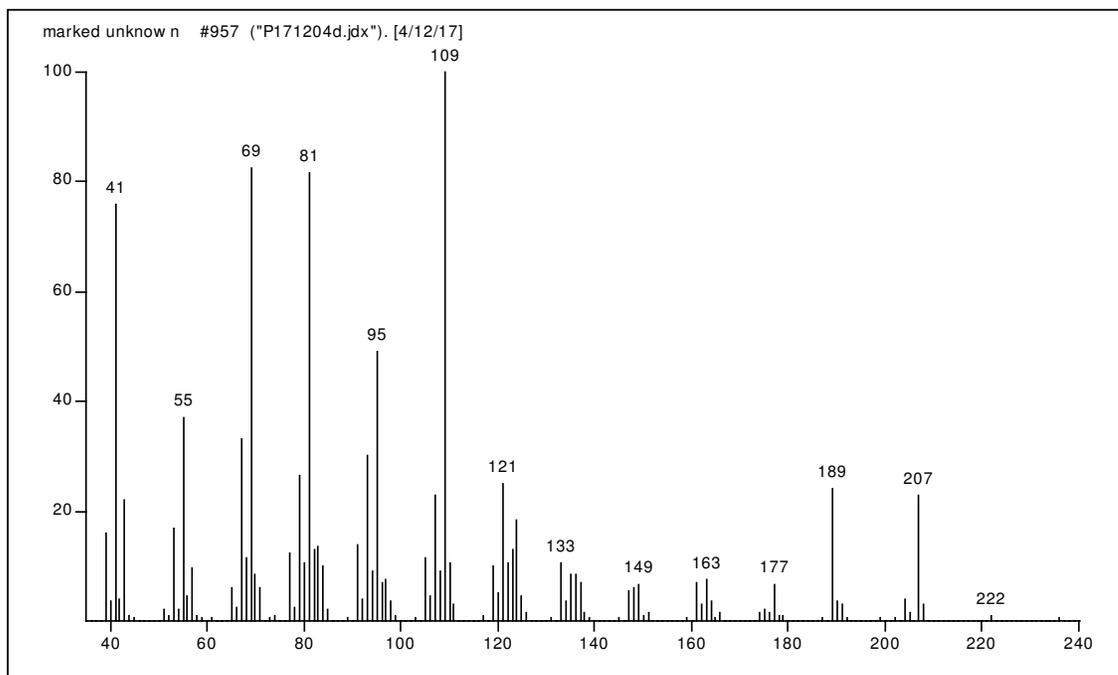


Abb. 4-77 Massenspektrum der dritten Hauptkomponente im Öl von *S. caesius*

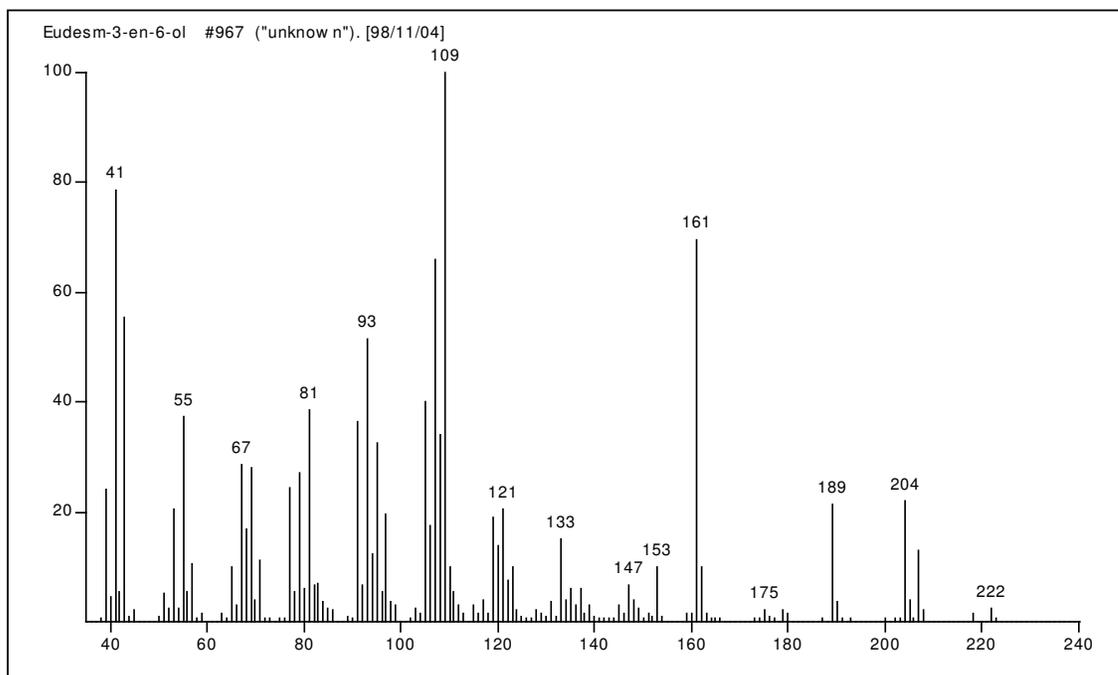


Abb. 4-78 Massenspektrum von Eudesm-3-en-6-ol

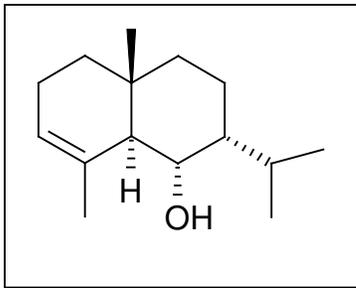


Abb. 4-79 Eudesm-3-en-6-ol

Mit 2.8% findet man *R*-(-)-1-Octen-3-ol als eine der Hauptkomponenten.

Identifizierte Substanzen, die zum ersten Mal in Pilzen identifiziert wurden sind  $\alpha$ -Chamingren, Isobornylacetat und Striatol (Abb. 4-80).

Die unbekannt Substanzen konnten aufgrund der geringen Menge an Pilzmaterial nicht isoliert werden.

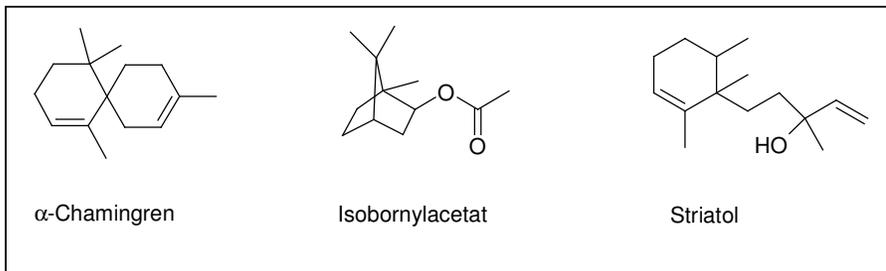
Abb. 4-80 Flüchtige Substanzen aus *S. caesius*

Abbildung 4-81 zeigt das GC-FID-Chromatogramm. Die Substanzen wurden anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert<sup>[41]</sup>.

Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-18 aufgeführt. Für die Substanzen, die in Mengen unter 0.1% vorliegen, werden keine Retentionszeiten im CG-FID angegeben.

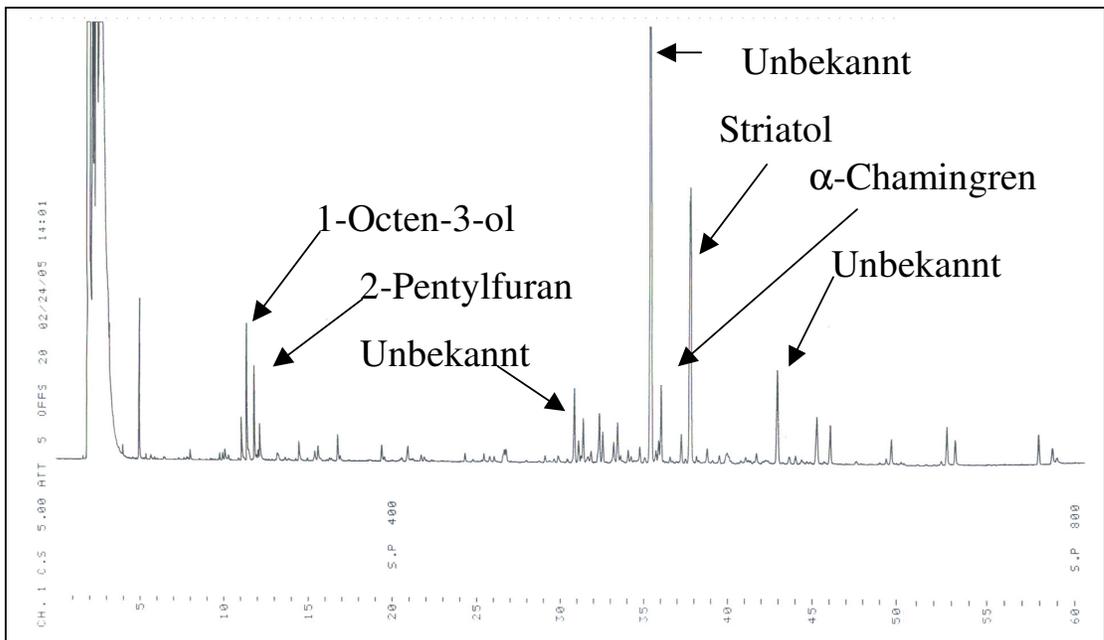
Abb. 4-81 GC-FID-Chromatogramm des ätherischen Öls von *Spongiporus caesius*

Tabelle 4-18 Flüchtige Substanzen und deren prozentuale Anteile aus *S. caesius*

\* Kováts-Index

\*\* Relativer prozentualer Anteil der flüchtigen Substanzen basierend auf GC-FID; mit + markierte Substanzen sind in einer Menge kleiner als 0.1% enthalten

| Peak No. | Substanz                         | GC-MS |                | GC-FID         |      |
|----------|----------------------------------|-------|----------------|----------------|------|
|          |                                  | KI*   | M <sup>+</sup> | R <sub>t</sub> | %**  |
| 1        | <i>n</i> -Nonan                  | 906   | 128            |                | +    |
| 2        | $\alpha$ -Pinen                  | 936   | 136            |                | +    |
| 3        | ( <i>E</i> )-2-Heptenal          | 942   | 112            |                | +    |
| 4        | Camphen                          | 950   | 136            |                | +    |
| 5        | 1-Hepten-3-on                    | 956   | 112            | 11.01          | 1.1  |
| 6        | <i>R</i> (-)-1-Octen-3-ol        | 962   | 128            | 11.34          | 2.8  |
|          | <i>S</i> (+)-1-Octen-3-ol        |       |                |                | 0.7  |
| 7        | 2-Pentylfuran                    | 981   | 138            | 11.79          | 2.3  |
| 8        | 5-Ethylcyclopenten-1-carbaldehyd | 1010  | 124            |                | +    |
| 9        | <i>p</i> -Cymen                  | 1015  | 134            |                | +    |
| 10       | Limonen                          | 1025  | 136            |                | +    |
| 11       | ( <i>E</i> )-2-Octenal           | 1034  | 126            | 14.46          | 0.7  |
| 12       | <i>n</i> -Nonanal                | 1076  | 142            | 16.76          | 0.8  |
| 13       | <i>n</i> -Undecan                | 1100  | 156            |                | +    |
| 14       | ( <i>E</i> )-2-Nonenal           | 1139  | 154            | 19.38          | 0.6  |
| 15       | <i>n</i> -Nonanol                | 1149  | 144            |                | +    |
| 16       | Terpinene-4-ol                   | 1164  | 154            |                | +    |
| 17       | <i>n</i> -Decanal                | 1180  | 156            | 21.73          | 0.2  |
| 18       | Isobornylacetat                  | 1276  | 196            |                | +    |
| 19       | 2-Undecanon                      | 1273  | 152            |                | +    |
| 20       | Undecanal                        | 1290  | 170            |                | +    |
| 21       | Unbekannt                        | 1392  |                | 30.85          | 2.6  |
| 22       | Sandvicen                        | 1399  | 204            | 31.38          | 1.5  |
| 23       | Unbekannt                        | 1424  |                | 32.34          | 2.0  |
| 24       | Cyclofarnesa-5(14),8,10-trien    | 1441  | 204            | 33.43          | 1.5  |
| 25       | Striaten                         | 1458  | 204            |                | +    |
| 26       | Unbekannt                        | 1490  | 204            | 35.41          | 27.9 |
| 27       | $\alpha$ -Chamigren              | 1503  | 204            | 36.02          | 2.6  |
| 28       | $\delta$ -Cadinen                | 1520  | 204            |                | +    |
| 29       | Striatol                         | 1550  | 222            | 37.23          | 16.5 |
| 30       | Unbekannt                        | 1669  | 222            | 42.93          | 4.1  |
| 31       | <i>n</i> -Tetradecansäure        | 1748  | 228            |                | +    |
| 32       | <i>n</i> -Pentadecansäure        | 1823  | 242            | 49.72          | 1.1  |
| 33       | <i>n</i> -Hexadecansäure         | 1951  | 256            | 52.75          | 1.5  |
| 34       | Ölsäure                          | 2068  | 282            | 58.73          | 0.8  |

## 4.2 Biologische Tests

Wie schon in Abschnitt 1.1 besprochen, zeigten Triterpenoide (Triterpensäuren) von *Ganoderma lucidum* Aktivität gegen bestimmte Krebsarten und darüber hinaus gegen HIV<sup>[5]</sup>. Sterolperoxide besitzen (siehe Abschnitt 4.1.2.2.5) anticancerogene Eigenschaften gegen Lungen-, Eierstock-, Haut- und Dickdarmkrebs<sup>[61]</sup>.

Die Triterpensäure 5,24-Hydroxycucurbitadien-3 $\beta$ -ol-26-carbonsäure isoliert aus dem Basidiomyceten *Russula lepida*, besitzt fungizide Eigenschaften, besonders gegen niedere Pilze<sup>[107]</sup>.

Daher wurden die Substanzen Spongiporensäure A, Trametenolsäure B und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol auf antimikrobielle und anticancerogene (Leukämie und Mamma-Carzinom) Eigenschaften hin untersucht werden.

### 4.2.1 Agardiffusionstests

5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol, Trametenolsäure B und Spongiporensäure A wurden nach der Methode von Anke et al.<sup>[108]</sup> auf antimikrobielle Aktivität getestet.

In Tabelle 4-19 erkennt man, dass Trametenolsäure B und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol keine antimikrobielle Aktivität aufweisen.

Spongiporensäure A besitzt die stärkste Aktivität gegen das gram-negative Bakterium *P. vulgaris*. Man erkennt bei 10 $\mu$ g/Rondel einen Hemmhof von 9 mm, bei 50  $\mu$ g/Rondel sind es bereits 13 mm. Verglichen mit dem unter gleichen Bedingungen getesteten Antibiotikum Streptomycinsulfat, das bei 5 $\mu$ g/Rondel einen Hemmhof von 12 mm zeigte (Tab. 4-20), kann man von einer mittleren Aktivität von Spongiporensäure A sprechen. Die Substanz könnte evtl. als „Lead-Structure“ beim Einsatz gegen *P. vulgaris* von Interesse sein. Ein Hemmhof unter 9 mm wurde bei 5  $\mu$ g/Rondel bei den gram-positiven Stäbchen *B. subtilis* und *B. brevis* beobachtet. Bei 50 $\mu$ g/Rondel konnte man für *B. subtilis* und *B. brevis* Hemmhöfe von 10 respektive 11 $\mu$ g/Rondel feststellen. Verglichen mit Penicillin G, das unter gleichen Bedingungen getestet wurde, zeigte die Substanz recht schwache Wirkungen. Bei *B. brevis* und *B. subtilis* wurden bei einer Konzentration von 0.15  $\mu$ g/Rondel von Penicillin G Hemmhöfe von 12 mm beobachtet.

Beim Schimmelpilz *P. variotii* zeigte sich ein inkompletter Hemmhof von 12 mm bei 50 $\mu$ g/Rondel. Bei Amphotericin B wird jedoch schon bei 5  $\mu$ g/Rondel ein 10 mm Hemmhof beobachtet, somit ist die beobachtete Wirkung eine recht schwache.

Einen Hemmhof unter 9 mm wurde bei 50  $\mu$ g/Rondel von Spongiporensäure A bei *A. calcoaceticus* beobachtet. Auch hier kann man nur von einer geringen Wirkung sprechen, da im Vergleich Amphotericin B bei 5 $\mu$ g/Rondel ein Hemmhof von 10 mm aufweist.

Um feststellen zu können, ob bakterizide/bakteriostatische bzw. fungizide/fungistatische Aktivitäten vorliegen, muß als nächster Schritt die Minimale Hemmkonzentration mit Hilfe des Reihenverdünnungstests bestimmt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnte.

Tab. 4-19 Agardiffusionstests von Spongiporensäure A, Trametenolsäure B und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol

| Testorganismen                     | Agardiffusionstest Hemmhof (mm) bei $\mu\text{g/Rondell}$ |                  |                  |                  |                  |                  |
|------------------------------------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                    | 1   |                  | 2                |                  | 3                |                  |
|                                    | 50 $\mu\text{g}$  | 10 $\mu\text{g}$ | 50 $\mu\text{g}$ | 10 $\mu\text{g}$ | 50 $\mu\text{g}$ | 10 $\mu\text{g}$ |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | -   | -                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Proteus vulgaris</i>            | 13  | 9                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | +   | -                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Candida albicans</i>            | -   | -                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>       | -   | -                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Bacillus subtilis</i>           | 10  | +                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Bacillus brevis</i>             | 11  | +                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Micrococcus luteus</i>          | -   | -                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Enterobacter dissolvens</i>     | -   | -                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Penicillium notatum</i>         | -   | -                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Paecilomyces variotii</i>       | 12i   | -                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Mucor miehei</i>                | -   | -                | -                | -                | -                | -                |
| <i>Nematospora coryli</i>          | -   | -                | -                | -                | -                | -                |

1: Spongiporensäure A

2: Trametenolsäure B

3: 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol

## Kontrolle

Tab. 4-20 Agardiffusionstests mit bekannten antimikrobiellen Substanzen

| Organismus                         | Substanz           | Menge ( $\mu\text{g/Rondell}$ ) | Hemmhof (mm) |
|------------------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------|
| <i>Bacillus brevis</i>             | Penicillin G       | 0.15                            | 12           |
|                                    |                    | 0.25                            | 16           |
| <i>Bacillus subtilis</i>           |                    | 0.15                            | 12           |
|                                    |                    | 0.25                            | 16           |
| <i>Proteus vulgaris</i>            | Streptomycinsulfat | 5.0                             | 12           |
|                                    |                    | 10                              | 13           |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | Ampicillin         | 2.5                             | 7            |
|                                    |                    | 5.0                             | 10           |
| <i>Paecilomyces variotii</i>       | Amphotericin B     | 5.0                             | 10           |
|                                    |                    | 10                              | 13           |

Legende zu den Agardiffusionstests

+: Hemmhof &lt; 9 mm

i: Inkompletter Hemmhof

-: Kein Hemmhof

## 4.2.2 Cytotoxische Tests

Die Cytotox-Tests<sup>[109]</sup> von 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol wurden mit den Zelllinien Jurkat (Akute T-Zell Leukämie bei Menschen) und HeLa-S3 (Cervix Carcinom/Mamma-Carzinom bei Menschen) durchgeführt. Es wurden 1, 5, 10, 25 und 30  $\mu\text{g/ml}$  der Substanz eingesetzt. Man beobachtet bei den Jurkat Zellen bereits bei 5  $\mu\text{g/ml}$  eine Verringerung der Zellanzahl (Tab. 4-21) im Vergleich zur Kontrolle (Tab 4-23). Bei 10  $\mu\text{g/ml}$

ist die Zellzahl bei ca. 10% der Kontrolle. Bei 25 µg/ml gibt es keine Krebszellen mehr. Bei den HeLa-S3-Zellen, erkennt man bis 10 µg/ml keine nennenswerte Änderung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Erst ab 25 µg/ml hat sich die Zahl auf 10-15% im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Bei 30 µg/ml gibt es keine Krebszellen mehr. Somit betragen die IC<sub>90</sub>-Werte von 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3β-ol bei Jurkat Zellen 10 µg/ml und bei HeLa-S3-Zellen 25 µg/ml (Tab 4-22). Wenn man diese IC<sub>90</sub>-Werte mit den Werten der anti-cancerogenen Substanz Daunomycin vergleicht, erkennt man, dass Daunomycin im Vergleich zu 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3β-ol bei den Jurkat Zellen eine um Faktor 10 stärkere Aktivität besitzt (IC<sub>90</sub>: 1.0 µg/ml). Gegenüber den HeLa-S3-Zellen ist die Aktivität noch schwächer. Während der IC<sub>90</sub>-Wert von 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3β-ol bei 25 µg/ml liegt, beträgt der IC<sub>90</sub> Wert von Daunomycin bei 1.0 µg/ml. Man kann zusammenfassend sagen, dass 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3β-ol eine schwache anticancerogene Aktivität gegen Jurkat- und HeLa-S3-Zellen besitzt<sup>[110-112]</sup>. Spongiporensäure A und Trametenolsäure B zeigten keinerlei Aktivität gegen diese Zelllinien.

Tab. 4-21 Cytotox-Tests von 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3β-ol

| Cytotox-Test                       |        |   |    |    |    |         |   |    |       |    |
|------------------------------------|--------|---|----|----|----|---------|---|----|-------|----|
| Zellzahl relativ zur Kontrolle (%) |        |   |    |    |    |         |   |    |       |    |
|                                    | Jurkat |   |    |    |    | HeLa-S3 |   |    |       |    |
| Substanz (µg/ml)                   | 1      | 5 | 10 | 25 | 30 | 1       | 5 | 10 | 25    | 30 |
|                                    | -      | + | 10 | 0  | 0  | -       | - | -  | 10-15 | 0  |

Legende zu den Cytotox-Tests

+: Beginnende Beeinträchtigung

-: Keine Beeinträchtigung: 100% der Kontrolle

Tab. 4-22 IC<sub>90</sub> von 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3β-ol

| Cytotox µg/ml   |    |
|---|----|
| 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3β-ol |    |
| IC <sub>90</sub>                                      |    |
| Zelllinien  |    |
| Jurkat  | 10 |
| HeLa-S3   | 25 |

Positivkontrolle

Tab. 4-23 IC<sub>90</sub> von Daunomycin

| Zelllinie | IC <sub>50</sub> (µg/ml) | IC <sub>90</sub> (µg/ml) |
|-----------|--------------------------|--------------------------|
| Jurkat    | 0.5                      | 1.0                      |
| HeLa-S3   | 0.25                     | 1.0                      |

## 5 Zusammenfassung

Die Baumpilze *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.), *Spongiporus leucomallellus* (Murill) David, *Bjerkandera adusta* (Willd.: Fr.), *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr., *Schizophyllum commune* (Fr.: Fr.), *Datronia mollis* (Sommerf.: Fr.), *Stereum hirsutum* (Willd.), *Ganoderma applanatum* (Pers.: Wallr.) Pat., *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.: Fr.) Karst. und *Spongiporus caesius* (Schrad.: Fr.) David wurden auf flüchtige und nichtflüchtige Inhaltsstoffe hin untersucht. Die Identifizierung der flüchtigen Inhaltsstoffe erfolgte mittels GC-MS und GC-FID nach Gewinnung des ätherischen Öls durch Wasserdampfdestillation.

Identifizierung von nichtflüchtigen Komponenten aus *G. lucidum*, *S. leucomallellus*, *B. adusta* und *L. sulphureus* erfolgte durch säulenchromatographische Auftrennung des Rohextraktes und Gewinnung mehrerer Fraktionen an Kieselgel durch GC-FID und GC-MS nach Derivatisierung. Coinjektion mit Standardsubstanzen bestätigten die Ergebnisse.

Nach vorausgegangener Säulenchromatographie an Kieselgel von Lösungsmittelextrakten verschiedener Polarität wurden Substanzen mittels semi-präparativer HPLC an RP18- oder Normalphasensäulen bzw. mittels DC isoliert.

Die Strukturaufklärung einzelner Verbindungen erfolgte durch Massen-, IR- und ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie.

In den hier untersuchten Pilzen konnten 50 bislang als Pilzinhaltsstoffe bislang nicht bekannte flüchtige Substanzen identifiziert werden, von denen 17 erstmals als Inhaltsstoffe von Baumpilzen beschrieben werden.

Unter den 27 identifizierten bzw. isolierten nichtflüchtigen Substanzen sind 21 nicht aus der jeweiligen Spezies bekannt. Antimikrobielle und anticancerogene Aktivitäten von drei Substanzen konnten bestimmt werden. Darüber hinaus konnte die Zusammensetzung des ätherischen Öls von neun Baumpilzen zum ersten Mal angegeben werden.

Aus dem Baumpilz *G. lucidum* wurden vier Steroidester isoliert. Es handelt sich um Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpalmitat, Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -yllinoleat, Ergosta-7en-3 $\beta$ -yllinoleat und Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat. Die ersten beiden genannten Substanzen sind bereits aus *G. lucidum* bekannt. Ergosta-7en-3 $\beta$ -yllinoleat ist zum ersten Mal aus *G. lucidum* isoliert worden. Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat ist ein neuer Naturstoff.

Aus dem ätherischen Öl konnten 24 in Pilzen unbekannte flüchtige Substanzen identifiziert werden. Es handelte sich um (*E*)-Nerolidol, 1-Hepten-3-on, *p*-Methylanisol, *ar*-Curcumen, Undecanal, *trans*-Pinocarveol, Pinocarvon, *trans*- $\alpha$ -Bergamoten, Phenylpropan, *trans*-Anethol, Mstragol,  $\alpha$ -Pinenepoxid, Dillether, Carvon, Geranial, Isomenthon,  $\alpha$ -Ylängen, Daucen, Bisabololoxid B,  $\beta$ -Bisabolen,  $\alpha$ -Bisabolol,  $\beta$ -Iron, Fenchylacetat und 2-Himalachen-7 $\beta$ -ol.

Aus *S. leucomallellus*, der bisher noch nicht auf Sekundärmetabolite hin untersucht wurde, konnten die bekannten Substanzen Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol, Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, Ergosterin, Ergosterolperoxid, 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol und Eburiconsäure isoliert und identifiziert werden. Erstmals wurden die vollständigen NMR-Daten von Ergosterin und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol angegeben. Zwei neue Substanzen, die der seltenen Gruppe der 3,4-*seco*-lanostan Triterpene angehören, konnten aus diesem Baumpilz isoliert werden. Es handelte sich um (+)-23-Oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraen-3,26-dicarbonsäure und (+)-20-Hydroxy-23-oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraen-3,26-dicarbonsäure. Da diese *seco*-Triterpenoide neue Substanzen sind, wurden die Namen Spongiporensäure A für (+)-23-Oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraen-3,26-dicarbonsäure und Spongiporensäure B für (+)-

20-Hydroxy-23-oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraen-3,26-dicarbonsäure vorgeschlagen. Ferner wurden aus dem ätherischen Öl vier in Pilzen bislang unbekannte flüchtige Komponenten ( $\alpha$ -Muurolen, T-Cadinol, Sandvicensäure und Cyclofarnesin-5(14),8,10-trien) identifiziert.

*B. adusta* ist zuvor noch nicht auf Terpene hin untersucht worden.

Die Steroide Cholesterin, Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, Stigmasterin und Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol konnten identifiziert werden. Ergosterolperoxid und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol konnten isoliert und identifiziert werden.

Darüber hinaus konnte *m*-Cymen zum ersten Mal als Pilzinhaltsstoff identifiziert werden.

Aus *L. sulphureus* konnten die im Pilz bekannte Eburiconsäure und die nicht bekannte Trametenolsäure B isoliert und identifiziert werden. Des Weiteren wurden die Triterpene Ergosta-7,22-dien-3-on, Cholesterin, Ergosterin, Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol, Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol und die aromatische Verbindung 3-Phenylpropanol erstmals in dieser Art identifiziert.

Aus *S. commune* konnten die flüchtigen Substanzen 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on, *trans*-Dauca-4(11),8-dien, (*E*)- $\gamma$ -Bisabolon, (*Z,E*)- $\alpha$ -Farnesen, Globulol,  $\beta$ -Curcumen, (*Z*)-Heptadec-8-en und  $\alpha$ -Thujen als flüchtige Substanzen in Pilzen überhaupt zum ersten Mal im ätherischen Öl identifiziert werden.

Aus dem Baumpilz *D. mollis* wurden die flüchtigen Substanzen 1-Nonen-3-ol, Gymnomitra-3(15),4-dien, Carota-5,8-dien, Terpinen-4-ol und Ethylcyclopent-1-en-carbaldehyd zum ersten Mal in Pilzen identifiziert.

Aus *S. hirsutum* wurden (*Z*)-Asaron und  $\beta$ -Ionon erstmals als Inhaltsstoffe von Pilzen identifiziert.

Für *G. applanatum* wurde erstmals die Zusammensetzung des ätherischen Öls angegeben.

Aus *P. cinnabarinus* wurden erstmals die flüchtigen Substanzen Tricyclen, Dodecanal und (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen als Inhaltsstoffe von Pilzen identifiziert.

Im ätherischen Öl von *S. caesioides* wurden  $\alpha$ -Chamingren, Isobornylacetat und Striatol zum ersten Mal als flüchtige Komponenten in Pilzen identifiziert.

Die aus *S. leucomalleus* isolierten Substanzen Spongiporensäure A und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol und die aus *L. sulphureus* isolierte Trametenolsäure B wurden auf biologische Aktivität hin getestet. Spongiporensäure A zeigte eine schwache antimikrobielle Aktivität gegen die gram-negativen Bakterien *A. calcoaceticus*, *B. subtilis*, *B. brevis*, dem gram-negativen Bakterium *P. vulgaris* und dem Schimmelpilz *P. variotii*. Trametenolsäure B zeigte keinerlei Aktivität.

5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol zeigte in cytotoxischen Tests eine schwache anticancerogene Aktivität gegen Jurkat- und HeLa-S3-Zellen.

Agardiffusionstests von Spongiporensäure A, Trametenolsäure B und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol wurden mit ausgewählten Stämmen von Mikroorganismen durchgeführt. Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol wurde zusätzlich auf anticancerogene Wirkung hin getestet.

## Summary

The volatile and non-volatile secondary metabolites from the wood rotting fungi *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.), *Spongiporus leucomallellus* (Murill) David, *Bjerkandera adusta* (Willd.: Fr.), *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr., *Schizophyllum commune* (Fr.: Fr.), *Datronia mollis* (Sommerf.: Fr.), *Stereum hirsutum* (Willd.), *Ganoderma applanatum* (Pers.:Wallr.) Pat., *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.: Fr.) Karst. und *Spongiporus caesius* (Schrad.: Fr.) David were analyzed. The identification of volatile compounds from the essential oil was performed by GC-MS and Gc-FID analysis.

Identification of non-volatile components from *Ganoderma lucidum*, *Spongiporus leucomallellus*, *Bjerkandera adusta* and *Laetiporus sulphureus* was performed after fractionation of the extracts upon repeated column chromatography on silica gel and subsequent derivatization followed by GC-FID and GC-MS analysis. Co-injection with standard substances was performed in order to confirm the results. Non-volatile compounds were isolated by semi-preparative HPLC on either normal phase or RP-18 HPLC columns, respectively, or thin layer chromatography (TLC).

Structure elucidation of target compounds was carried out by using MS (EI, ESI), NMR (1D, 2D) and IR techniques. Biological activity data (antimicrobial and anticancerogenic) of spongiporic acid A, trametenolic acid B and 5,8-epidioxi-24-methylcholesta-6,9(11),22-triene-3 $\beta$ -ol are given here.

A total of 50 volatile compounds are reported for the first time as fungal metabolites among which 17 were found first to be metabolites from wood rotting fungi.

Among the 27 isolated and/or identified non-volatile compounds 21 are either unknown as natural compounds or unknown in the species analyzed. The antimicrobial and anticancerogenic activities of 3 compounds are reported here for the first time.

From the wood rotting fungus *G. lucidum*, two steroid esters, ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ -yl palmitate and ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ -yl linoleate already known in this species, and one new steroid ester plus one known steroidester but new for this fungus were isolated. The new steroid ester was identified as ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ -yl pentadecanoat. Ergosta-7-ene-3 $\beta$ -yl linoleate has been isolated for the first time from *G. lucidum*. From the essential oil, 24 volatile compounds could be identified for the first time as fungal constituents. These compounds were (*E*)-nerolidol, 1-hepten-3-one, *p*-methylanisol, *ar*-curcumene, undecanal, *trans*-pinocarveol, pinocarvone, *trans*- $\alpha$ -bergamotene, phenylpropane, *trans*-anethol, estragol,  $\alpha$ -pinene epoxide, dillether, carvon, geranial, isomenthone,  $\alpha$ -ylangene, daucene, bisabolol oxide B,  $\beta$ -bisabolene,  $\alpha$ -bisabolol,  $\beta$ -irone, fenchyl acetate, und 2-himalachene-7 $\beta$ -ol.

From *S. leucomallellus*, whose secondary metabolites have not been investigated before, lanosta-8(9),24(28)-diene-3 $\beta$ -ol, ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ -ol, ergosterol, ergosterol peroxide, 5,8-epidioxi-24-methylcholesta-6,9(11),22-triene-3 $\beta$ -ol and eburicoic acid could be isolated and identified. The complete NMR-data of ergosterol and 5,8-epidioxi-24-methylcholesta-6,9(11),22-triene-3 $\beta$ -ol is given here. Two novel compounds, that belong to the rare group of the 3,4-*seco*-lanosta-triterpenes, could be isolated from this wood rotting fungus. These were (+)-23-oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraene-3,26 dicarboxylic acid and (+)-20-hydroxy-23-oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraene-3,26 dicarboxylic acid. The names spongiporic acid A and spongiporic acid B are proposed for (+)-23-oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraene-3,26 dicarboxylic acid and (+)-20-hydroxy-23-oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraene-3,26 dicarboxylic acid, respectively.

In the essential oil, four volatile compounds ( $\alpha$ -muurolene, T-cadinol, sandvicene and cyclofarnesa-5(14),8,10-triene) are reported to be chemical constituents of fungi for the first time.

There are no previous reports on terpenoids of *B. adusta*. The Steroids cholesterol, stigmasterol and stigmast-5-ene-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol) could be identified. Ergosterol peroxide and 5,8-epidioxi-24-methylcholesta-6,9(11),22-triene-3 $\beta$ -ol were isolated and identified. *m*-Cymene has been identified for the first time as a volatile constituent of fungi.

From *L. sulphureus* eburicoic acid and trametenolic acid B were isolated and identified. Trametenolic acid B has not been reported before from *L. sulphureus*. In addition ergosta-7,22-diene-3-on, cholesterol, ergosta-7,22-3 $\beta$ -ol, lanosta-8(9),24(28)-diene-3 $\beta$ -ol, ergosta-7-ene-3 $\beta$ -ol and 3-phenyl propanol were identified for the first time in *L. sulphureus*.

The bis-nor-diterpenoid 6,10,14-trimethylpentadecane-2-one as well as *trans*-dauca-4(11),8-diene, (*E*)- $\gamma$ -bisabolene, (*Z,E*)- $\alpha$ -farnesene, globulol,  $\beta$ -curcumene, (*Z*)-heptadec-8-ene, and  $\alpha$ -thujene could be identified for the first time in the essential oil of *Schizophyllum commune* as volatile constituents in fungi.

From the wood rotting mushroom *D. mollis* the volatile constituents 1-nonen-3-ol, gymnomitra-3(15),4-diene, carota-5,8-diene, terpinene-4-ol and ethylcyclopentene-1-carbaldehyde were identified for the first time in fungi.

From *S. hirsutum*, (*Z*)-asarone and  $\beta$ -ionone were also identified to be constituents of fungi.

The composition of the essential oil of *G. applanatum* and the relative percentage of individual components is reported here for the first time.

From *P. cinnabarinus* the volatile components tricyclene, dodecanal, and (*E*)- $\beta$ -caryophyllene are reported for the first time as fungal constituents.

The essential oil of *S. caesius* revealed the presence of  $\alpha$ -chamingrene, isobornylacetate and striatol. These substances are also reported for the first time as fungal constituents.

Biological testing of the triterpenoids spongiporic acid A and 5,8-epidioxi-24-methylcholesta-6,9(11),22-triene-3 $\beta$ -ol isolated from *S. leucomallellus* and trametenolic acid B isolated from *L. sulphureus* was performed. Spongiporic acid A showed weak activity against the gram-negative bacteria *A. calcoaceticus*, *B. subtilis*, *B. brevis*, the gram-positive bacterium *P. vulgaris* und and the fungus *P. variotii*. Trametenolic acid B showed no activity.

In cytotoxic testing 5,8-epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-triene-3 $\beta$ -ol showed weak anticancerogenic activity against Jurkat and HeLa-S3 cells.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Chemikalien, Messgeräte und Methoden

#### 6.1.1 Extraktionsmethoden

##### 6.1.1.1 Wasserdampfdestillation

Für die Extraktion von leichtflüchtigen Substanzen eignet sich die Wasserdampfdestillation besonders gut. Das Prinzip der Wasserdampfdestillation beruht darauf, daß hochsiedende, mit Wasser nur wenig oder nicht mischbare bzw. nicht in Wasser lösliche Stoffe von eingeblasenem Wasserdampf ausgetrieben werden können. Die Wasserdampfdestillation bietet wegen des geringen Aufwandes eine gute Möglichkeit zur Gewinnung flüchtiger Substanzen<sup>[113], [114]</sup>.

Pilzmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Mörser zerkleinert. Das erhaltene Pulver wurde in 1l Wasser aufgeschlämmt und zum Kochen gebracht. Der austretende Wasserdampf wurde kondensiert und durch 1 ml Hexan geleitet, bevor das Wasser wieder zurückgeführt wurde.

##### 6.1.1.2 Extraktions mittels Lösungsmittel

Die Extraktion mit Hilfe von Lösungsmitteln gehört neben der Wasserdampfdestillation zu den ältesten Methoden, um niedermolekulare Inhaltsstoffe aus einer festen Matrix (Zellulose, Lignin, etc.) zu gewinnen. Das Lösungsmittel muß sich nach der Polarität der zu extrahierenden Stoffgruppe richten. Nach Abfiltrierung fester Bestandteile und Entfernung des Lösungsmittels erhält man den Extrakt<sup>[115]</sup>.

#### 6.1.2 Reagenzien und Lösungsmittel

Technische Lösungsmittel wurden von der Firma Biesterfeld bezogen. Zur Verwendung in der Säulenchromatographie wurden sie zuvor bei reduziertem Druck einmal destilliert. Für die HPLC wurden „HPLC gradient grade“-Lösungsmittel der Firma Roth verwendet. Lösungen zur Untersuchung wurden stets mit Lösungsmitteln der Qualitätsstufe „p.a.“ der Firma Merck angefertigt. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Firma Deutero bezogen (Deuterierungsgrad>99%). Die Reagenzien TMSH und MSTFA wurden bei Fluka bzw. Macherey und Nagel bezogen. Trifluoressigsäureanhydrid, Triethylamin, Natriumsulfat (wasserfrei), Ammoniaklösung (25%), Anisaldehyd, Essigsäure (99-100%) und Schwefelsäure (95-98%) wurden bei Merck bezogen.

## 6.2 Chromatographische Trennmethode

Dem russischen Botaniker Michail Tswett gelang im Jahre 1903 die erste chromatographische Trennung<sup>[116], [117]</sup>.

Chromatographie ist ein physikalisches Verfahren, das die Auftrennung eines Stoffgemisches durch unterschiedliche Verteilung seiner Einzelbestandteile zwischen einer stationären und einer mobilen Phase erlaubt.

Man kann Chromatographie anhand des Trennprinzips oder nach den verwendeten Phasen einteilen<sup>[117]</sup>.

### 6.2.1 Dünnschichtchromatographie

Eine maximal 300 µm dicke Schicht der stationären Phase (Kieselgel, Umkehrphasen, Cellulose, Aluminiumoxid, Kieselgur oder Polyamid: Korngröße ca. 12 µm Durchmesser) wird auf einem flachen Träger aus Glas, Kunststoff oder Aluminiumfolie aufgebracht. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt unter Benutzung eines Lösungsmittels (Linearentwicklung) aufsteigend in der Trogkammer. Die Detektion erfolgt mittels UV-Licht verschiedener Wellenlängen oder nach Derivatisierung mit Sprühreagenzien, die die Spots sichtbar machen<sup>[117]</sup>.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden beschichtete Platten der Firma Merck verwendet (Aluminiumplatten 20 × 20 cm, Kieselgel G<sub>254</sub>, Schichtdicke 0.2 mm). Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht bei 254 nm oder mittels Anisaldehyd-Reagenz (siehe Abschnitt 6.12.1.1.1).

### 6.2.2 Flüssigchromatographie

Bei der Flüssigkeitschromatographie werden im Prinzip die gleichen Materialien wie für die DC verwendet. Meist benutzt man Partikelgrößen von 15 µm bis 500 µm. Aufgeschlämmte Suspensionen werden in eine Glassäule (manchmal auch Teflon- oder Edelstahlsäulen) mit Hahn gegeben. Die Trennung findet unter dem hydrostatischen Druck der über der stationären Phase stehenden Flüssigkeit oder bei einem durch eine Pumpe erzeugten leichten Überdruck bis ca. 3 bar statt<sup>[117, 118]</sup>.

Säulenchromatographische Trennungen wurden an Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm) der Firma Merck durchgeführt. Trennungen wurden bei 0.2 bar Überdruck durchgeführt.

### 6.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie

Da die Trennleistung einer Säule mit abnehmender Korngröße der stationären Phase zunimmt, wurde die HPLC-Methode entwickelt. Die Korngröße der stationären Phase beträgt 3-10 µm. Aufgrund der kleinen Partikelgröße, die zu einem großem Strömungswiderstand führt, muß man unter hohem Druck arbeiten (ca. 100-400 bar), der von einer Doppelkolbenpumpe erzeugt wird. Die Detektion der Substanzen erfolgt meist mittels UV/VIS-, RI-, Polarimetrie- oder Fluoreszenz-Detektoren<sup>[117]</sup>.

Für semi-präparative HPLC-Trennungen wurde eine Gradientenpumpe Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump, als Injektor ein Rheodyne-Injektor 7125 mit einer 50 µl Schleife bestückt, ein UV-Detektor Merck Hitachi 655 A Variable Wavelength Detektor und ein Integrator Merck Hitachi D-2500 verwendet. Vor Verwendung wurden alle Laufmittel für 30 min. in einem Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK 100 H entgast.

Als Trennsäulen kamen zum Einsatz:

- Macherey und Nagel EC 250/4, Nucleosil 100-5, C18 mit einer Partikelgröße von 5 µm, einer Länge von 250 und einem Innendurchmesser von 4 mm.

- Knauer Si 60, LiChrosorb, Serial No. 7902067 mit einer Partikelgröße von 7 µm, einer Länge von 250 und einem Innendurchmesser von 4 mm.

## 6.2.4 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie ist eine Methode zur Trennung von Stoffgemischen, die gasförmig vorliegen oder sich unzerlegt verdampfen lassen (u. U. nach Derivatisierung), wobei als mobile Phase ein Gas dient. Es gibt zwei Methoden; die am meisten verwendete Gas-Flüssig-Chromatographie und die Gas-Fest-Chromatographie. Als Materialien für die stationäre Phase der Gas-Flüssig-Chromatographie werden schwerflüchtige Substanzen verwendet, die bei der Arbeitstemperatur flüssig sind, wie z.B. Paraffine, Siliconöle, Apiezonfette, Wachse, polymere Ether, modifizierte Cyclodextrine (zur Enantiomerentrennung)<sup>[43]</sup>.

Als mobile Phase verwendet man entweder Wasserstoff, Helium oder Stickstoff.

Die Probe wird in einem Split-, On-column-, PTV-Injektor, etc. injiziert<sup>[115]</sup>.

Als Detektoren werden meistens Flammenionisations-, Wärmeleitfähigkeits- und Elektroneneinfangdetektoren verwendet<sup>[117]</sup>.

Retentionsindex

Bezieht das Retentionsverhalten eines Analyten auf die homologe Reihe der Alkane. Der Analyt muss dabei nicht zwingend ein Alkan sein. Es wird zwischen den zwei benachbarten Gliedern der Alkan-Reihe interpoliert, zwischen deren Retentionszeiten die des Analyten liegt. Die Lage eines Analytpeaks wird also relativ zu einem benachbarten Alkan-Paar (der Retentionzeit benachbart) angegeben<sup>[119], [120]</sup>.

### 6.2.4.1 Kapillargaschromatographie

Es wurde ein Carlo Erba HRGC Gaschromatograph mit Split-Injektor (Splitverhältnis 1/30), bestückt mit einer 25 m langen CPSil-5-CB-Säule (Polydimethylsiloxan) mit einem Innendurchmesser von 0.25 mm, verwendet. Die Detektion erfolgte mittels eines Flammenionisationsdetektors. Zur Auswertung wurde ein Merck Hitachi Integrator D-2500 verwendet. Als Trägergas wurde Wasserstoff bei einem Fluss von 2 ml/min verwendet.

### 6.2.4.2 Enantioselektive Kapillargaschromatographie

Das Trennprinzip beruht darauf, dass die Antipoden mit chiralen stationären Phasen unterschiedlich starke diastereomere Wechselwirkungen eingehen. Die unterschiedlich stabilen diastereotope Komplexe führen zu unterschiedlichen Retentionszeiten der Enantiomere<sup>[43]</sup>.

Cyclodextrine besitzen definierte Hohlräume. In diesen Hohlräumen können durch van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen Gast-Moleküle inkludiert werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivitäten der Hydroxylgruppen in den Positionen 2,3 und 6 der Glucose-Einheiten und durch den Einsatz unterschiedlicher Schutzgruppen wurden Cyclodextrine hergestellt, an denen Enantiomere nahezu aller Stoffklassen, die flüchtig bzw. unzerlegt verdampfbar sind, mittels Kapillargaschromatographie getrennt werden können<sup>[43]</sup>.

Für die Analysen wurde ein Carlo Erba Carlo Erba Fractovap Series 2150 Gaschromatograph mit Split-Injektor (Splitverhältnis 1/30) eingesetzt. Es wurden Cyclodextrinsäulen verwendet, die eine Länge von 25 m und ein Innendurchmesser von 0.25 mm besitzen. Als Trägergas diente Wasserstoff. Für die Analysen von 1-Octen-3-ol, Carvon und Linalool wurden als Säule Oktakis(3-O-buteryl-2,6-di-O-pe)- $\gamma$ -CD respektive Oktakis(6-me-2,3-pe)- $\gamma$ -CD und Heptakis(6-O-me-2,3-di-O-pe)- $\beta$ -CD als stationäre Phasen verwendet. Die Detektion erfolgte mittels eines Flammenionisationsdetektors. Zur Auswertung wurde ein Merck Hitachi Integrator D-2500 verwendet.

### 6.3 Massenspektrometrie

Massenspektrometrie ist die Bezeichnung für ein physikalisches Verfahren, das Ionen entsprechend ihrem Verhältnis Masse/Ladung auftrennt. Ein Massenspektrometer besteht aus 3 Teilen: Ionenquelle, Analysator und Detektor. Die Ionenquelle ist eine Einrichtung zur Erzeugung von Ionen. Es gibt mehrere Ionisierungsmöglichkeiten wie Elektronenstoß-Ionisation (**EI**), Chemische-Ionisation (**CI**), Fast Atom Bombardment Ionisation (**FAB**), Electro Spray Ionisation (**ESI**), Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (**APCI**), Atmospheric Pressure Photo Ionisation (**APPI**) und Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (**MALDI**). Als Analysatoren werden Quadrupol-Analysatoren, Flugzeit-Analysatoren (**Time of Flight**) und Doppelsektorfeld-Analysatoren verwendet. Als Detektor wird meistens ein Sekundärelektronenvervielfacher verwendet <sup>[121-129]</sup>.

Direkteinlaß EI-MS-Messungen wurden an einem Sektorfeld-Gerät MAT 311A (Finnigan) durchgeführt. GC-MS-Messungen wurden mit einem Sektorfeld-Gerät VG Analytical VG 70-250S, das mit einem Hewlett-Packard Gaschromatographen HP 5890 gekoppelt war, durchgeführt. Als Trägergas diente Helium. Alle Ionisierungen erfolgten durch Elektronenstoß bei 70 eV. ESI-MS-Messungen wurden an einem Sektorfeldgerät MAT 95 XL der Firma ThermoFinnigan durchgeführt, das mit einer Spritzenpumpe bestückt ist.

### 6.4 NMR-Spektroskopie

Die kernmagnetische Resonanz beruht auf der Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment ( $\mu$ ) des Atomkerns und magnetischen Feldern. Das magnetische Moment des Kerns ist mit dem Kernspin ( $I$ ) verknüpft. Ausschließlich Kerne mit einem  $I \neq 0$  haben ein magnetisches Moment (z.B.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ : 1/2;  $^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$ : 1). Die Position des NMR-Signals (z.B. Resonanzfrequenz) wird chemische Verschiebung genannt. Die chemische Verschiebung ist von der elektronischen Umgebung des Kerns abhängig, somit ist eine Zuordnung der Signale zu den Atomen des Moleküls möglich <sup>[130-132]</sup>.

Sämtliche NMR-Spektren wurden mit den Geräten AMX-400 ( $^1\text{H}$ : 400.13 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100.61 MHz) und DRX 500 ( $^1\text{H}$ : 500.13;  $^{13}\text{C}$ : 125.76 MHz) der Firma Bruker aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (300 K). Die  $^{13}\text{C}$ -Signale wurden über PENDANT-Experimente zugeordnet. PENDANT-Experimente wurden mit Hilfe des NMR-Spektrometers AMX-400 durchgeführt. Alle 2D-Experimente wurden mit Hilfe des NMR-Spektrometers DRX 500 durchgeführt.

Ausgewertet wurde mit Hilfe der Programme „WIN-NMR 6.1“ und „2D-WIN-NMR“ der Firma Bruker. Als interner Standard diente Tetramethylsilan ( $\delta = 0$  ppm)

### 6.4.1 $^1\text{H}$ -Experiment

$^1\text{H}$ -Verschiebungen lassen auf einige funktionelle Gruppen schließen. Die Signalmultiplizitäten der  $^1\text{H}$ -Signale geben Aufschluss darüber, wieviele benachbarte Protonen vorliegen. Es lassen sich somit Teilstrukturen bestimmen. Da das Integral eines Signals im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum proportional zur Anzahl der Protonen ist, kann man aus den Integralen die Anzahl der Protonen bestimmen, die dieses Signal hervorrufen<sup>[66]</sup>.

### 6.4.2 $^{13}\text{C}$ -Experiment

Das Isotop  $^{13}\text{C}$  besitzt eine natürliche Häufigkeit von 1.1%. Wegen des geringen natürlichen Vorkommens, des kleinen gyromagnetischen Verhältnisses und wegen der zahlreichen und zum Teil großen  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen, die zu Auspaltungen führen, ist die Signalintensität sehr gering.

Die zentrale und auch heute noch ständig verwendete Routinemethode ist die  $^1\text{H}$ -Breitbandentkopplung<sup>[66]</sup>.

### 6.4.3 DEPT- und PENDANT-Experimente

Die DEPT- (**D**istortionless **E**nhancement by **P**olarisation **T**ransfer)<sup>[66]</sup> und PENDANT- (**P**olarisation **E**nhancement **D**uring **A**tached **N**ucleus **T**esting)<sup>[133]</sup> Pulssequenzen erlauben es, die Multiplizität von  $^{13}\text{C}$ -Signalen zu bestimmen. Bei den beiden Experimenten werden die Signale bestimmte Multiplizität in verschiedener Phase erhalten. Während im DEPT-Experiment quartäre Kohlenstoffe nicht erfaßt werden ist dies im PENDANT-Experiment möglich.

### 6.4.4 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-Experiment

Das  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (**C**orrelated **S**pectroscopy) Experiment gehört zur 2D-NMR-Spektroskopie. In 1D-NMR-Experimenten wird das Signal als Funktion einer Zeitvariablen aufgenommen. Ein 2D-NMR setzt sich aus Präparation, Evolution ( $t_1$ ), Mischung und Detektion ( $t_2$ ) zusammen. Man kann durch das  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY Experiment skalare homonucleare  $^2J_{\text{H,H}}$ ,  $^3J_{\text{H,H}}$  aber auch  $^nJ_{\text{H,H}}$  Kopplungen (Abb. 6-1) (mit  $n > 3$ ) nachweisen. Somit können Zusammenhängende Spinsysteme erkannt werden<sup>[66]</sup>.

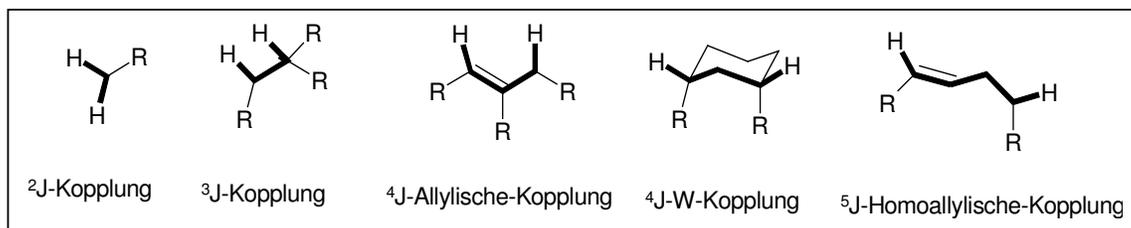


Abb. 6-1 Wichtige  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen

### 6.4.5 TOCSY-Experiment

**TOCSY** (**T**otal **C**orrelation **S**pectroscop**Y**) stellt ein weiteres homonucleares Korrelationsexperiment dar. Alle Protonen innerhalb eines Spinsystems koppeln miteinander. Dieses Verfahren hat sich bei der Untersuchung von Peptiden, Polyethern und mehrfach glykosylierten Verbindungen bewährt<sup>[133]</sup>.

### 6.4.6 Inverse Spektroskopie; HMQC- und HMBC-Experimente

Das **HMQC** (**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence)-Experiment zeigt  $^1\text{J}$ -Kopplungen, zeigt also welche Methyl-, Methylen- und Methin-Gruppen vorliegen. Beim **HMBC** (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation)-Experiment werden  $^2\text{J}$ - und  $^3\text{J}$ -Kopplungen beobachtet, was sehr wichtig für die Bestimmung der Konnektivitäten im Molekül ist<sup>[133]</sup>.

### 6.4.7 NOESY-Experiment

Der Unterschied des **NOESY**-Experimentes im Vergleich mit den anderen hier erläuterten 2D-Verfahren (COSY, HMBC) besteht darin, dass hier keine Beziehungen zwischen Kernen sichtbar gemacht werden, die über skalare Spin-Spin-Kopplungen, d.h. über Bindungen, miteinander in Wechselwirkung treten, sondern Wechselwirkungen zwischen koppelnden Kerndipolen, die direkt über den Raum übertragen werden (Entfernung kleiner als 5 Å). Dieser Magnetisierungstransfer über den Raum erfolgt über den Kern-Overhauser-Effekt (NOE). Am häufigsten wird das homonucleare  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Experiment durchgeführt, um Beziehungen zwischen Protonen (über den Raum) aufzudecken. Vorteilhaft ist die Aufnahme eines NOESY-Spektrums, wenn Beziehungen zwischen Protonen vermutet werden, die zwar über viele Bindungen voneinander getrennt (keine Signale im COSY-Spektrum), aber sich räumlich sehr nahe sind<sup>[133]</sup>.

## 6.5 Polarimetrie

Drehwertbestimmungen wurden am Polarimeter 341 der Firma Perkin-Elmer in einer 1 dm-Küvette bei 589 nm bei einer Temperatur von 20°C durchgeführt.

## 6.6 Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunktbestimmungen wurden am „Schmelzpunktbestimmer“ der Firma Apotech durchgeführt. Alle angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

## 6.7 ATR(Attenuated Total Reflection)-IR-Spektroskopie

Durch Absorption von Strahlung im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums werden in einem Molekül unterschiedliche Schwingungen (Schwingungsspektroskopie) von Atomen und von funktionellen Gruppen angeregt. Eine Methode, die auf innerer Reflexion

basiert, stellt die der abgeschwächten Totalreflexion (ATR) dar. Fällt Licht durch ein Medium mit relativ hohem Brechungs-Index (dem ATR-Kristall) unter einem größeren als dem kritischen Einfallswinkel (Grenzwinkel der Totalreflexion) auf die Grenzfläche zu einem Medium mit kleinerem Brechungsindex (die Probe), so wird die Strahlung an dieser Grenzfläche fast vollständig reflektiert. Bei der Totalreflexion dringt die Strahlung etwas in das angrenzende Medium ein<sup>[134]</sup>.

Das IR-Spektrum von Spongiporensäure A wurde am IFS 28 Spektrometer mit einer ATR-Einheit: Golden Gate (Diamant), einfache Reflektion aufgenommen

## 6.8 Agardiffusionstests

Bei dem Agardiffusionstest wird eine Substanzlösung auf einem Auftragepunkt eines mit einem Mikroorganismus beimpften Agargels aufgetragen. Die Substanz diffundiert in das Agar, während dieses bebrütet wird. Je nach dem wie empfindlich ein Mikroorganismus auf die Substanz reagiert, kann man anhand des sichtbaren Hemmhofs eine bakterizide-/fungizide- oder bakterio-/fungistatische-Wirkung nachweisen. In speziellen Fällen kann man auch auf Nutritive-(Fütterungstest), mutagene-Wirkung („Ames-Test“) oder auf die Interaktion mit weiteren Substanzen prüfen<sup>[135]</sup>.

Die Tests wurden beim IBWF e. V. (Kaiserslautern) nach der Methode von Anke et al.<sup>[132]</sup> für die Substanzen Spongiporensäure A und Trametenolsäure B durchgeführt. Bakterien wurden auf „nutrient“ Agar (Difco, Detroit, USA), Pilze auf einem Agar, welches pro Liter 4 g Hefeextrakt, 10 g Malzextrakt und 4 g Glucose beinhaltet, zum Wachsen gebracht. Das Inokulum hatte  $5 \times 10^5$  Zellen bzw. Sporen pro ml. Die Testsubstanzen wurden auf sterile Filterpapierscheiben mit einem Durchmesser von 6 mm aufgetragen und auf die Agarplatten gelegt. Die Platten für *Acinetobacter calcoaceticus*, *Penicillium notatum* und *Nematospora coryli* wurden bei 27 °C, die restlichen Mikroorganismen bei 37 °C 24 Stunden lang inkubiert. Tabelle 4-1 zeigt die Durchmesser der Hemmhöfe für Spongiporensäure A, Trametenolsäure B und Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol bei 50 und 10  $\mu$ g/Rondell. Tabelle 4-2 zeigt die die Durchmesser der Hemmhöfe bei bekannten antimikrobiellen Substanzen (Positivkontrolle). Die Ergebnisse werden in Abschnitt 4.2.1 besprochen.

## 6.9 Cytotox-Tests

Cytotoxizität wird definiert als Ausmaß, welches ein Agens besitzt eine spezifische zerstörende Eigenschaft bei gewissen Zellen hervorzurufen oder der Besitz einer solchen Eigenschaft. Verwendet wird dieser Begriff insbesondere in Bezug auf die Lyse von Zellen durch Immunphänomene und antineoplastische Arzneimittel. Cytotoxische Tests dienen letztendlich dem Nachweis dieser Eigenschaften (von z.B. anticancerogenen Substanzen). Ziel solcher Tests ist die Bestimmung der Inhibitorkonzentration bei der bei 50 bzw. 90% (IC<sub>50</sub>; IC<sub>90</sub>) der Zellen Lyse im Vergleich mit der Kontrolle beobachtet wurde. Als Inhibitor wird jede Substanz bezeichnet, die eine chemische Reaktion, Wachstum oder andere biologische Aktivität behindert<sup>[136]</sup>.

Die Tests wurden beim IBWF nach der Methode von Zapf et al.<sup>[133]</sup> für die Substanzen Spongiporensäure A und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol durchgeführt. Als Krebszellen wurden T-Zell Leukämie Zellen (ATCC TIB 152, akute T-Zell Leukämie, human) und Mamma Carzinom Zellen HeLa-S3 (ATCC CCL 2.2, Cervix

Carcinom human, Mamma Carzinom) verwendet. Jurkat-Zellen (Suspensionszellen) wurden in RPMI-Medium, HeLa-S3-Zellen (adhärente Zellen) in DMEM-Medium mit 10% fötalem Kalbserum, 65 und 100 µg/ml Penicillin G und Streptomycinsulfat kultiviert. Inkubation fand bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> statt. Der Cytotoxizitätstest wurde in Mikrotiterplatten mit 3 × 10<sup>4</sup> bis 1 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml durchgeführt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop untersucht und gezählt. Tabelle 4-3 zeigt die Ergebnisse zu den Cytotox-Tests für 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3β-ol. Tabelle 4-4 zeigt die Inhibitor-Konzentrationen, bei denen 90% der Zellen relativ zur Kontrolle abgetötet wurden. In Abschnitt 4.2.2 werden die Ergebnisse besprochen.

## 6.10 Herkunft und Identifizierung des Pilzmaterials

*Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) wurde am 1.12.2000 bei der Firma Fungi Perfecti (Olympia WA, USA) käuflich erworben. Die Pilze *Spongiporus leucomallellus* (Murill) David, *Bjerkandera adusta* (Willd.: Fr.), *Schizophyllum commune* (Fr.: Fr.), *Datronia mollis* (Sommerf.: Fr.), *Stereum hirsutum* (Willd.), *Ganoderma applanatum* (Pers.:Wallr.) Pat., *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.: Fr.) Karst. und *Spongiporus caesius* (Schrad.: Fr.) David wurden von Prof. W. A. König gesammelt und identifiziert (s. Tab. 6-1). *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. wurde von mir am 2.11.02 gesammelt. Die Pilze wuchsen an einer toten Eiche. Eine Identifizierung wurde von PD Dr. W. Schultze, Institut für Pharmazie, Universität Hamburg durchgeführt (s. Tab. 6-1).

Tab. 6-1 Herkunftsinformationen zu den untersuchten Pilzen

| Pilz                              | Baum     | Ort               | Datum    | Identifiziert von     |
|-----------------------------------|----------|-------------------|----------|-----------------------|
| <i>Spongiporus leucomallellus</i> | Kiefer   | Nahe Tritttau     | 06.10.01 | Prof. Dr. W. A. König |
| <i>Bjerkandera adusta</i>         | Rotbuche | Sachsenwald       | 07.04.01 | Prof. Dr. W. A. König |
| <i>Schizophyllum commune</i>      | Fichte   | Lonsee            | 11.10.01 | Prof. Dr. W. A. König |
| <i>Datronia mollis</i>            | Buche    | Nahe Aumühle      | 22.04.01 | Prof. Dr. W. A. König |
| <i>Stereum hirsutum</i>           | Buche    | Salach            | 12.10.01 | Prof. Dr. W. A. König |
| <i>Ganoderma applanatum</i>       | Buche    | Nahe Kummerfeld   | 23.9.01  | Prof. Dr. W. A. König |
| <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>    | Birke    | Nahe Bad Grund    | 15.7.02  | Prof. Dr. W. A. König |
| <i>Spongiporus caesius</i>        | Fichte   | Nahe Tritttau     | 06.10.01 | Prof. Dr. W. A. König |
| <i>Laetiporus sulphureus</i>      | Eiche    | Wandsbeker Gehölz | 02.11.02 | PD Dr. W. Schultze    |

## 6.11 Aufarbeitung und Extraktion des Pilzmaterials

Material, das nicht sofort untersucht werden konnte, wurde bei -18°C zwischengelagert. Von den Arten *Schizophyllum commune*, *Datronia mollis*, *Stereum hirsutum*, *Ganoderma applanatum* und *Pycnoporus cinnabarinus* wurden aufgrund geringem Ausgangsmaterial nur Wasserdampfdestillate gewonnen. Es wurden 0,5 ml *n*-Hexan in der

Wasserdampfdestillationsvorlage vorgelegt. Die Fruchtkörper von *G. lucidum*, *S. leucomallellus*, *B. adusta* und *L. sulphureus* wurden zur Isolierung nichtflüchtiger Substanzen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Mörser zerkleinert. Die erhaltenen Pulver wurden in einem 500 ml-Becherglas überführt und mit 400 ml Lösungsmittel aufgeschlämmt und 15 min. lang in ein Ultraschallbad gestellt. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt. Der Filtrerrückstand wurde zwei weitere Male so behandelt. Bei *Spongiporus leucomallellus*, *Bjerkandera adusta* und *Laetiporus sulphureus* wurde Dichlormethan und bei *Ganoderma lucidum* *n*-Hexan verwendet. Die Mengen, die zur Untersuchung der flüchtigen und nichtflüchtigen Komponenten verwendet wurden, sind in Tabellen 6-2 und 6-3 aufgelistet.

Tab. 6-2 Mengen des Materials zur Identifizierung flüchtiger Komponenten

| Spezies                           | Material [g] |
|-----------------------------------|--------------|
| <i>Ganoderma lucidum</i>          | 28.9         |
| <i>Spongiporus leucomallellus</i> | 71.4         |
| <i>Bjerkandera adusta</i>         | 53.4         |
| <i>Laetiporus sulphureus</i>      | 62.8         |
| <i>Schizophyllum commune</i>      | 159.0        |
| <i>Datronia mollis</i>            | 112.1        |
| <i>Stereum hirsutum</i>           | 61.1         |
| <i>Ganoderma applanatum</i>       | 75.00        |
| <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>    | 105.8        |
| <i>Spongiporus caesius</i>        | 121.7        |

Tab. 6-3 Mengen des Materials zur Isolierung terpenoider Substanzen

| Spezies                           | Material [g] |
|-----------------------------------|--------------|
| <i>Ganoderma lucidum</i>          | 275.8        |
| <i>Spongiporus leucomallellus</i> | 400.1        |
| <i>Bjerkandera adusta</i>         | 429.0        |
| <i>Laetiporus sulphureus</i>      | 2058.6       |

## 6.12 Identifizierung und Isolierung von Inhaltsstoffen

### 6.12.1 *Ganoderma lucidum*

#### 6.12.1.1 Wasserdampfdestillat

28.87 g der zerkleinerten Fruchtkörper von *G. lucidum* wurden einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Das erhaltene ätherische Öl wurde dann mittels GC-FID und GC-MS untersucht. Die Bedingungen für die GC-FID- und die GC-MS-Analyse sind in den Tabellen 6-4 und 6-5 aufgelistet.

Tab. 6-4 GC-Bedingungen für die GC-FID-Analyse

|                     |   |
|---------------------|---|
| Injektor-Temperatur | 200°C   |
| Detektor-Temperatur | 250°C   |
| Temperaturprogramm  | Anfangstemperatur: 50°C<br>Heizrate: 3°C/min.<br>Endtemperatur: 250°C |

Tab. 6-5 GC-Bedingungen für die GC-MS-Analyse

|                     |  |
|---------------------|--|
| Injektor-Temperatur | 200°C  |
| Temperaturprogramm  | Anfangstemperatur: 80°C<br>Heizrate: 10°C/min.<br>Endtemperatur: 270°C |

Die Retentionszeiten und Massenspektren der flüchtigen Verbindungen wurden mit einer Datenbank verglichen, die Retentionszeiten und Massenspektren von Reinsubstanzen enthält, die unter exakt diesen GC-MS Bedingungen untersucht wurden<sup>[41]</sup>. Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-1 (Abschnitt 4.1.1.1) aufgeführt.

#### 6.12.1.1 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Linalool und Carvon

Für die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Linalool und Carvon im ätherischen Öl, wurden die beiden Substanzen mittels DC (s. Abschnitt 6.2.1) isoliert. Die Substanzen wurden mittels DC (s. Abschnitt 6.2.1) isoliert. Das nach Bedarf verdünnte ätherische Öl wurde bandenförmig aufgetragen. Die Vergleichssubstanzen Linalool (*rac*) und Carvon (*rac*) wurden am Rand aufgetragen. Als Laufmittel wurde Hexan/Ethylacetat (80/20; v/v) verwendet. Die Laufstrecke betrug 6 cm. Zur Detektion wurde die DC-Platte mit einer Glasplatte bedeckt, wobei nur die Vergleichssubstanzen detektiert wurden. Die Detektion erfolgte mit Anisaldehyd-Reagenz\*. Die Spots wurden mit einem Bleistift markiert. Die R<sub>F</sub>-Werte von Linalool und Carvon betrugen 0.28 respektive 0.38. Die Banden wurden mit einer Schere ausgeschnitten und in einem 50-ml-Rundkolben überführt, der 20 ml Dichlormethan zum Extrahieren enthielt. Nach 15 min. wurden 5 ml in ein 7 ml Vial überführt und auf 1 ml mittels eines Stickstoffflusses auf 1 ml eingengt und analysiert. Bei Bedarf wurde weiter eingengt.

Die Bedingungen für die Enantiomerentrennung sind in Tabelle 6-6 aufgeführt.

Tab. 6-6 GC-Bedingungen für die Enantiomerentrennung von Linalool

|                     |   |
|---------------------|---|
| Injektor-Temperatur | 200°C   |
| Detektor-Temperatur | 200°C   |
| Druck               | 0.5 kp/cm <sup>2</sup>  |
| Temperaturprogramm  | Anfangstemperatur: 40°C, 20min isotherm<br>Heizrate: 1°C/min.<br>Endtemperatur: 160°C |

\* Zum Herstellen des Reagenzes wurden 0.5 ml Anisaldehyd mit 10 ml Essigsäure (98%), 85 ml Methanol und 5 ml Schwefelsäure (95-98%) in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Nach Besprühen der betreffenden Stelle der DC-Platte wurde mit einem Heißluftfön die besprühte Stelle erhitzt, bis die Spots von Linalool und Carvon gut sichtbar waren.

Für die Enantiomerentrennung von Carvon wurde die in Abschnitt 6.2.4.2 genannte Säule verwendet. Es wurde isotherm bei 100°C gearbeitet. Säulenvordruck sowie Temperaturen des Injektors und Detektors sind die gleichen wie bei der Trennung von Linalool.

Durch Coinjektion der Enantiomere mit der Probe konnten sowohl *R*-(-)- und *S*-(+)-Linalool bzw. *R*-(-)- und *S*-(+)-Carvon identifiziert werden (Abschnitt 4.1.1.1.1).

### 6.12.1.2 *n*-Hexanextrakt

Rohe *n*-Hexanextrakte wurde zunächst an 200 g Kieselgel säulenchromatographisch vorgetrennt (LM: *n*-Hexan [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (95/5, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (90/10, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (80/20, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (70/30, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (60/40, v/v) [200 ml] und *n*-Hexan/Ethylacetat (50/50, v/v) [200 ml]. Es wurden acht Fraktionen erhalten. Fraktion 1 enthielt nur wenig Niederschlag. Fraktion 2 enthielt ein gelbes Öl und einen weißen Niederschlag. Nur Fraktion 2 wurde näher untersucht. Die Fraktionen 3-8 enthielten die in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen bekannten Triterpene und Triterpensäuren und wurden nicht weiter analysiert.

#### 6.12.1.2.1 Fraktion 2

Die Fraktion wurde an 50 g Kieselgel (LM: *n*-Hexan/Ethylacetat (98/2, v/v) [150 ml] in zwei Fraktionen aufgetrennt. Mittels semi-präparativer HPLC konnten aus der ersten Unterfraktion Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat, Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpalmitat, Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -yllinoleat und Ergosta-7-en-3 $\beta$ -yllinoleat isoliert werden. Es wurde die in Abschnitt 6.2.3 genannte RP-18-Säule verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV bei einer Wellenlänge von  $\lambda=210$  nm. Als Elutionsmittel wurde Acetonitril/*tert*-Butylmethylether (60/40, v/v) bei einem Fluß von 1 ml/min verwendet. Es wurden 30  $\mu$ l der Fraktion injiziert. Die zweite Unterfraktion enthielt Spuren von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol.

#### 6.12.1.2.2 Derivatisierungen

Als erste Derivatisierung für die GC-MS-Analyse wurde die Umesterungsmethode nach Schulte und Weber<sup>[46]</sup> modifiziert durchgeführt. 100 $\mu$ g der Fraktion bzw. 50  $\mu$ g der isolierten Substanz Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat wurden in einem 2 ml Schraubdeckel-Vial in 100  $\mu$ l bzw. 50  $\mu$ l *tert*-Butylmethylether gelöst. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l TMSH-Reagenz (Fluka) wurde das Vial verschlossen, kurz geschüttelt und 30 min stehen gelassen. Es wurde 1  $\mu$ l in den Gaschromatographen injiziert (s.u.). Die Fettsäuremethylester konnten dadurch identifiziert werden. Die GC-Bedingungen und die Bedingungen der GC-MS-Trennung werden in Abschnitt 6.12.1.1 aufgeführt.

Zur Identifizierung der Sterole als TMS-Ether (2. Derivatisierung) wurde die Fraktion unter Stickstofffluß getrocknet. Es wurden 100  $\mu$ l bzw. 50  $\mu$ l MSTFA-Reagenz (Macherey und Nagel) zugegeben. Nach Verschließen des Vials wurde nach 30 min 1  $\mu$ l der Lösung eingespritzt. Die Bedingungen der GC-FID- und GC-MS-Analyse der TMS-Ether sind in Tabellen 6-9 und 6-10 aufgeführt. Die Retentionszeiten von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol und Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol betragen bei der GC-FID-Analyse 52.2 min respektive 55.3 min und bei der GC-MS-Analyse 16.7 min respektive 17.8 min.

Tab. 6-9 GC-Bedingungen für die GC-FID-Analyse der TMS-Ether

|                     |  |
|---------------------|--|
| Injektor-Temperatur | 250°C  |
| Detektor-Temperatur | 310°C  |
| Temperaturprogramm  | Anfangstemperatur: 100°C<br>Heizrate: 5°C/min.<br>Endtemperatur: 300°C |

Tab. 6-10 GC-Bedingungen für die GC-FID-Analyse der TMS-Ether

|                     |   |
|---------------------|---|
| Injektor-Temperatur | 250°C   |
| Temperaturprogramm  | Anfangstemperatur: 130°C<br>Heizrate: 20°C/min.<br>Endtemperatur: 300°C |

## 6.12.2 *Spongiporus leucomallellus*

### 6.12.2.1 Wasserdampfdestillat

71.36 g der zerkleinerten Fruchtkörper von *S. leucomallellus* wurden einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Das erhaltene ätherische Öl wurde dann mittels GC-MS untersucht und die Komponenten durch Vergleich ihrer Massenspektren und Retentionszeiten mit Literaturdaten identifiziert<sup>[41]</sup>. Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-3 (s. Abschnitt 4.1.2.1) aufgeführt.

#### 6.12.2.1.1 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von 1-Octen-3-ol

Die Analyse der Enantiomeren von 1-Octen-3-ol wurde analog zu Abschnitt 6.12.1.1.1 durchgeführt. Zur Anreicherung von 1-Octen-3-ol wurde das chromatographische System von Abschnitt 6.12.1.1.1 verwendet. Als Vergleichssubstanz wurde 1-Octen-3-ol (*rac*) verwendet. Die Detektion erfolgte mit Anisaldehyd-Sprühreagenz (siehe Abschnitt 6.12.1.1.1). Der  $R_f$ -Wert betrug 0.35. Das erhaltene angereicherte 1-Octen-3-ol mußte für die Methode nach König et al.<sup>[53]</sup> zum TFA-Derivat<sup>[54]</sup> derivatisiert werden. Die Lösung mit dem angereicherten 1-Octen-3-ol wurde auf 0.5 ml eingengt. 0.1 ml einer 0.05 M Triethylaminlösung in Dichlormethan und 10 µl Trifluoressigsäureanhydrid wurden zugegeben. Das 7-ml-Vial wurde zugeschraubt und 30 min. stehen gelassen. Danach wurde 1 ml einer 5%igen wäßrigen Ammoniaklösung zugegeben. Das wieder verschlossene Vial wurde 5 min. geschüttelt. Die wäßrige Phase wurde entnommen und verworfen. Die organische Phase wurde nach Zugabe von 3 ml Dichlormethan mit Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet. Die wasserfreie organische Phase wurde auf 0.5 ml eingengt. Es wurde 1 µl in den Gaschromatographen (s. Abschnitt 6.2.4.1) eingespritzt. Es wurde isotherm bei 60°C und einem Druck von 0.4 kPa/cm<sup>2</sup> gearbeitet.

Durch Coinjektion der Enantiomere mit der Probe konnten sowohl *R*-(-)- und *S*-(+)-1-Octen-3-ol identifiziert werden (Abschnitt 4.1.2.1.1).

### 6.12.2.2 Dichlormethanextrakt

Der rohe Dichlormethanextrakt wurde an 200 g Kieselgel säulenchromatographisch vorgetrennt (LM: *n*-Hexan [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (90/10, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (80/20, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (70/30, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (60/40, v/v) [200 ml] und *n*-Hexan/Ethylacetat (50/50, v/v) [200 ml]). Es wurden sieben Fraktionen erhalten. Die Fraktionen 4, 5 und 6 enthielten jeweils einen weißen Niederschlag und wurden zum Isolieren von Reinsubstanzen verwendet.

#### 6.12.2.2.1 Fraktion 4

Fraktion 4 enthielt eine weiße Substanz, die leicht in *tert*-Butylmethylether löslich war. Die Lösung hatte eine gelbliche Farbe. Mittels semi-präparativer HPLC konnte Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol isoliert werden. Hierzu wurde die in Abschnitt 6.2.3 genannte RP-18-Säule verwendet. Als Elutionsmittel diente Acetonitril/*tert*-Butylmethylether (80/20, v/v) bei einem Fluß von 1 ml/min verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektion bei einer Wellenlänge von  $\lambda=210$  nm. Injiziert wurden 20  $\mu$ l der in 5 ml *tert*-Butylmethylether gelösten Fraktion.

#### 6.12.2.2.2 Fraktion 5

Die Fraktion 5 enthielt einen weißen Niederschlag. Auch hier ließ sich die Fraktion in *tert*-Butylmethylether leicht lösen. Semi-präparative HPLC wurde hier ebenfalls zur Isolierung von zwei Substanzen verwendet. Die gleichen HPLC-Bedingungen wie bei Fraktion 4 wurden hier angewandt. Es konnten Ergosterin und Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol isoliert werden. Zwei Substanzen, die nach 4.9 min. und 5.3 min. eluierten, wurden zusammen gesammelt. Die Lösung wurde verdünnt, bis eine hinreichende Trennung gelang (s. Abschnitt 6.12.2.2.3)

#### 6.12.2.2.3 Fraktion 5.1

Die in Abschnitt 6.12.2.2.2 gewonnene Fraktion wurde 1/3 mit *tert*-Butylmethylether verdünnt. Die gleichen HPLC-Bedingungen wurden hier zum Isolieren zweier Substanzen verwendet. 20  $\mu$ l der Fraktion wurden injiziert. Es konnten Ergosterolperoxid und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol isoliert werden. Die vollständigen NMR-Daten von 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol in Deuteriobenzol sind erstmals in Tabelle 6-13 aufgeführt.

#### 6.12.2.2.4 Fraktion 6

Fraktion 6 enthielt einen weißen Niederschlag. Auch hier konnte die Fraktion in *tert*-Butylmethylether gelöst werden. Es wurde eine HPLC-Methode zum trennen zweier Substanzen in der Fraktion entwickelt. Der Einsatz der in Abschnitt 6.2.3 genannten Kieselgelsäule mit Dichlormethan/Methanol (90/10, v/v) als Eluent hat sich als Methode der Wahl erwiesen. Es wurde hier eine Wellenlänge von  $\lambda=254$  nm im UV-Detektor verwendet. Der Fluß betrug 1 ml/min, das Injektionsvolumen 20  $\mu$ l. Es wurde eine Substanz isoliert, die sich als sehr schwer löslich in vielen Lösungsmitteln erwies. Als Lösungsmittel eigneten sich

für die NMR-Analyse deuteriertes DMSO und deuteriertes Pyridin. Es handelte sich um Eburiconsäure.

#### 6.12.2.2.5 Fraktion 7

Die Fraktion enthielt einen weißen Niederschlag, der in Methanol löslich war. Es wurden zwei Substanzen mittels semi-präparativer HPLC isoliert. Verwendet wurde eine RP-18-Säule (Abschnitt 6.2.3) und als Eluent Methanol/Wasser (80/20, v/v) bei einem Fluss von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei  $\lambda=254$  nm. Das Injektionsvolumen betrug 20  $\mu$ l. Die Substanz, die als zweite eluierte, war ähnlich schlecht löslich wie Eburiconsäure. Bei Einsatz des bei Triterpensäuren häufig verwendeten Lösungsmittels Deuteriopyridin löste sich die Substanz rasch. Die Substanz, die als erstes eluierte löste sich ausreichend in deuteriertem Methanol. Die NMR-Daten der Substanzen sind in Tabelle 4-9 und 4-11 aufgeführt. Es handelte sich bei der zuerst eluierenden Substanz um (+)-20-Hydroxy-23-oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraen-3,26-dicarbonsäure (Spongiporensäure B) und der nächsten um (+)-23-Oxo-3,4-*seco*-lanosta-4(28),7(8),9(11),24(31)-tetraen-3,26-dicarbonsäure (Spongiporensäure A) (NMR-Kopplungen siehe Tab. 4-7, 4-8 und 4-10).

Es wurden ESI-MS-Spektren der beiden Substanzen aufgenommen. Spongiporensäure A wurde im Positiv-Ionen-Modus gemessen. Das Ion 519  $m/z$  wurde beobachtet und stellt das Natrium-Addukt von Spongiporensäure A dar ( $[M+Na]^+$ ). Der hochaufgelöste Peak lieferte den Wert 519.3110  $m/z$  (Berechneter Wert: 519.3086  $m/z$ ), daraus ließ sich die Summenformel  $C_{31}H_{44}O_5$  ermitteln.

Spongiporensäure B wurde im Negativ-Ionen-Modus gemessen. Das Ion 511  $m/z$  stellt  $[M-H]^-$  von Spongiporensäure B dar. Der hochaufgelöste Peak lieferte den Wert 511.2999  $m/z$  (Berechneter Wert: 511.3059  $m/z$ ), daraus ließ sich die Summenformel  $C_{31}H_{44}O_6$  ermitteln.

Es wurden die Drehwerte von Spongiporensäure A und B bestimmt. Spongiporensäure A besaß einen positiven Drehwert von  $[\alpha]_{20}^{589} = (+) 59$  ( $c=0.18$  Methanol) und Spongiporensäure B einen Drehwert von  $[\alpha]_{20}^{589} = (+) 145$  ( $c=0.02$  methanol). Die Schmelzpunkte betragen für Spongiporensäure A und B 182°C respektive 218°C. Die Ausbeute an Spongiporensäure B war geringer als bei Spongiporensäure A. Es wurde eine DC-Methode entwickelt, mit der die beiden Substanzen gut getrennt werden konnten. Dadurch konnte eine größere Menge an Spongiporensäure B gewonnen werden, um NMR-Spektren mit besserem Signal/Rausch-Verhältniss zu erhalten. Verwendet wurden Kieselgelplatten, wobei als Eluent Dichlormethan/Methanol (90/10, v/v) diente. Die Laufstrecke betrug 6 cm. Es wurden 10  $\mu$ l der in 15 ml gelösten Fraktion bandenförmig auf 1cm aufgetragen. 10 Banden wurden pro platte aufgetragen.

Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht bei 254 nm. Die  $R_f$ -Werte betragen 0.32 respektive 0.16 für Spongiporensäure A und B jeweils.

### 6.12.3 *Bjerkandera adusta*

#### 6.12.3.1 Wasserdampfdestillation

53.36 g der zerkleinerten Fruchtkörper von *B. adusta* wurden einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Das erhaltene ätherische Öl wurde dann mittels GC-MS untersucht und die Komponenten durch Vergleich ihrer Massenspektren und Retentionszeiten mit Literaturdaten identifiziert<sup>[41]</sup>. Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-12 (s. Abschnitt 4.1.2.1) aufgeführt.

Die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von 1-Octen-3-ol wurde entsprechend Abschnitt 6.12.2.1.1 durchgeführt.

### 6.12.3.2 Dichlormethanextrakt

Der rohe Dichlormethanextrakt wurde an 200 g Kieselgel säulenchromatographisch vorgetrennt (LM: *n*-Hexan [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (90/10, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (80/20, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (70/30, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (60/40, v/v) [200 ml] und *n*-Hexan/Ethylacetat (50/50, v/v) [200 ml]). Es wurden sieben Fraktionen erhalten. In den Fraktionen 4 und 5 wurde jeweils ein weißer Niederschlag beobachtet. Diese Fraktionen wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt.

#### 6.12.3.2.1 Fraktion 4

In dieser Fraktion konnten nach Silylierung (siehe Abschnitt 6.12.1.2.2) und anschließender GC-FID- und -MS-Analyse die TMS-Ether von Cholesterin, Stigmasterin,  $\beta$ -Sitosterin und Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol identifiziert werden. Es wurden Referenzsubstanzen (Cholesterin, Stigmasterin, Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -Sitosterin)) und das in Abschnitt 6.12.2.2.1 isolierte Ergosta-7,22-dien-3-ol gemäß Abschnitt 6.12.1.2.2 silyliert und mittels GC und GC-MS analysiert. Die Retentionszeiten der TMS-Ether von Cholesterin, Stigmasterin und Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol bei der GC-MS-Analyse betragen 15.3, 17.2 und 17.7 min. Die Retentionszeit von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol wird in Abschnitt 6.12.1.2.2 aufgeführt.

Die Retentionszeiten von Cholesterin, Stigmasterin und Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol bei der GC-FID-Analyse betragen 49.3, 53.4 und 55.6 min. Die Retentionszeit von Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol wird in Abschnitt 6.12.1.2.2 aufgeführt. 30  $\mu$ l der silylierten Fraktion aus *B. adusta* wurden 7.5  $\mu$ l, 8  $\mu$ l, 7  $\mu$ l und 6  $\mu$ l der TMS-Ether-Lösungen von Cholesterin, Stigmasterin, Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol und Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol für die Conjektion zugegeben. Durch Conjektion konnten die Substanzen als Inhaltsstoffe von *Bjerkandera adusta* bestätigt werden.

#### 6.12.3.2.2 Fraktion 5

Die Fraktion 5 enthielt 3 mg eines weißen Niederschlags. Die Fraktion ließ sich in *tert*-Butylmethylether leicht lösen. Es wurden die HPLC Parameter wie bei der Isolierung von Substanzen der Fraktion 5 aus *S. leucomallellus* in Abschnitt 6.12.3.2.2 verwendet. Mittels semi-präparativer HPLC konnten zwei Substanzen isoliert werden. Die MS- und NMR-Daten bestätigten die Isolierung von Ergosterolperoxid und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol.

### 6.12.4 *Laetiporus sulphureus*

#### 6.12.4.1 Dichlormethanextrakt

Der rohe Dichlormethanextrakt wurde an 200 g Kieselgel säulenchromatographisch vorgetrennt (LM: *n*-Hexan [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (90/10, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (80/20, v/v) [200 ml], *n*-Hexan/Ethylacetat (70/30, v/v) [200 ml], *n*-

Hexan/Ethylacetat (60/40, v/v) [200 ml] und *n*-Hexan/Ethylacetat (50/50, v/v) [200 ml]. Es wurden sieben Fraktionen erhalten. In den Fraktionen 3,4,5 und 7 war jeweils ein weißer Niederschlag enthalten. Diese Fraktionen wurden weiter untersucht

#### 6.12.4.1.1 Fraktion 3

Bei der Fraktion handelte es sich um eine gelbe Flüssigkeit, in der sich eine geringe Menge eines weißen Niederschlags befand. Nach Silylierung (siehe Abschnitt 6.12.1.2.2) und anschließender GC-MS-Analyse zeigte das Massenspektrum eines Peaks einen Molpeak bei 396 *m/z*. Die Substanz besitzt keine silylierbaren funktionellen Gruppen (z.B. Hydroxyl-, Carboxyl-, Amingruppen, etc.), da das Fragmention 73 *m/z* nicht beobachtet wurde. Das Massenspektrum zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem Massenspektrum von Ergosta-7,22-dien-3-on. Im Abschnitt 4.1.4.2.3 werden die vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismen für diese Substanz besprochen.

#### 6.12.4.1.2 Fraktion 4

Aus dieser Fraktion konnten nach Silylierung (siehe Abschnitt 6.12.1.2.2) und anschließender GC-MS- und -FID-Analyse die TMS-Ether von Cholesterin, Ergosta-7,22-dien-3-ol, Ergosterin und Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol identifiziert werden. Es wurden Referenzsubstanzen (Cholesterin, Ergosterin) und die in den Abschnitten 6.12.2.2.1 und 6.12.2.2.2 vorgestellten Substanzen Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol und Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol gemäß Abschnitt 6.12.1.2.2 silyliert und mittels GC-MS und GC-FID analysiert. Die Retentionszeiten der TMS-Ether von Ergosterin und Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol der GC-MS-Analyse betragen 16.5 und 19.8 min.

Die Retentionszeiten von Cholesterin und Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol bei der GC-MS-Analyse werden in Abschnitte 6.12.4.1.2 und 6.12.1.2.2 genannt.

Die Retentionszeiten bei der GC-FID-Analyse von Ergosterin und Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol betragen 51.6 respektive 57.5 min. Die Retentionszeiten von Cholesterin und Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol werden in Abschnitte 6.12.1.2.2 und 6.12.3.2.1 genannt. 30  $\mu$ l der Lösung der silylierten Fraktion aus *L. sulphureus* wurden 8  $\mu$ l, 7  $\mu$ l, 7  $\mu$ l und 8  $\mu$ l TMS-Ether von Cholesterin, Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, Ergosterin und Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol jeweils zugegeben. Durch Coinjektion konnten die Substanzen als Inhaltsstoffe von *Laetiporus sulphureus* bestätigt werden.

#### 6.12.4.1.3 Fraktion 5

Diese Fraktion wurde ebenfalls wie in Abschnitt 6.12.1.2.2 silyliert. Es konnten hier die zuvor identifizierten Steroide Ergosterin und Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol aufgrund ihrer Retentionszeiten und Massenspektren bei der GC-MS-Analyse identifiziert werden.

Die in Abschnitt 6.12.1.2.2 identifizierte Substanz Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol konnte im GC-FID als TMS-Ether von Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol durch Vergleich des Massenspektrums der Reinsubstanz und Coinjektion identifiziert werden.

Bei einer Retentionszeit von 11.0 min im GC-FID und 3.3 min im GC-MS wurde der TMS-Ether einer aromatischen Substanz identifiziert. Es handelte sich um das TMS-Ether von 3-Phenylpropanol. Das Massenspektrum der Reinsubstanz zeigte eine gute Übereinstimmung

mit dem Massenspektrum der Probe. Coinjektion mit der silylierten Reinsubstanz bestätigten 3-Phenylpropanol als Inhaltsstoff von *L. sulphureus*.

#### 6.12.4.1.4 Fraktion 7

Die Fraktion enthielt einen weißen Niederschlag, der sich leicht in einem Gemisch von Dichlormethan/Methanol (90/10, v/v) lösen ließ. Es wurde eine DC-Methode mit Kieselgelplatten entwickelt, um die Substanzen zu trennen. Als Laufmittel wurde das oben genannte Gemisch verwendet. Die Laufstrecke betrug 6 cm. Es wurden 10 µl der in 15 ml gelösten Fraktion aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht bei 254 nm. Es wurden 5 Spots beobachtet. Es konnten 2 Substanzen isoliert werden, sie besaßen  $R_f$ -Werte von 0.50 respektive 0.53. Die EI-MS-Spektren der isolierten Substanzen zeigten jeweils einen Molpeak bei 456 und 470  $m/z$ . Das Massenspektrum der Substanz mit dem  $R_f$ -Wert 0.53 zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Massenspektrum von Eburiconsäure (s. Abschnitt 4.1.2.2.6. Durch Vergleich der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren konnte Eburiconsäure identifiziert werden.

Es wurden ESI-MS-Spektren im Positiv-Ionen-Modus der beiden Substanzen aufgenommen. Die Ionen 479 und 493  $m/z$  wurden beobachtet. Der Peak 493  $m/z$  stellt das Natrium-Addukt von Eburiconsäure dar ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ). Der gemessene Wert 479.3518  $m/z$  stellt das Natrium-Addukt einer Substanz mit der Summenformel  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$  dar (Berechneter Wert: 479.3500). Mit Hilfe dieser ermittelten Summenformel und des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums konnte die Substanz als Trametenolsäure B identifiziert werden.

### 6.12.5 *Schizophyllum commune*

#### 6.12.5.1 Wasserdampfdestillat

159 g der zerkleinerten Fruchtkörper von *S. commune* wurden einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Das erhaltene ätherische Öl wurde dann mittels GC-MS untersucht und die Komponenten durch Vergleich ihrer Massenspektren und Retentionszeiten mit Literaturdaten identifiziert<sup>[41]</sup>. Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-13 (s. Abschnitt 4.1.5.1) aufgeführt.

Die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von 1-Octen-3-ol wurde wie in Abschnitt 6.12.2.1.1 durchgeführt.

### 6.12.6 *Datronia mollis*

#### 6.12.6.1 Wasserdampfdestillation

112.07 g der zerkleinerten Fruchtkörper von *D. mollis* wurden einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Das erhaltene ätherische Öl wurde dann mittels GC-MS untersucht und die Komponenten durch Vergleich ihrer Massenspektren und Retentionszeiten mit Literaturdaten identifiziert<sup>[41]</sup>. Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-14 (s. Abschnitt 4.1.6.1) aufgeführt.

Die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von 1-Octen-3-ol wurde wie in Abschnitt 6.12.2.1.1 durchgeführt.

## 6.12.7 *Stereum hirsutum*

### 6.12.7.1 Wasserdampfdestillation

61.09 g der zerkleinerten Fruchtkörper von *S. hirsutum* wurden einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Das erhaltene ätherische Öl wurde dann mittels GC-MS untersucht und die Komponenten durch Vergleich ihrer Massenspektren und Retentionszeiten mit Literaturdaten identifiziert<sup>[41]</sup>. Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-15 (s. Abschnitt 4.1.7.1) aufgeführt.

## 6.12.8 *Ganoderma applanatum*

### 6.12.8.1 Wasserdampfdestillation

75.00 g der zerkleinerten Fruchtkörper von *G. applanatum* wurden einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Das erhaltene ätherische Öl wurde dann mittels GC-MS untersucht und die Komponenten durch Vergleich ihrer Massenspektren und Retentionszeiten mit Literaturdaten identifiziert<sup>[41]</sup>.

Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-16 (s. Abschnitt 4.1.8.1) aufgeführt.

Die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von 1-Octen-3-ol wurde wie in Abschnitt 6.12.2.1.1 durchgeführt.

## 6.12.9 *Pycnoporus cinnabarinus*

### 6.12.9.1 Wasserdampfdestillation

105.79 g der zerkleinerten Fruchtkörper von *P. cinnabarinus* wurden einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Das erhaltene ätherische Öl wurde dann mittels GC-MS untersucht und die Komponenten durch Vergleich ihrer Massenspektren und Retentionszeiten mit Literaturdaten identifiziert<sup>[41]</sup>. Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-17 (s. Abschnitt 4.1.9.1) aufgeführt.

Die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von 1-Octen-3-ol wurde wie in Abschnitt 6.12.2.1.1 durchgeführt.

## 6.12.10 *Spongiporus caesius*

### 6.12.10.1 Wasserdampfdestillation

121.75 g der zerkleinerten Fruchtkörper von *S. caesius* wurden einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Das erhaltene ätherische Öl wurde dann mittels GC-MS untersucht und die Komponenten durch Vergleich ihrer Massenspektren und Retentionszeiten mit Literaturdaten

identifiziert<sup>[41]</sup>. Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-18 (s. Abschnitt 4.1.10.1) aufgeführt.

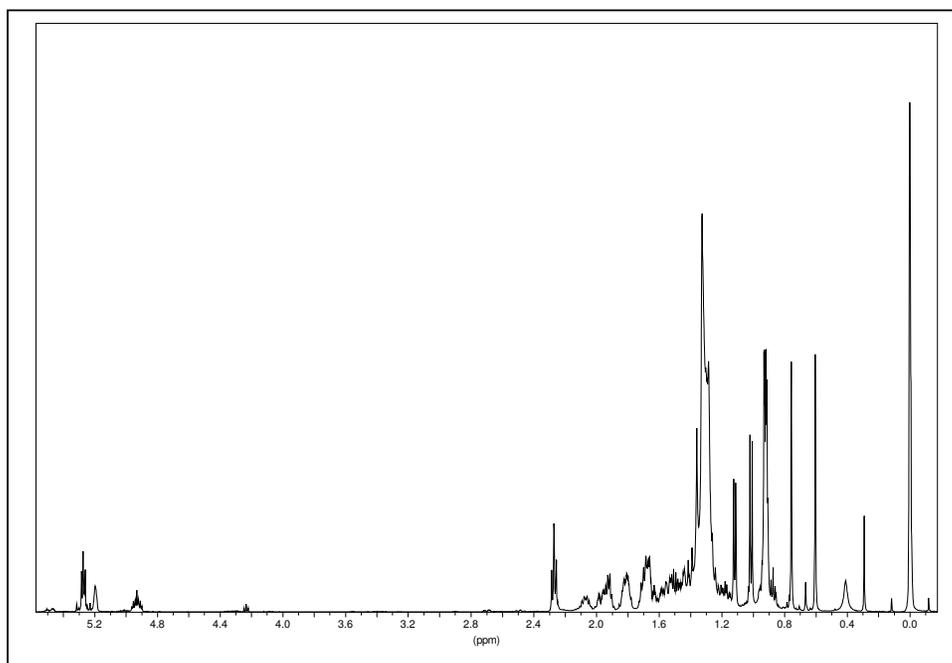
Die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von 1-Octen-3-ol wurde wie in Abschnitt 6.12.2.1.1 durchgeführt.

## 7 Gefahrenstoffanhang

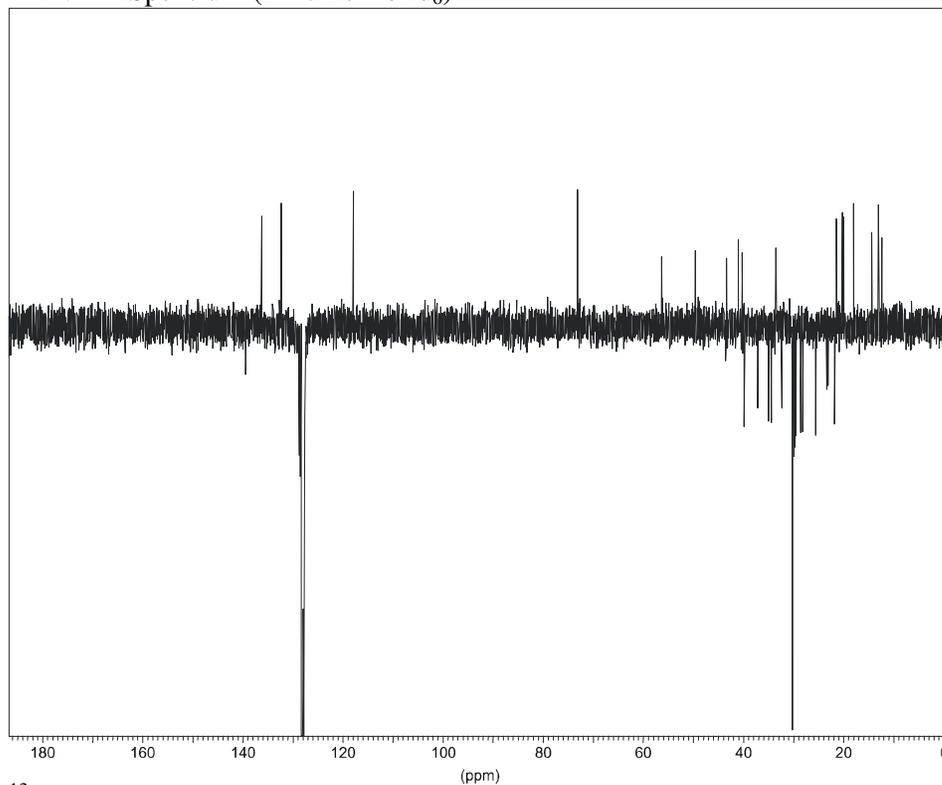
| Substanz                                     | Gefahrensymbol    | R-Sätze                        | S-Sätze                  |
|--|-------------------|--------------------------------|--------------------------|
| D <sub>6</sub> -Aceton                       | F                 | 11                             | 9-16-23.2-33             |
| Acetonitril                                  | F, T              | 11-23/24/25                    | 9-16-29-33-36/37-61-62   |
| Ammoniaklösung 25%                           | C, N              | 34-50                          | 26-36/37/39-45-61        |
| D <sub>6</sub> -Benzol                       | F, T              | 45-11-E48/23/24/25             | 53-45                    |
| <i>tert</i> -Butylmethylether                | F                 | 11                             | 9-16-29-43.3             |
| Chloroform                                   | X <sub>n</sub>    | 22-38-40-48/20/22              | 36/37                    |
| D-Chloroform                                 | X <sub>n</sub>    | 22-38-40-48/20/22              | 36/37                    |
| Dichlormethan                                | X <sub>n</sub>    | 20-40                          | 24                       |
| D <sub>6</sub> -Dimethylsulfoxid             | X <sub>i</sub>    | 36/38                          | 26                       |
| Ergosterin                                   | T+                | 28                             | 26-36/37-45              |
| Essigsäure 99-100%                           | C                 | 10-35                          | 23.2-26-45               |
| Ethylacetat                                  | F, X <sub>i</sub> | 11-36-66-67                    | 16-26-33                 |
| Helium                                       | -                 | -                              | 3-7                      |
| <i>n</i> -Hexan                              | X <sub>n</sub>    | 11-38-48/20-51/53-62-65-<br>67 | 9-16-29-33-36/37-61-62   |
| Methanol                                     | F, T              | 11-23/25                       | 7-16-24-45               |
| D <sub>4</sub> -Methanol                     | F, T              | 11-23/25                       | 7-16-24-45               |
| N-Methyltrimethylsilyl-<br>trifluoroacetamid | X <sub>i</sub>    | 10-36/37/38                    | -                        |
| 3-Phenylpropanol                             | X <sub>i</sub>    | 36/37/38                       | 26-37/39                 |
| D <sub>5</sub> -Pyridin                      | F, X <sub>n</sub> | 11-20/21/22                    | 26-28.1-36/37            |
| Schwefelsäure 95-98%                         | C                 | 35                             | 26-30-45                 |
| Stigmasterin                                 | -                 | -                              | 22-24/25                 |
| Stigmast-5-en-3β-ol                          | -                 | -                              | 22-24/25                 |
| Triethylamin                                 | F, C              | 11-20/21/22-35                 | 3-16-26-36/37/39-45      |
| Trifluoressigsäure                           | C                 | 23/24                          | 45                       |
| Trifluoressigsäureanhydrid                   | C                 | 35                             | 23.2-26-28.6-36/37/39-45 |
| Trimethylsulfoniumhydroxid                   | F, T              | 11-23/24/25-34-<br>39/23/24/25 | 7-16-26-36/37/39-45      |
| Wasserstoff                                  | F                 | 12                             | 9-16-33                  |

## 8 Spektrenanhang

Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpalmitat \*

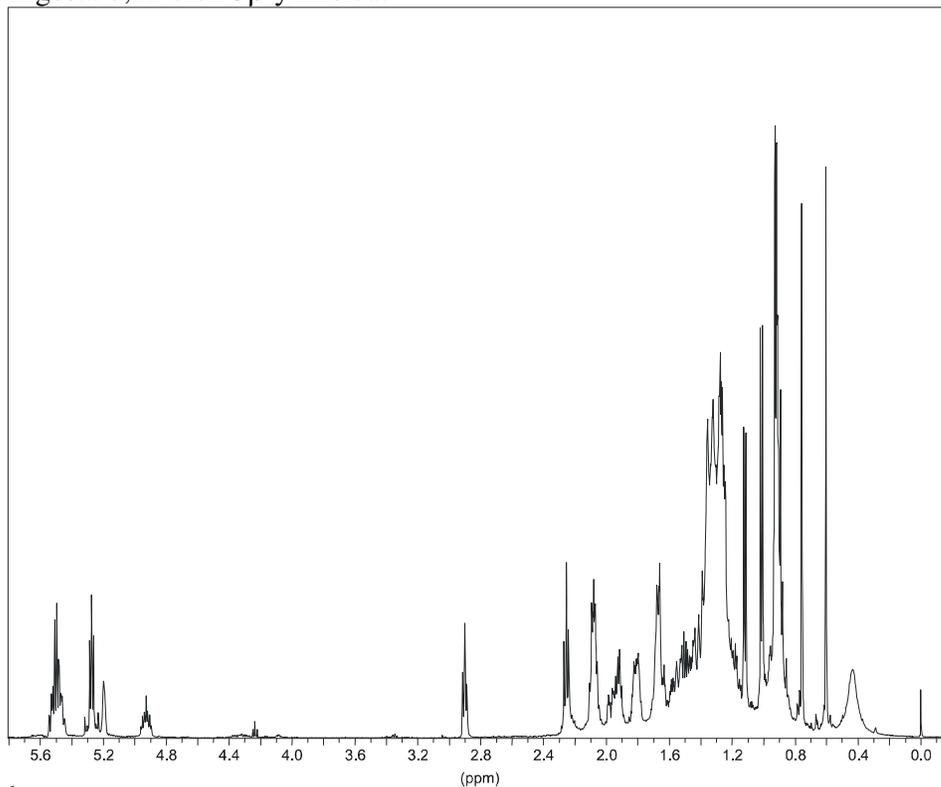
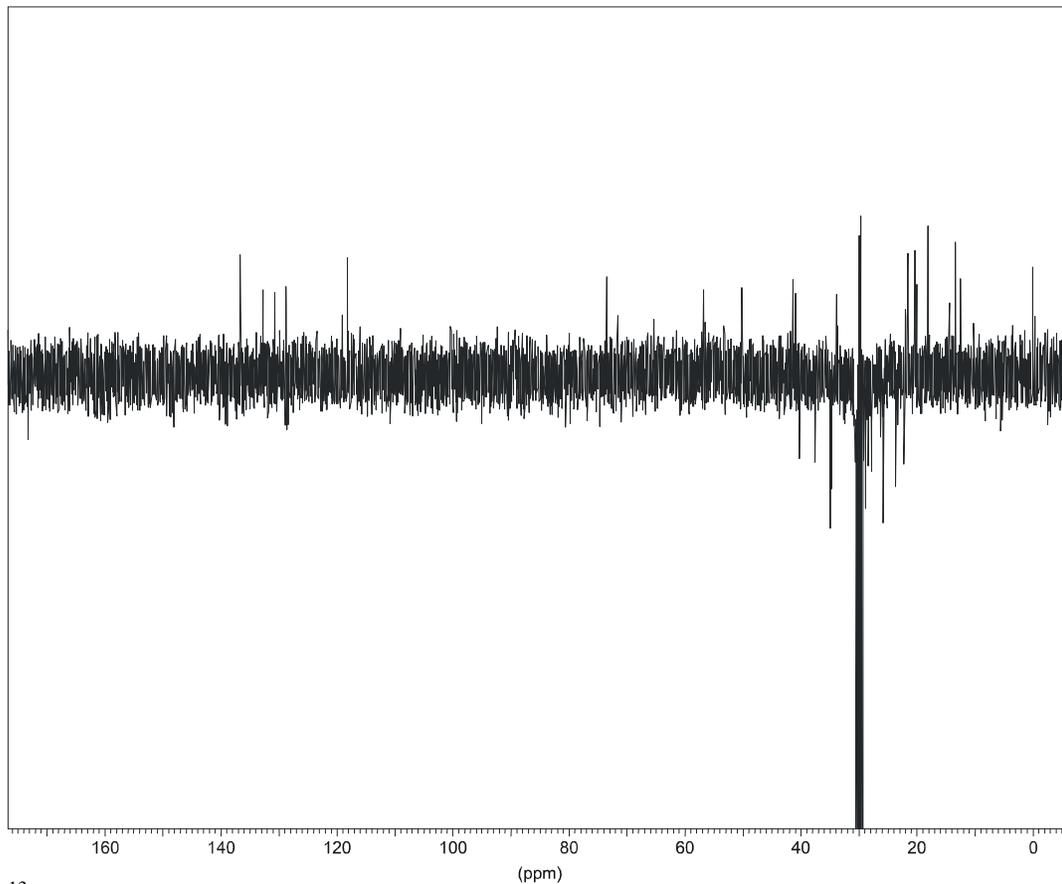


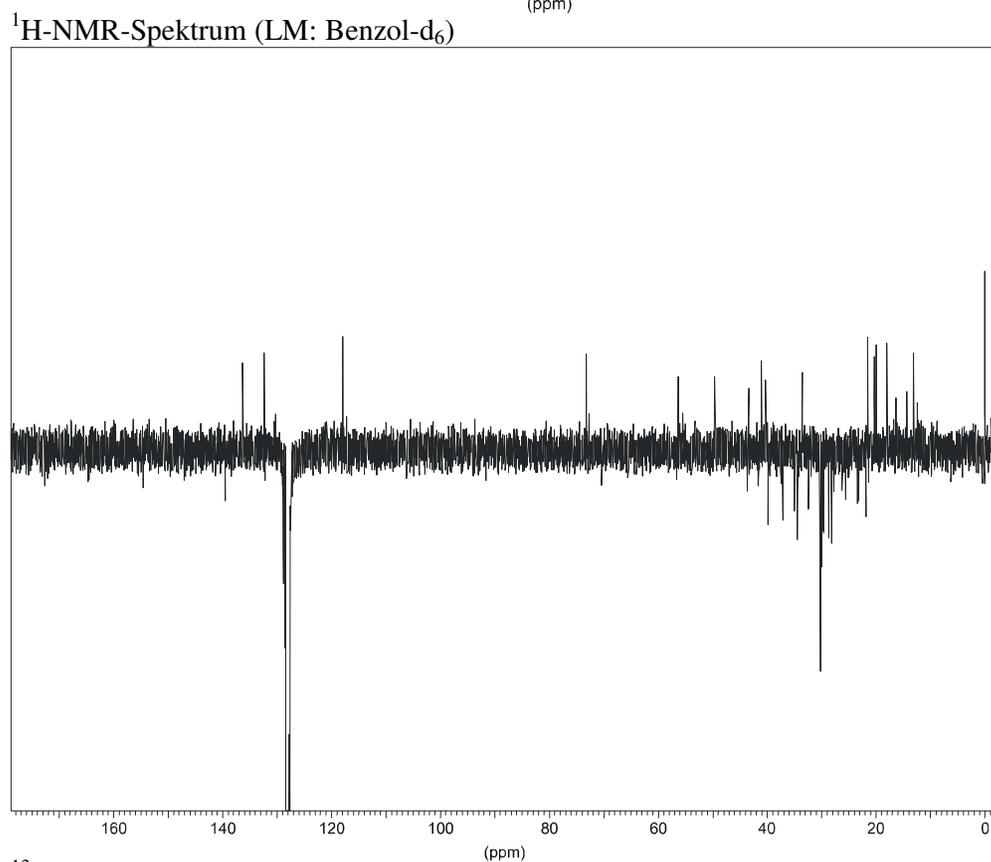
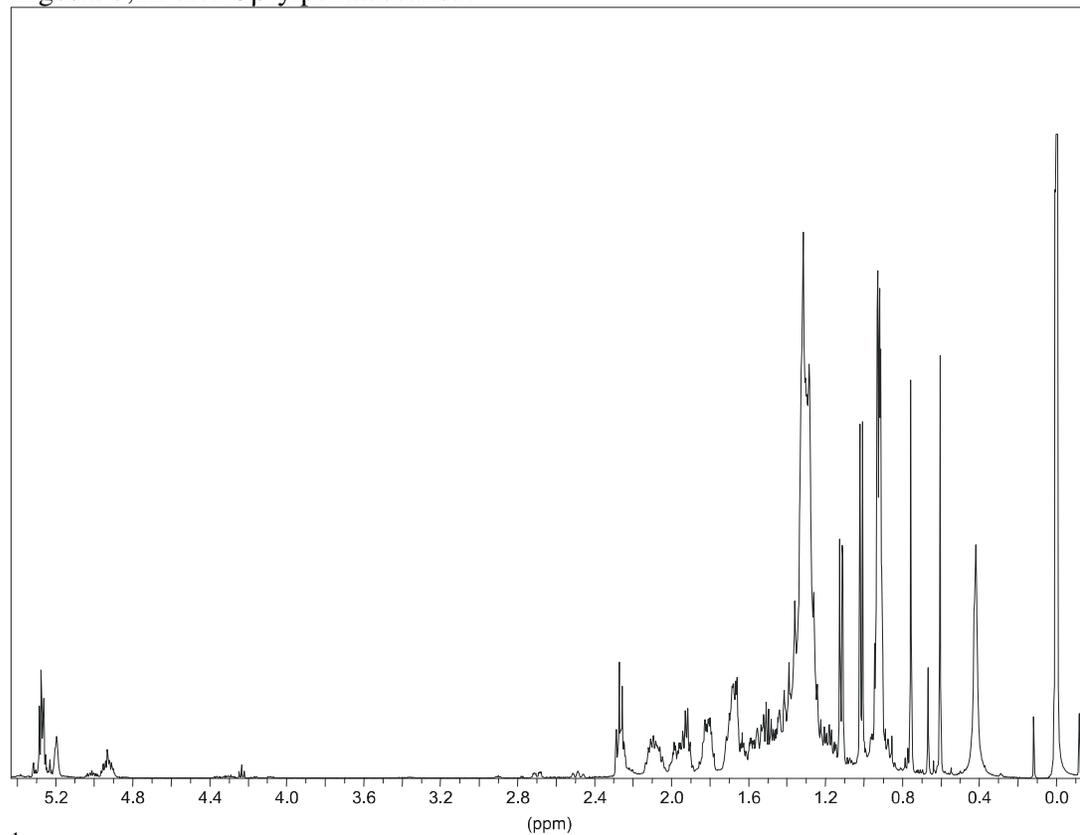
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (LM: Benzol-d<sub>6</sub>)

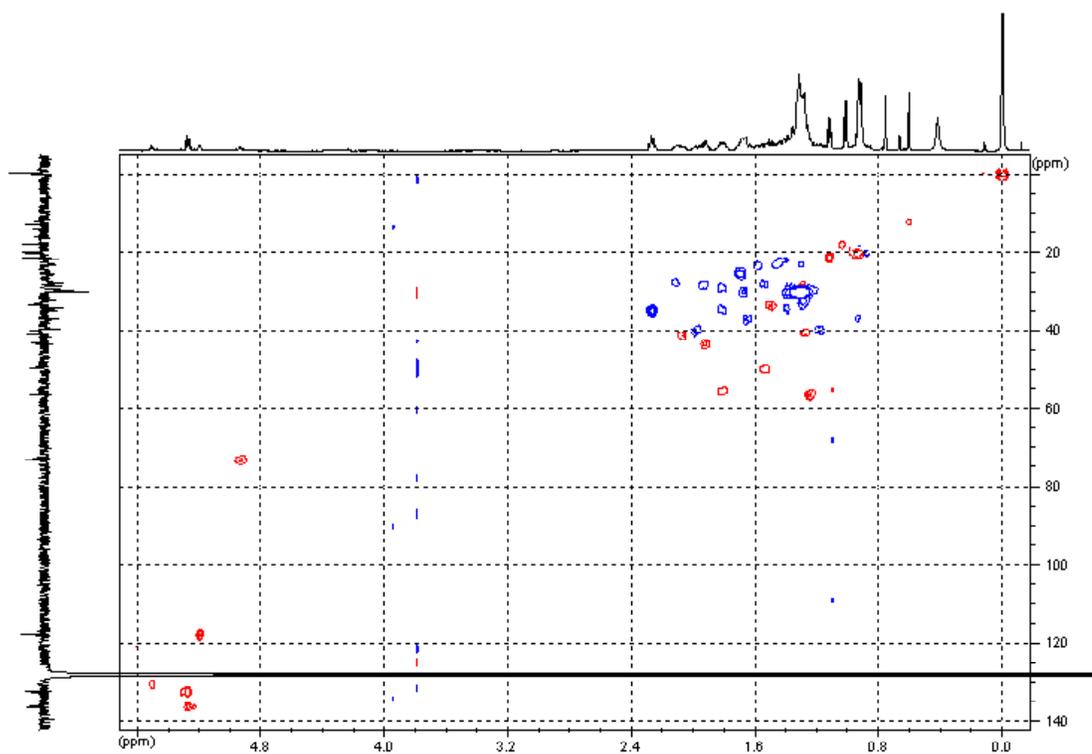
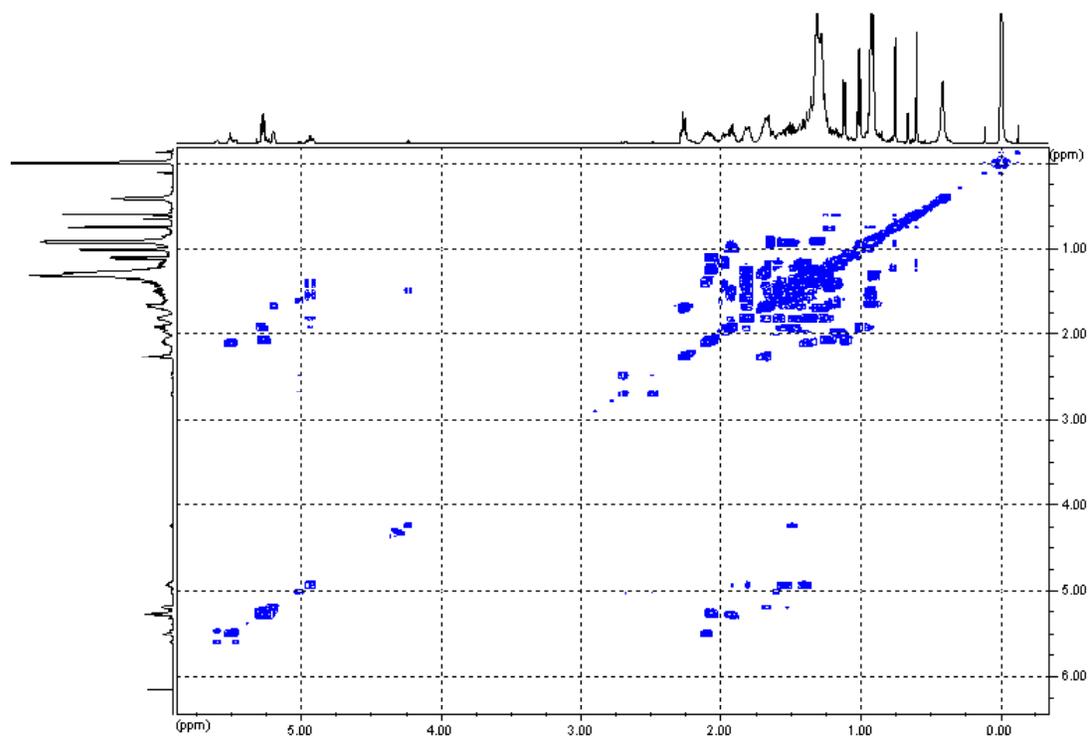


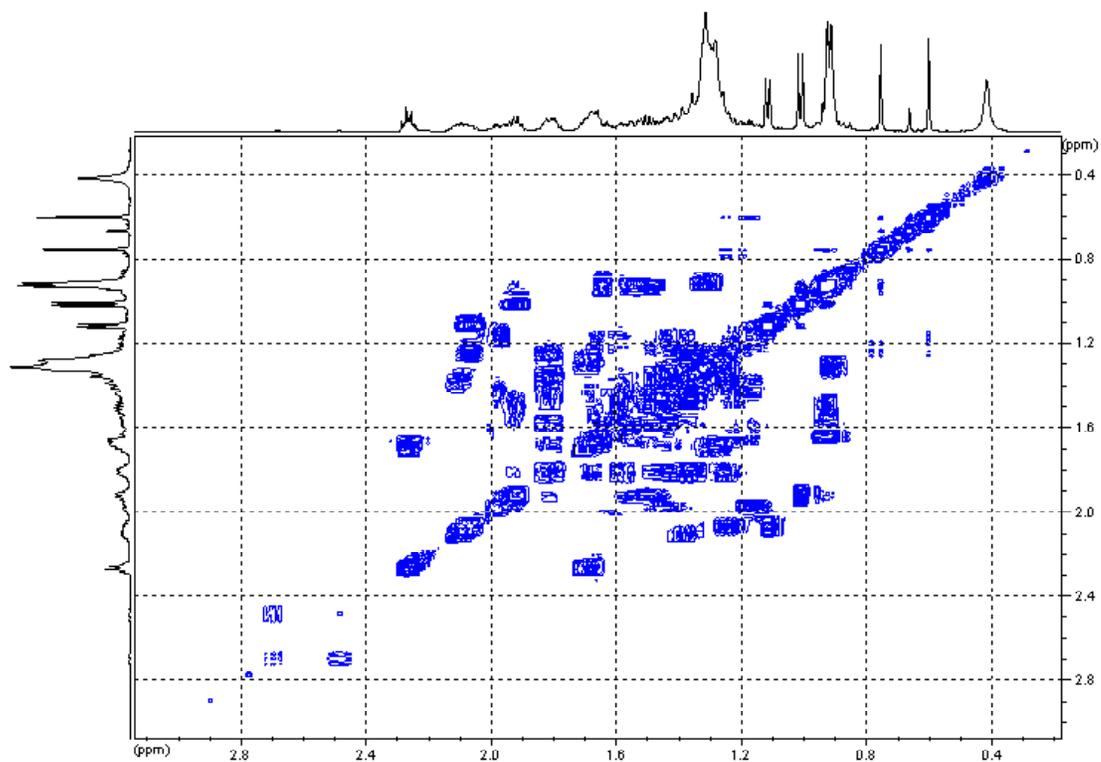
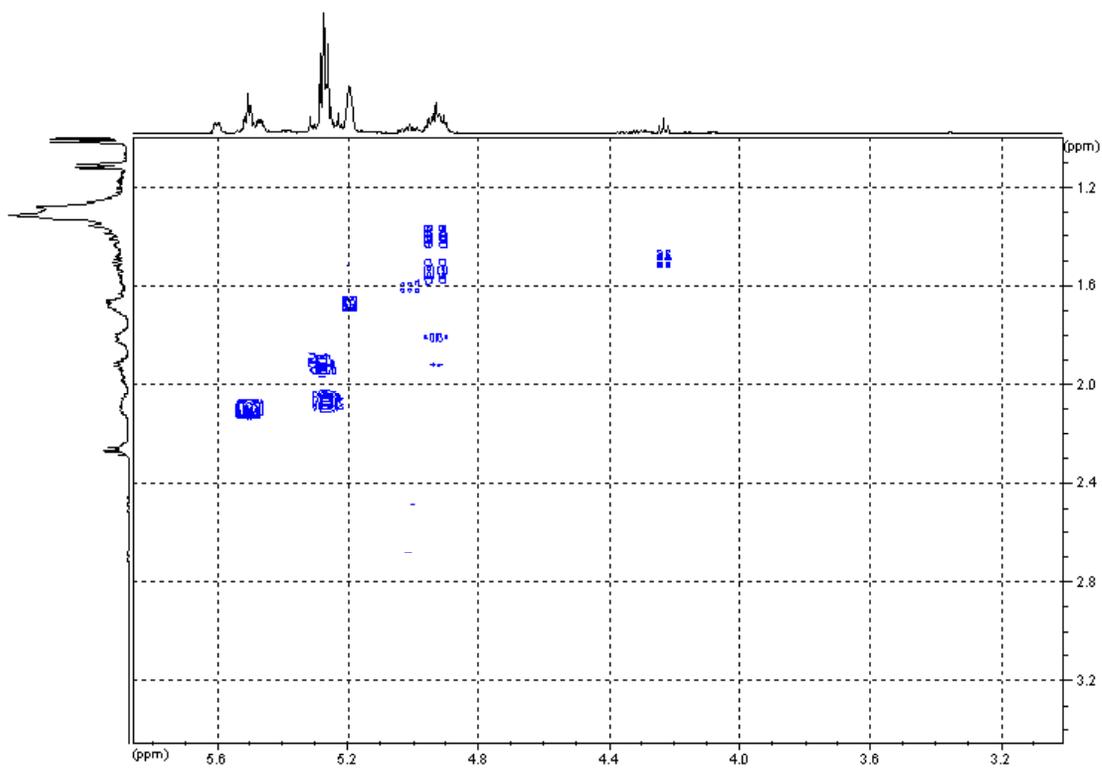
<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (LM: Benzol-d<sub>6</sub>)

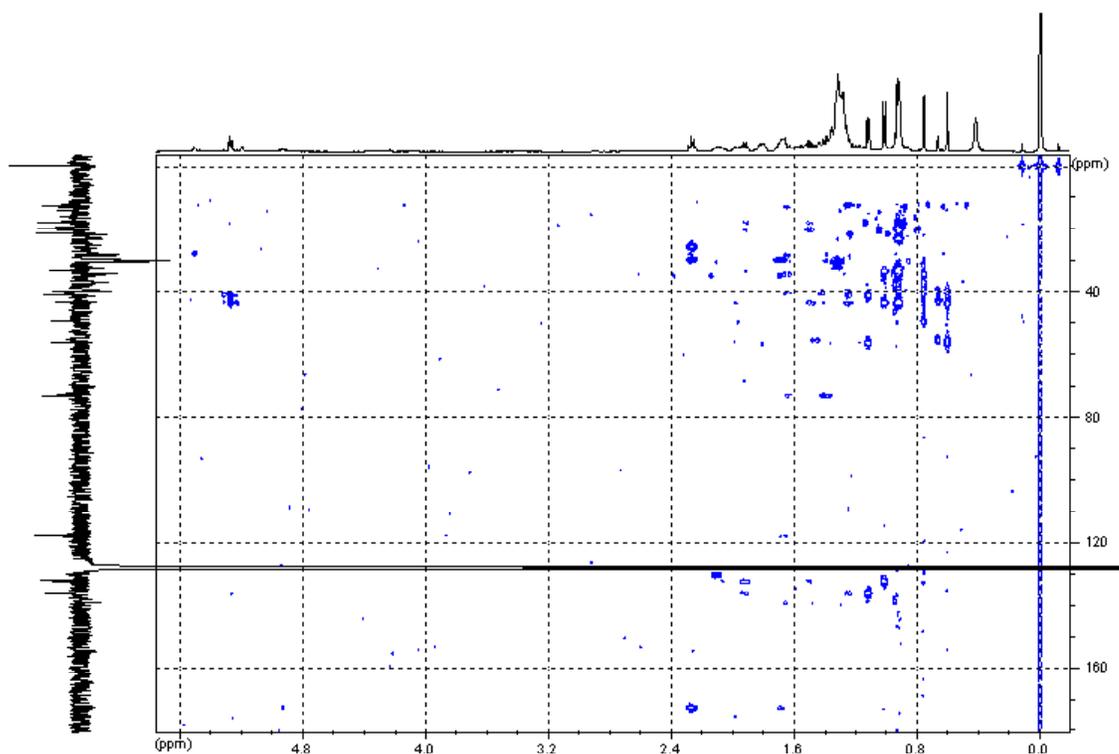
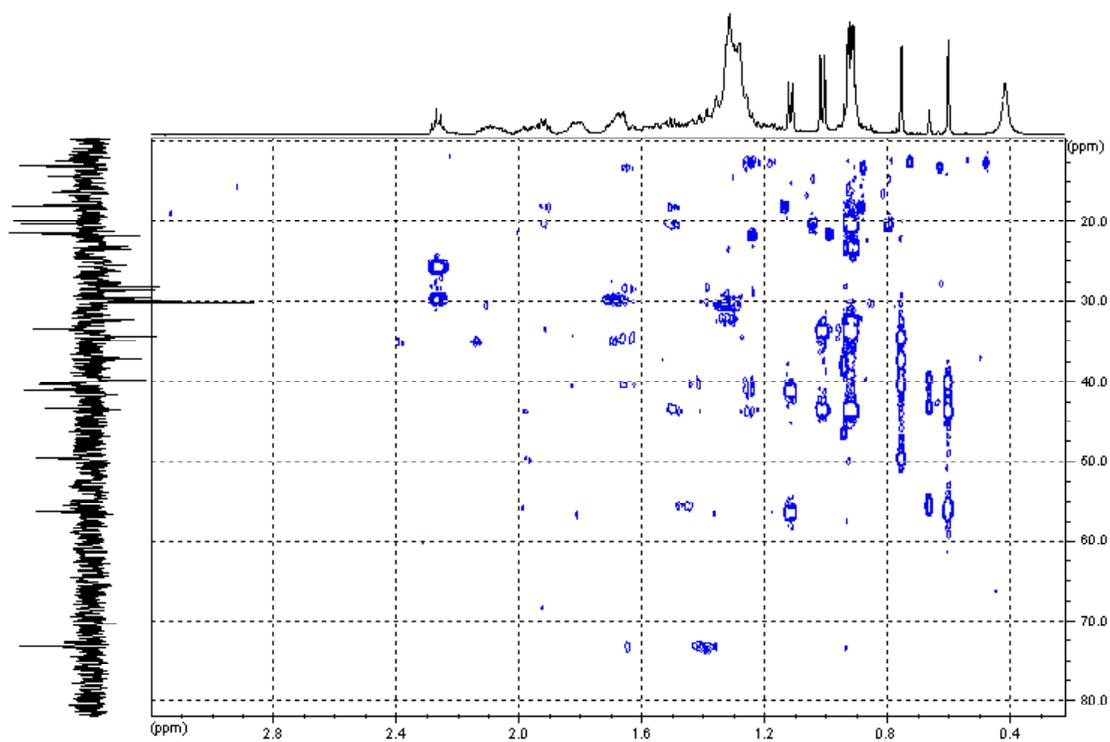
\*: Messbedingungen s. 6.4

Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -yllinoleat $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum(LM: Benzol- $\text{d}_6$ ) $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (LM: Aceton- $\text{d}_6$ )

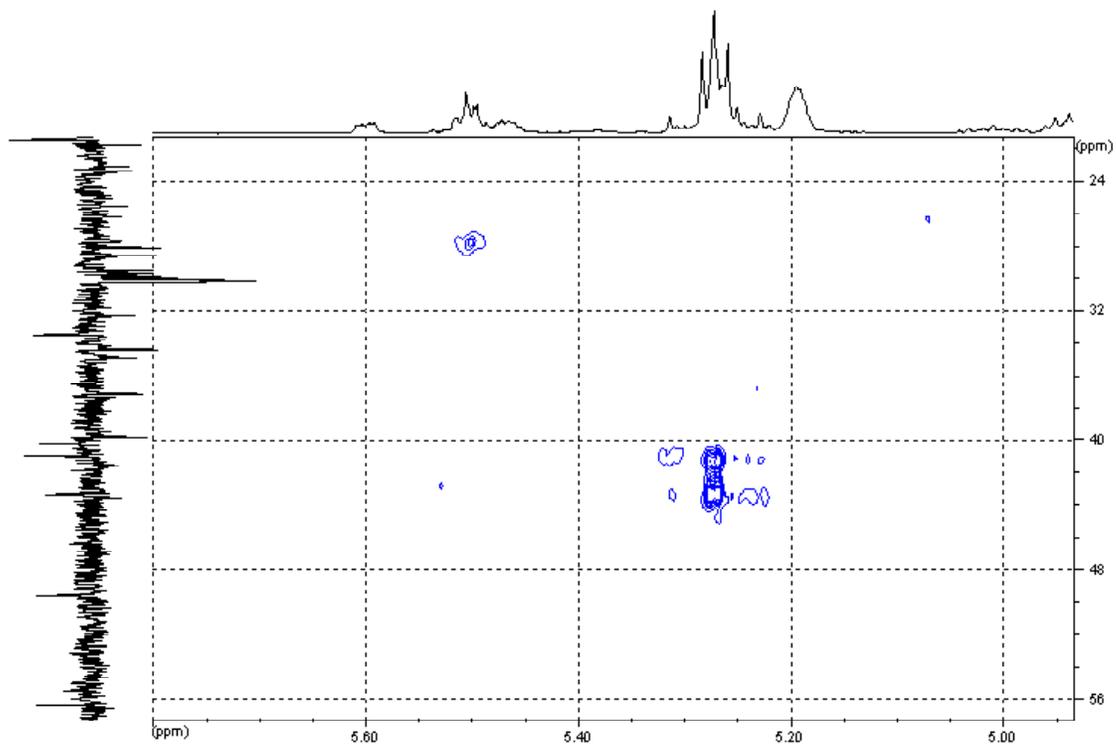
Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ylpentadecanoat

HMQC-Spektrum (LM: Benzol-d<sub>6</sub>) $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (LM: Benzol-d<sub>6</sub>)

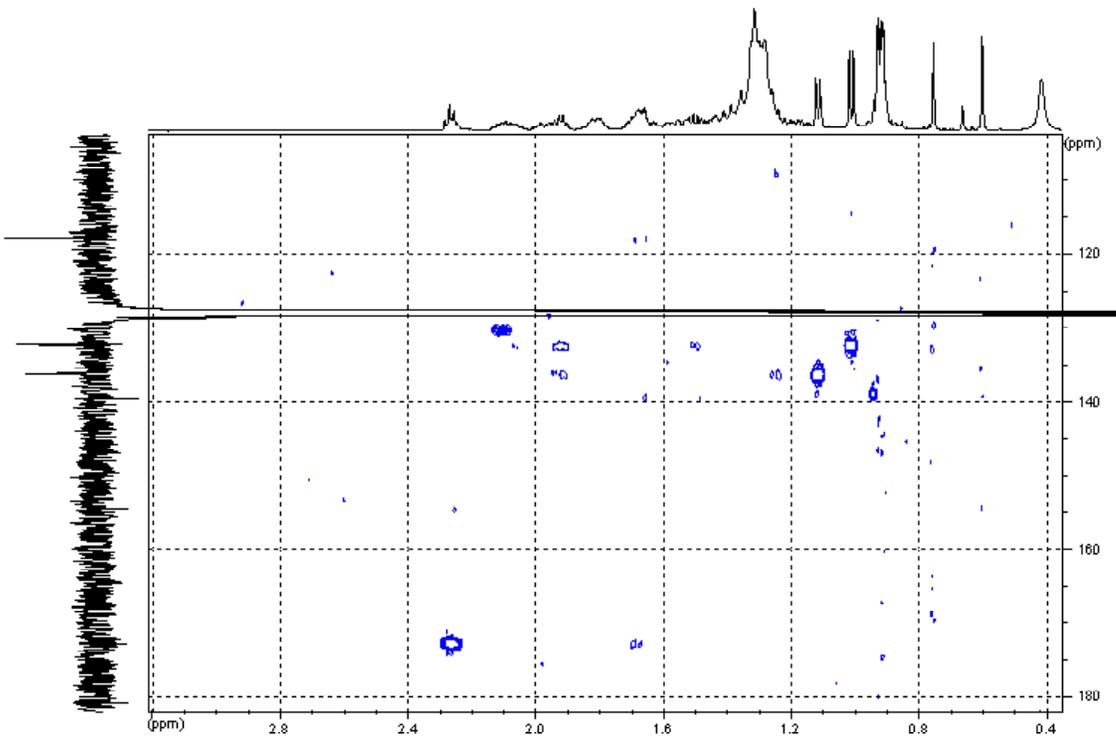
 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Ausschnitt) $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Ausschnitt)

HMBC-Spektrum (LM: Benzol-d<sub>6</sub>)

HMBC-Spektrum (Ausschnitt)

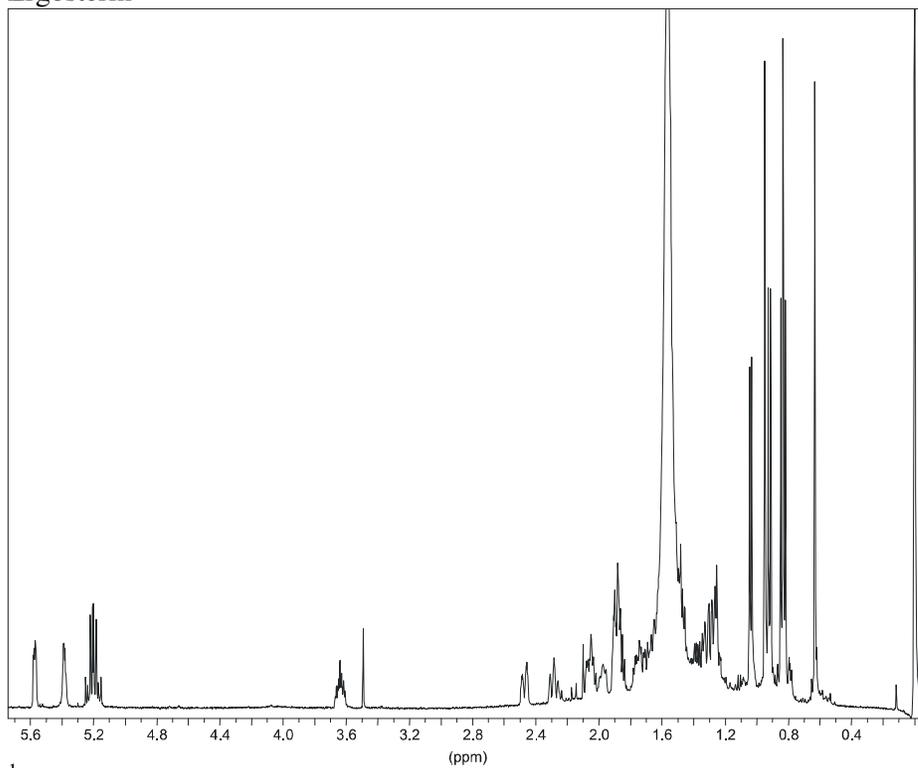
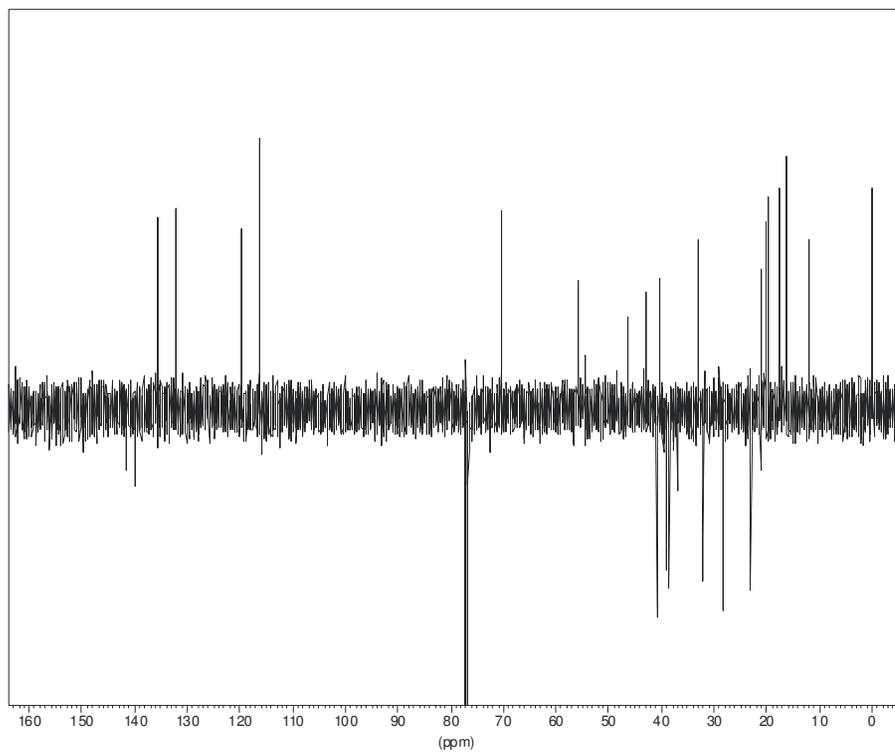


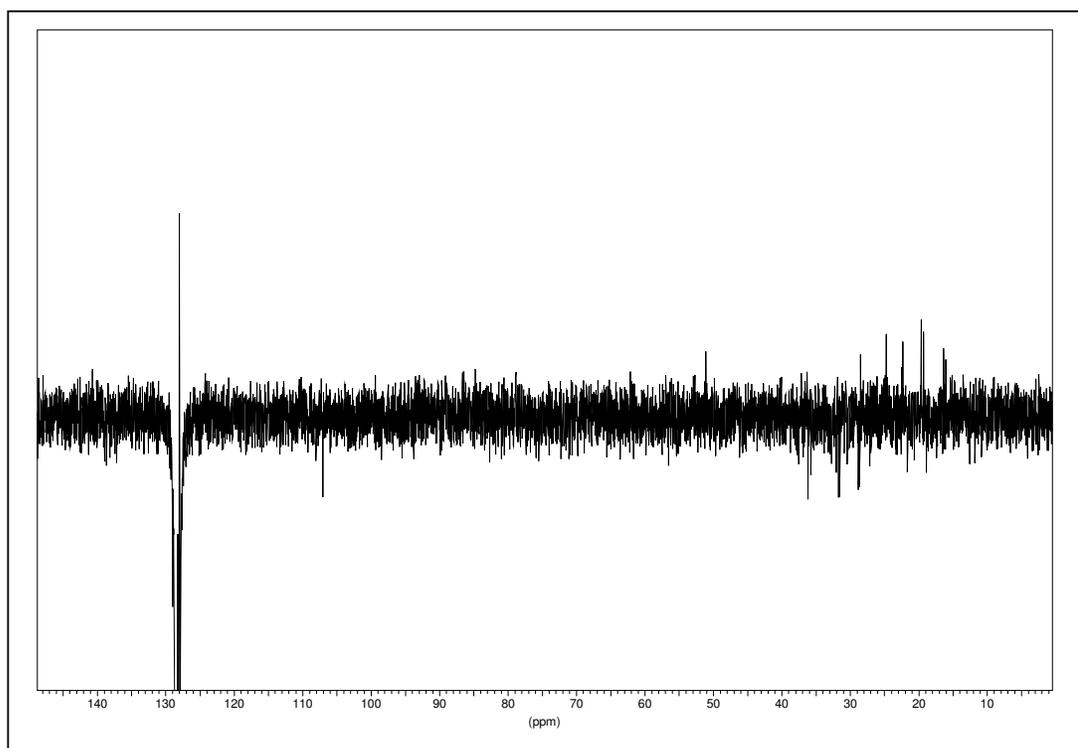
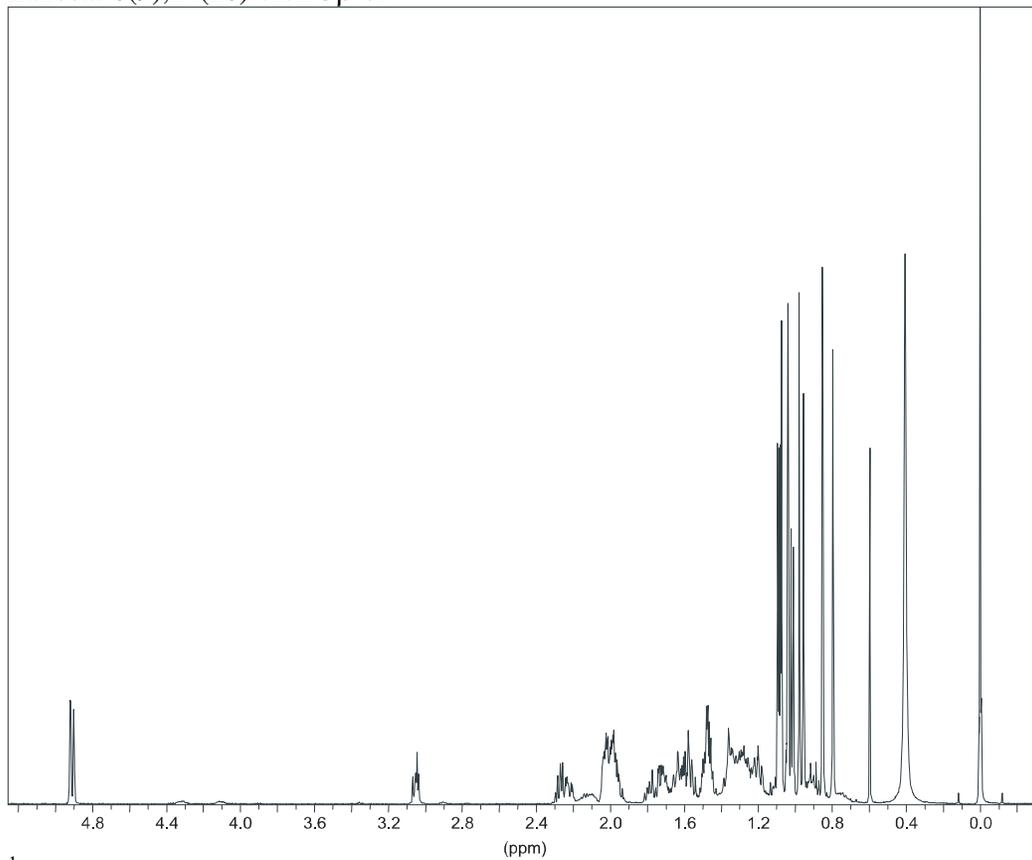
HMBC-Spektrum (Ausschnitt)



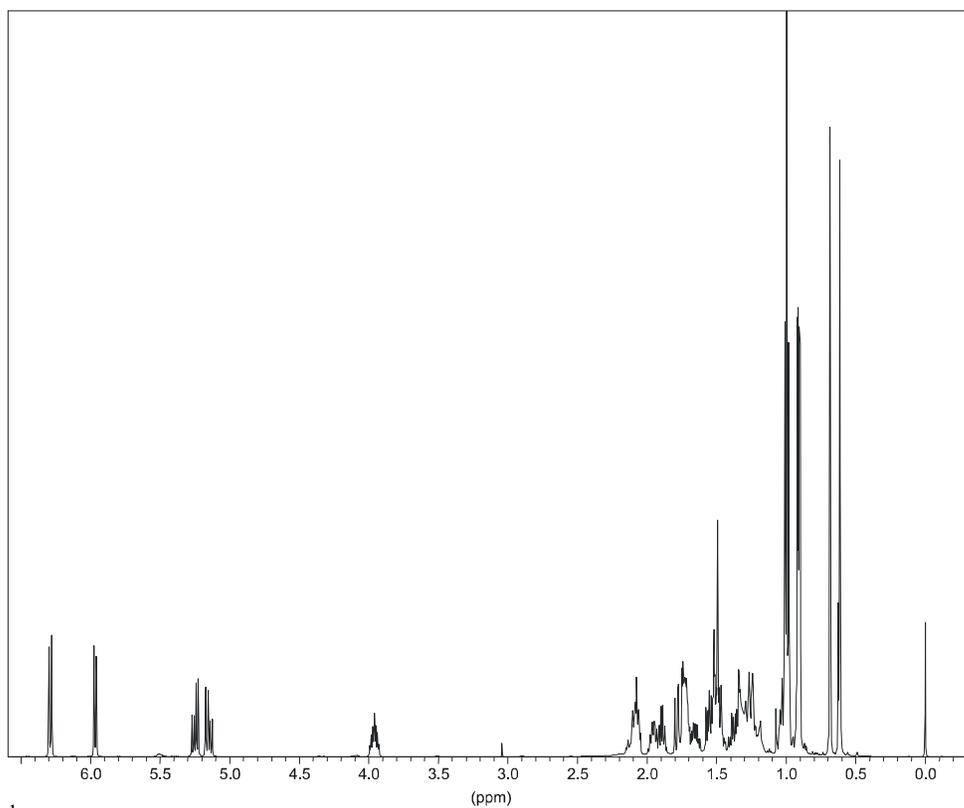
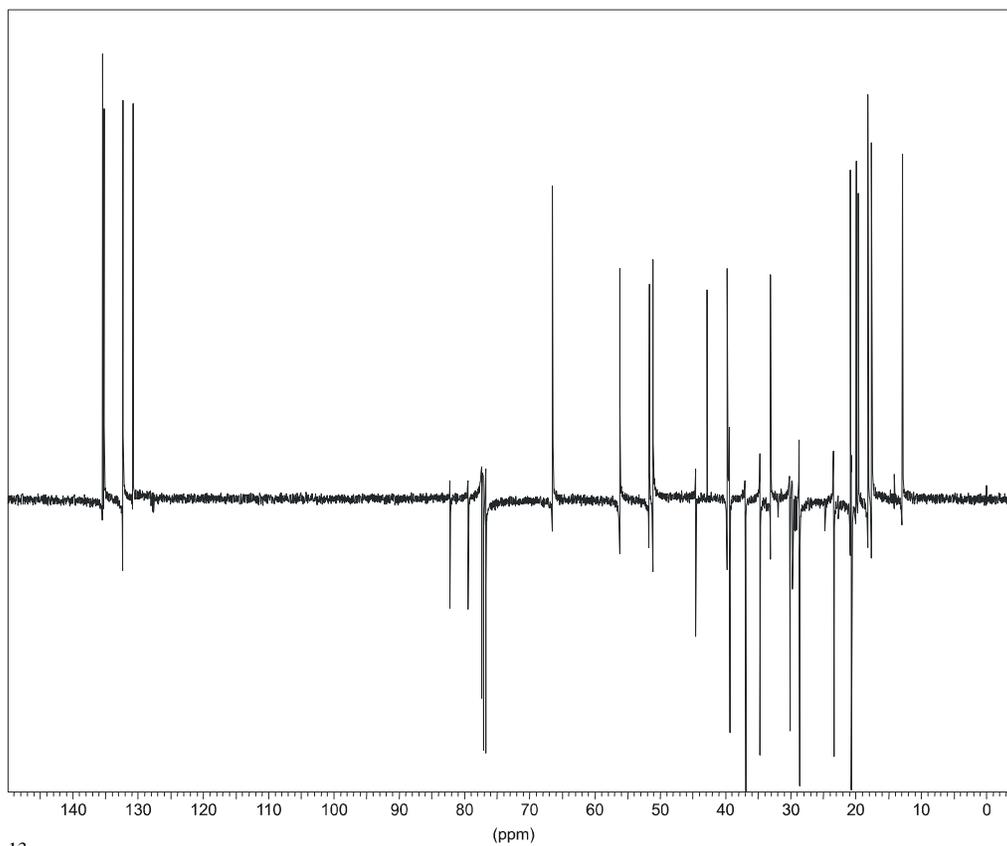
HMBC-Spektrum (Ausschnitt)

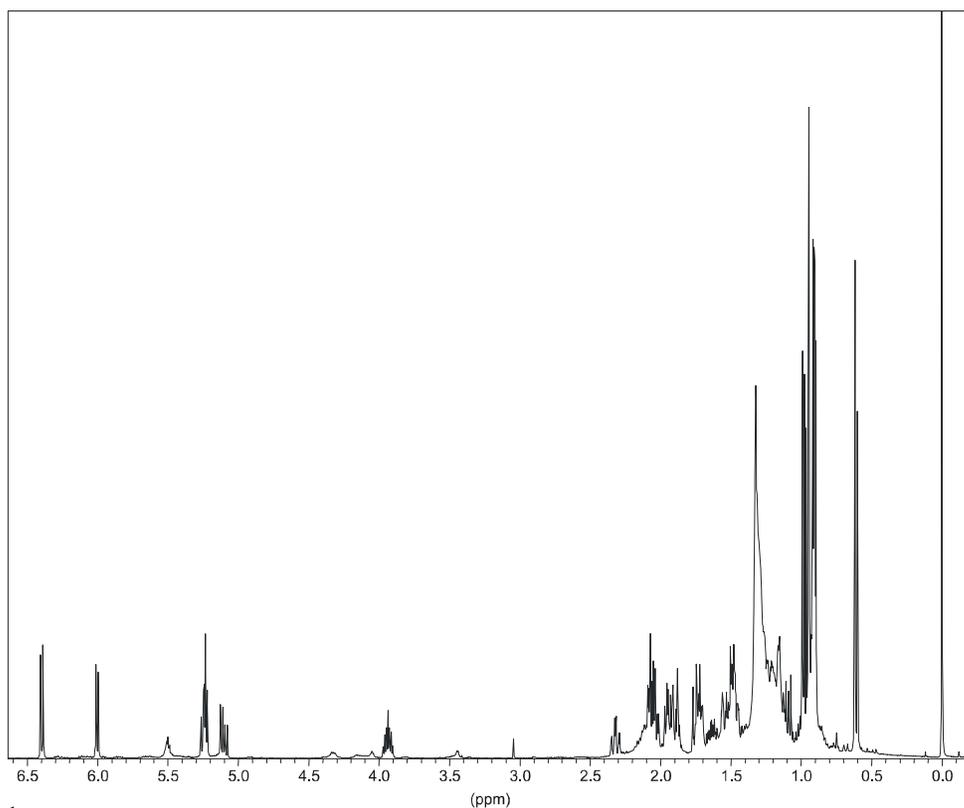
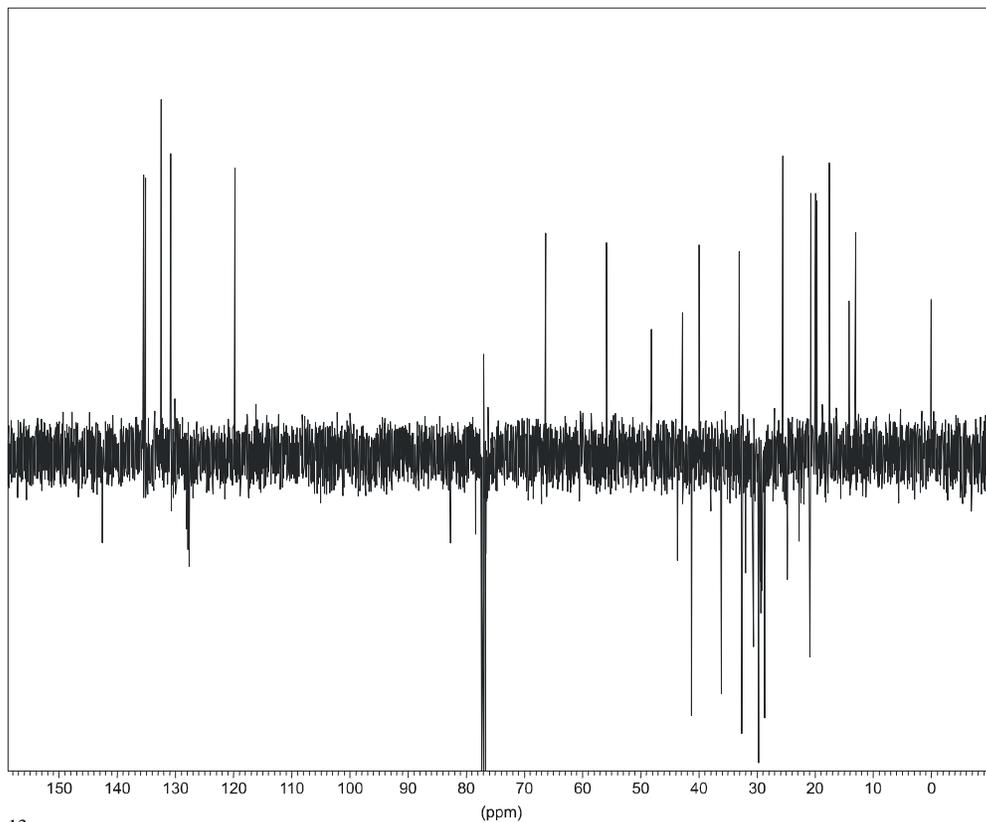
## Ergosterin

 $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (LM: Chloroform- $\text{d}_1$ ) $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (LM: Chloroform- $\text{d}_1$ )

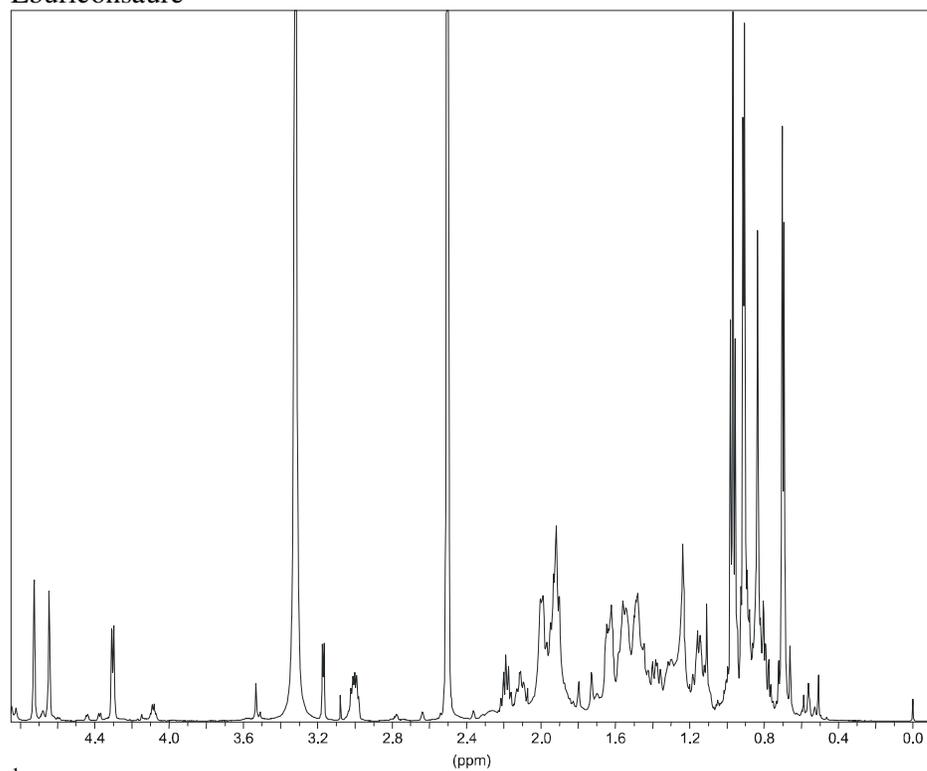
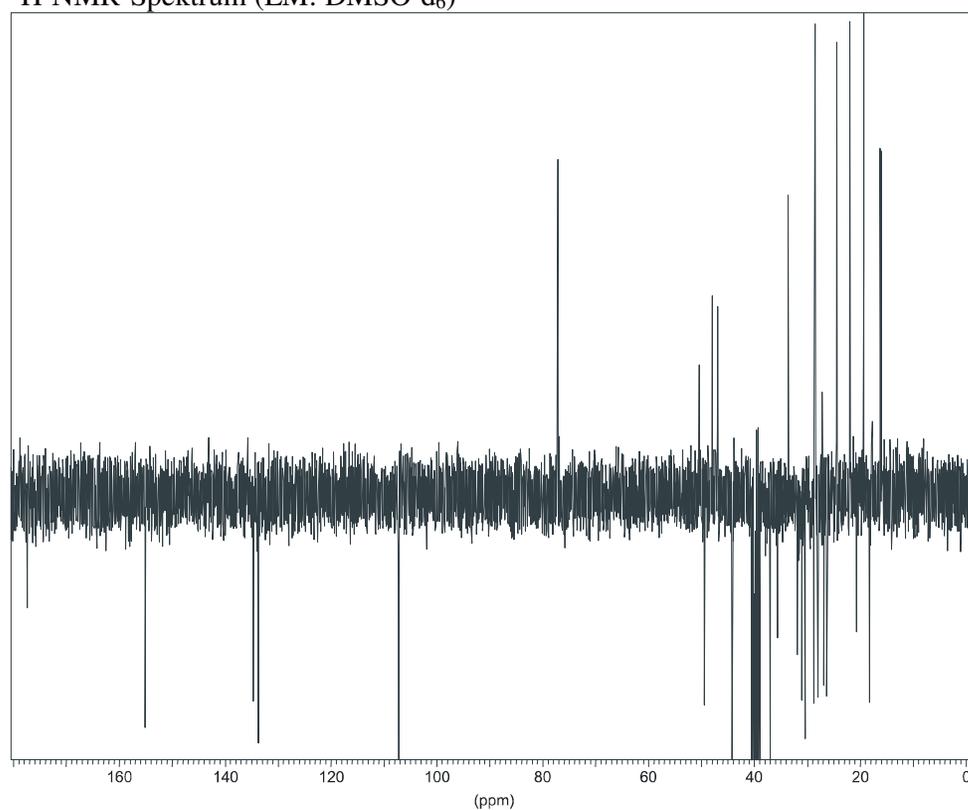
Lanosta-8(9),24(28)-dien-3 $\beta$ -ol

## Ergosterolperoxid

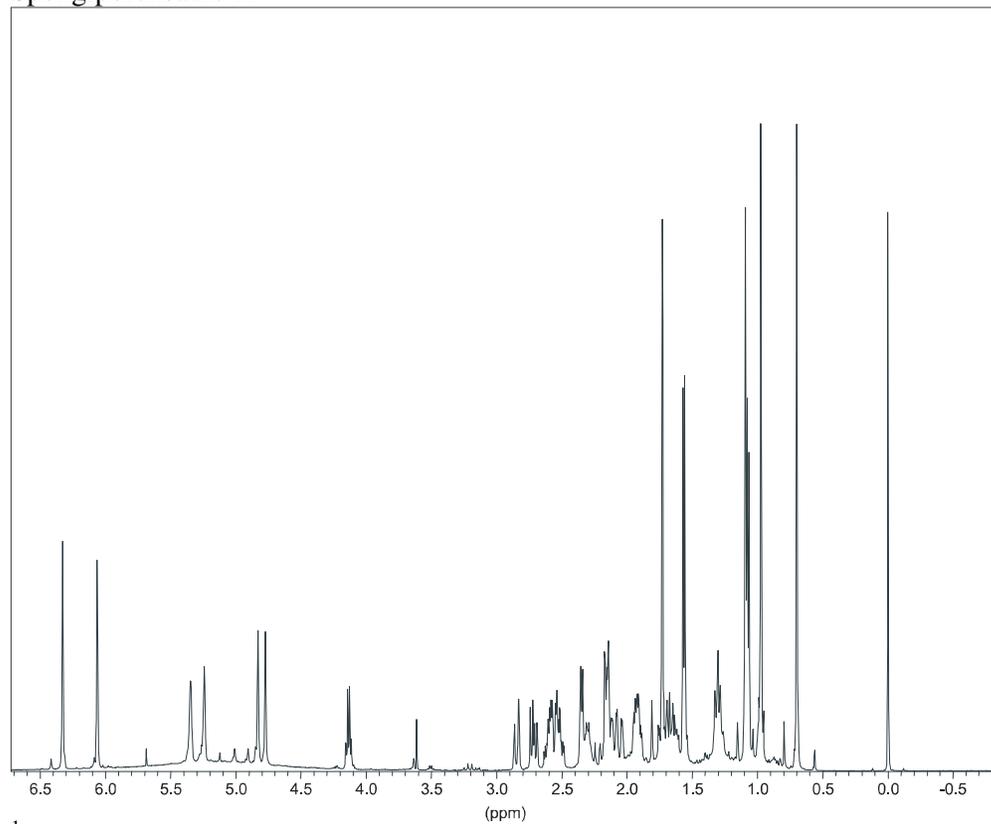
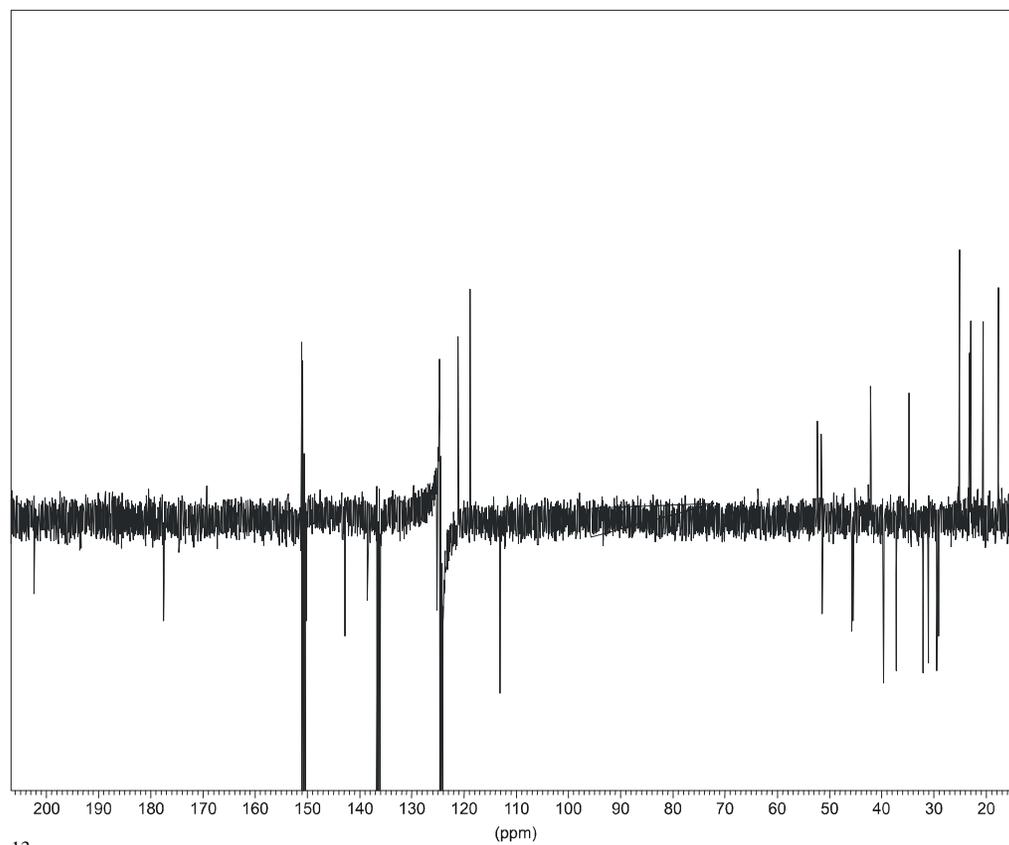
 $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (LM: Chloroform- $d_1$ ) $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (LM: Chloroform- $d_1$ )

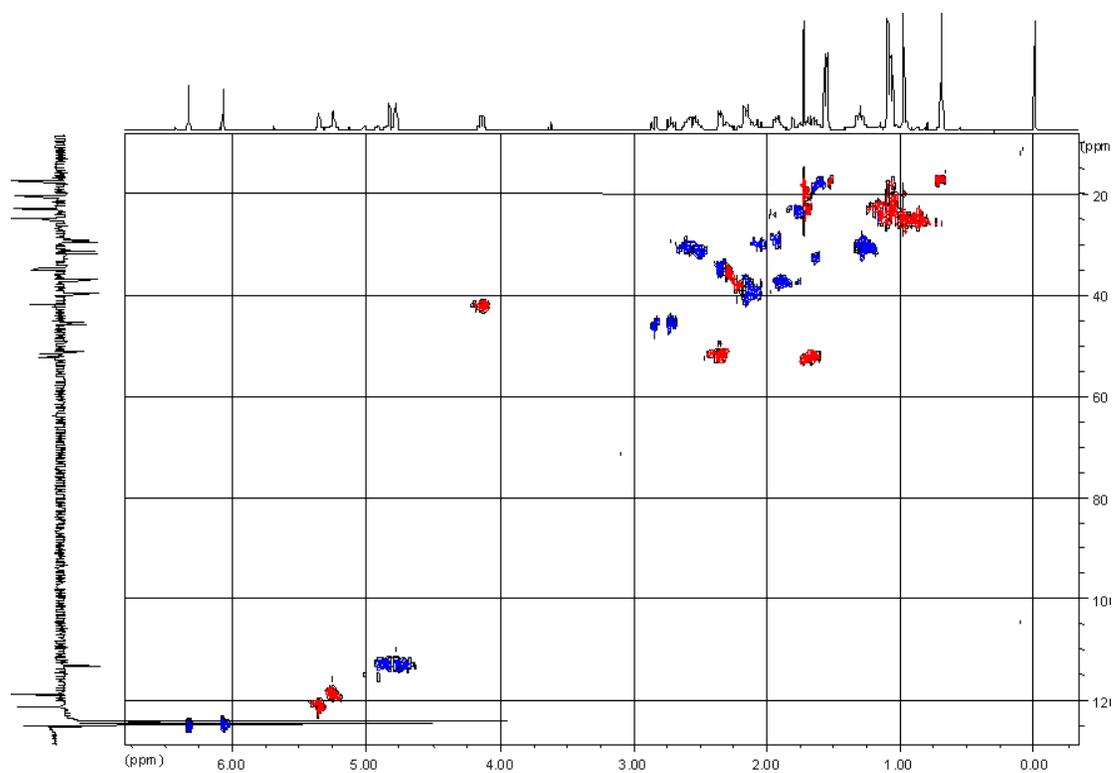
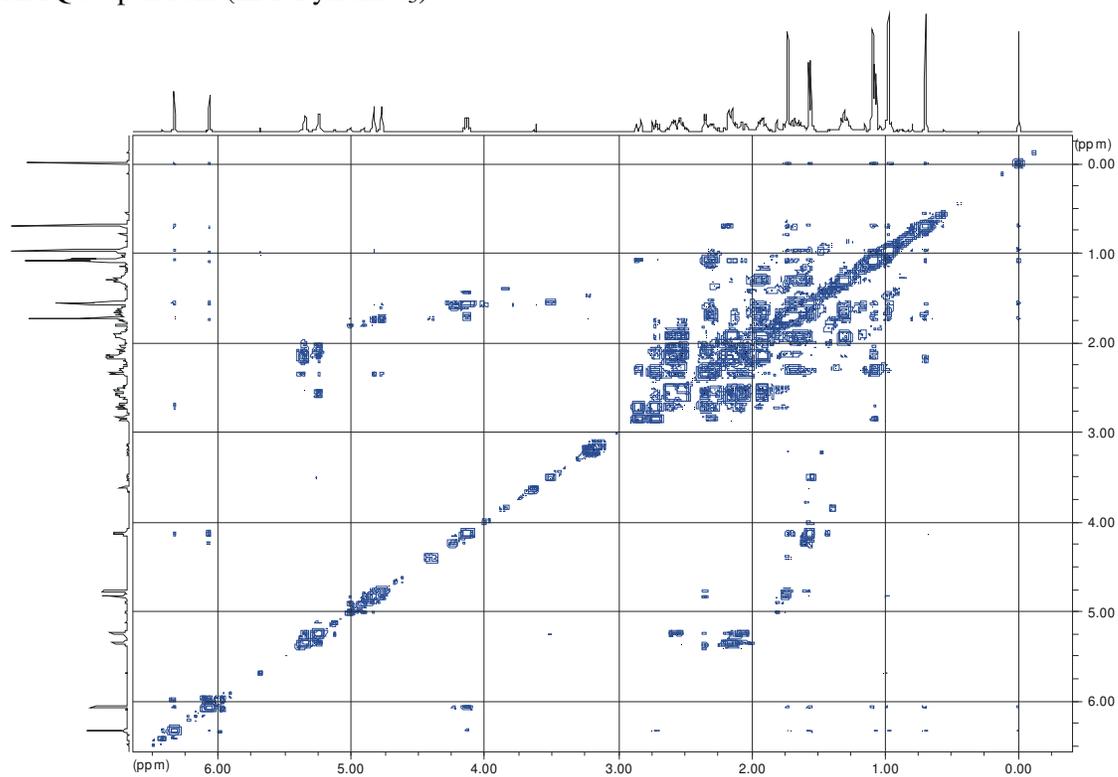
5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (LM: Chloroform- $d_1$ ) $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (LM: Chloroform- $d_1$ )

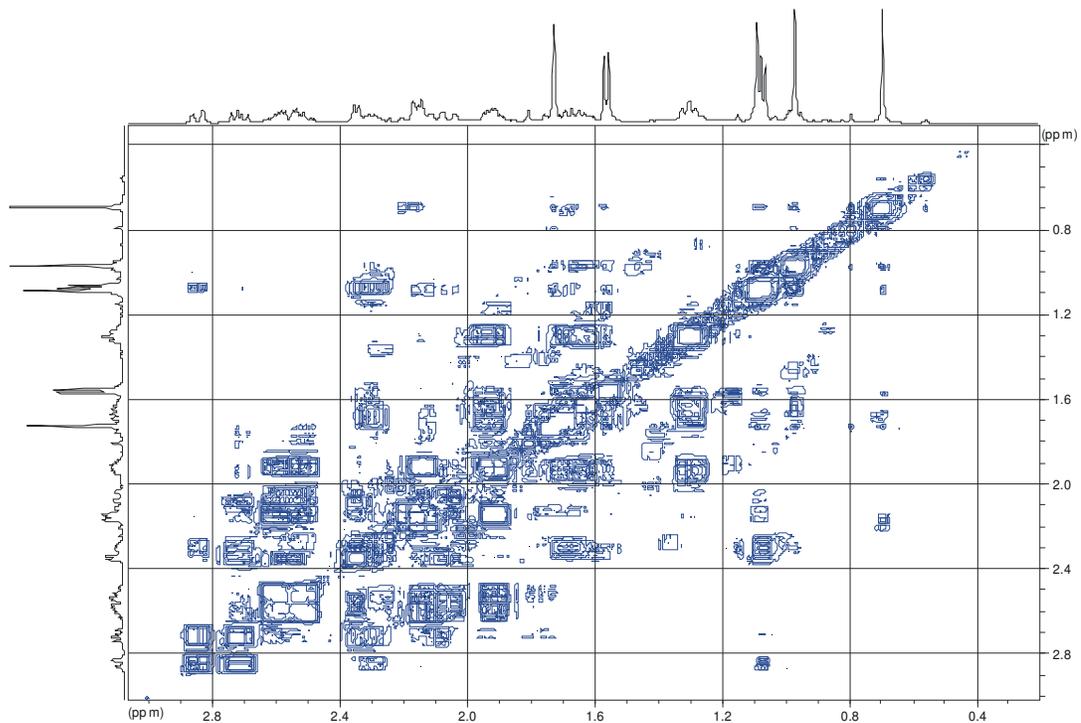
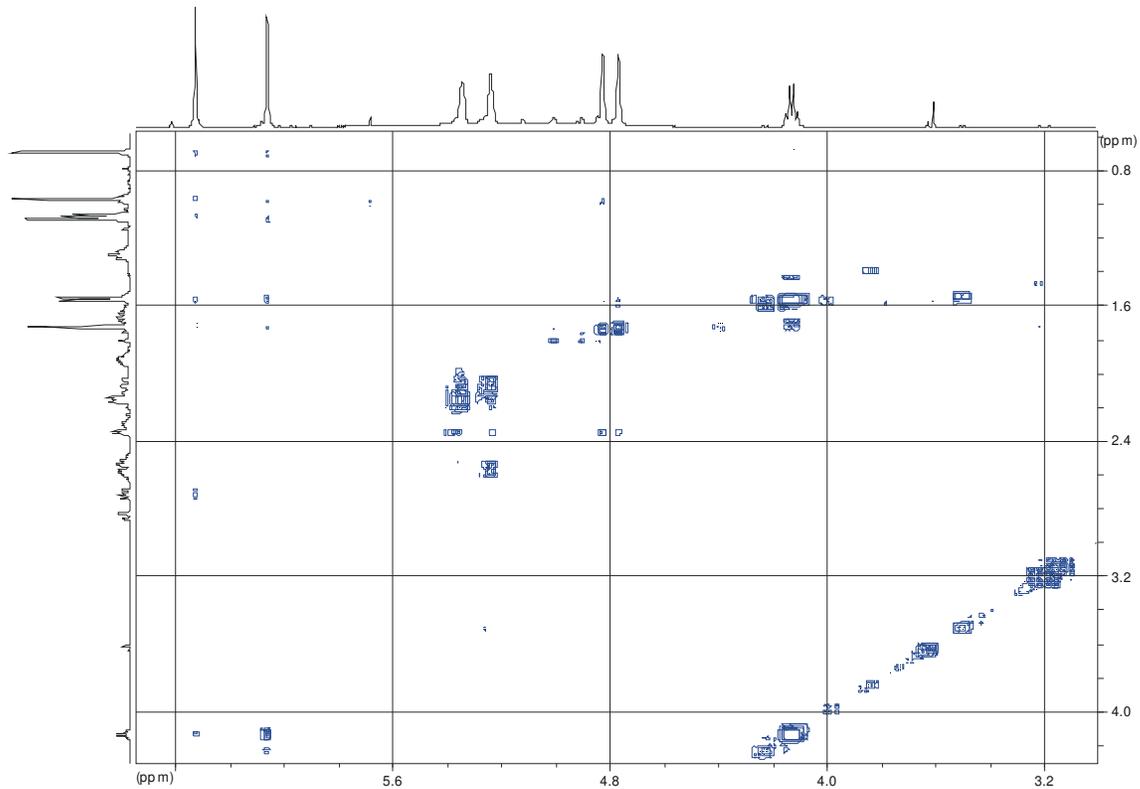
## Eburiconsäure

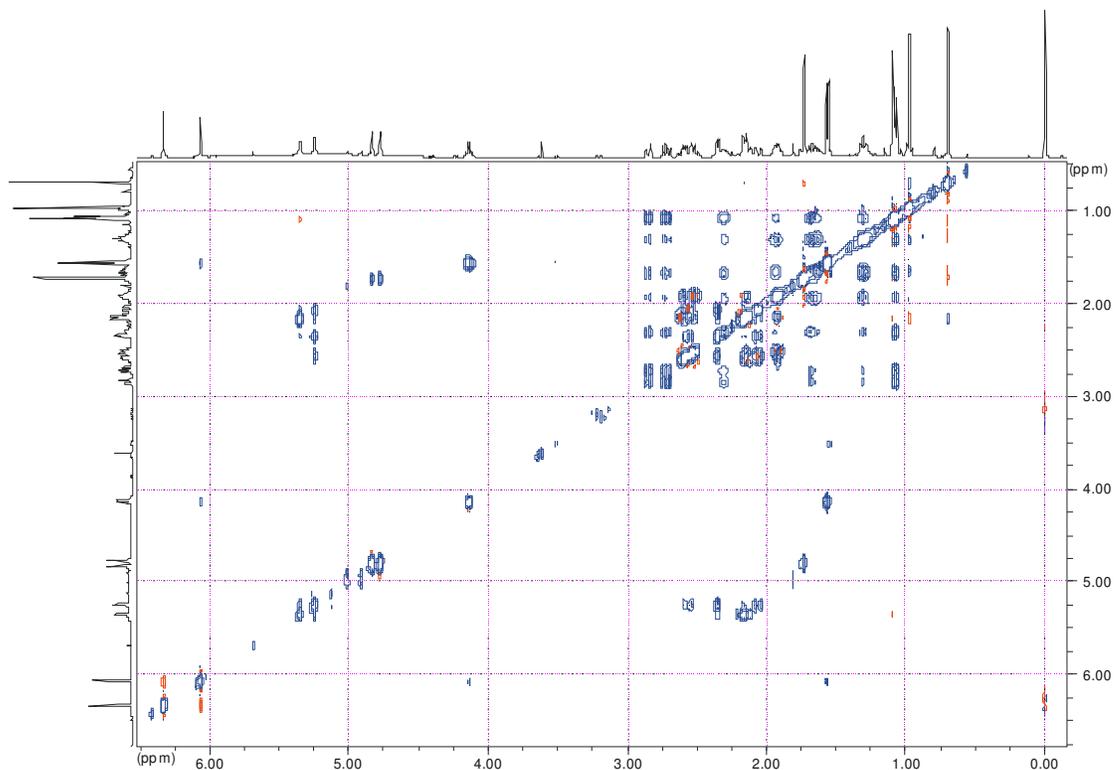
 $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (LM: DMSO- $\text{d}_6$ ) $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (LM: DMSO- $\text{d}_6$ )

## Spongiporensäure A

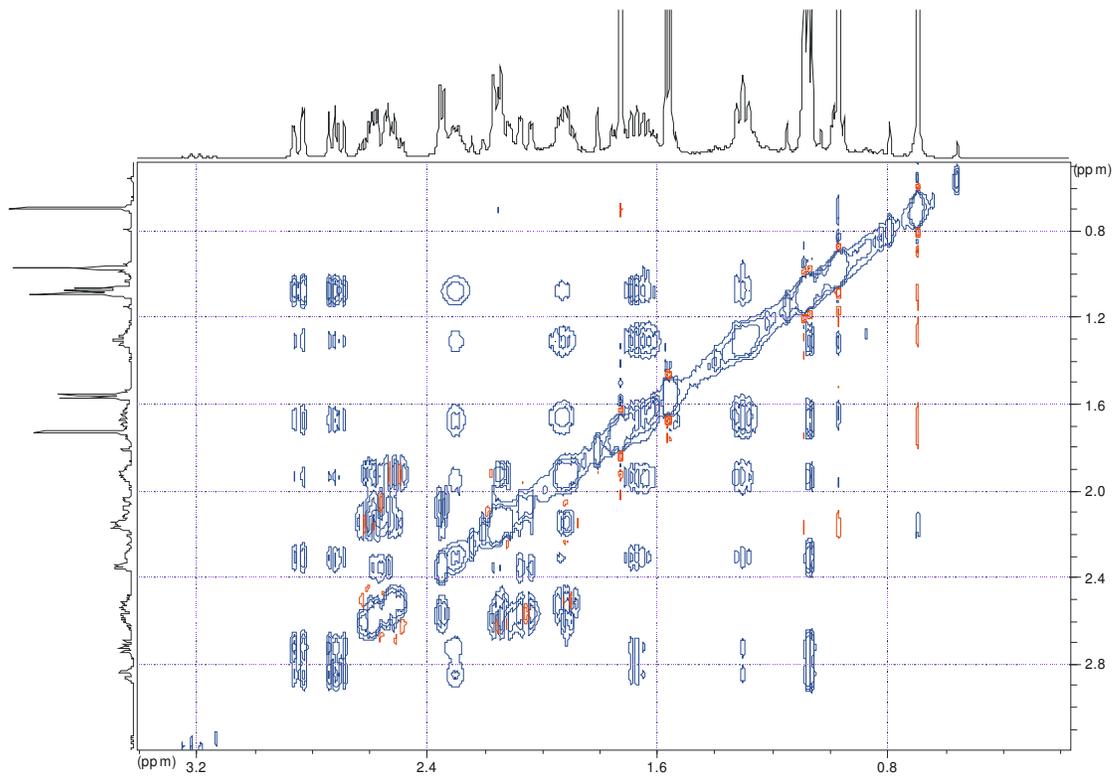
 $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (LM: Pyridin- $\text{d}_5$ ) $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (LM: Pyridin- $\text{d}_5$ )

HMQC-Spektrum (LM: Pyridin-d<sub>5</sub>)<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY-Spektrum (LM: Pyridin-d<sub>5</sub>)

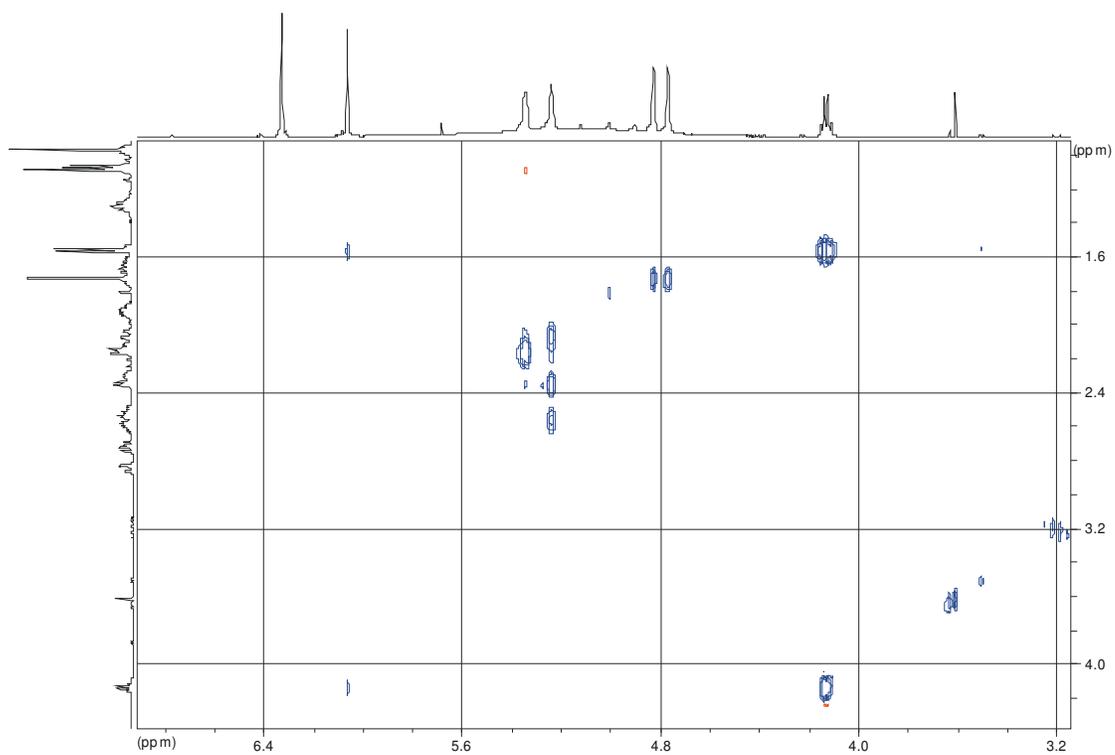
 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Ausschnitt) $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Ausschnitt)



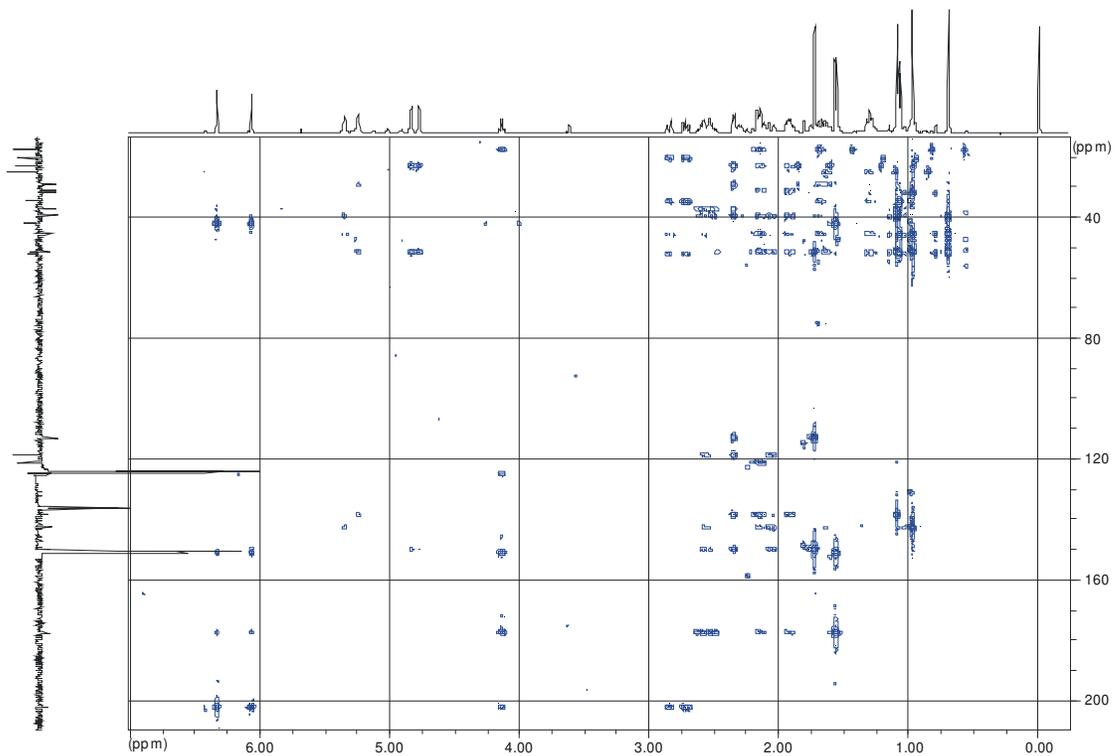
TOCSY-Spektrum (LM: Pyridin-d<sub>5</sub>)

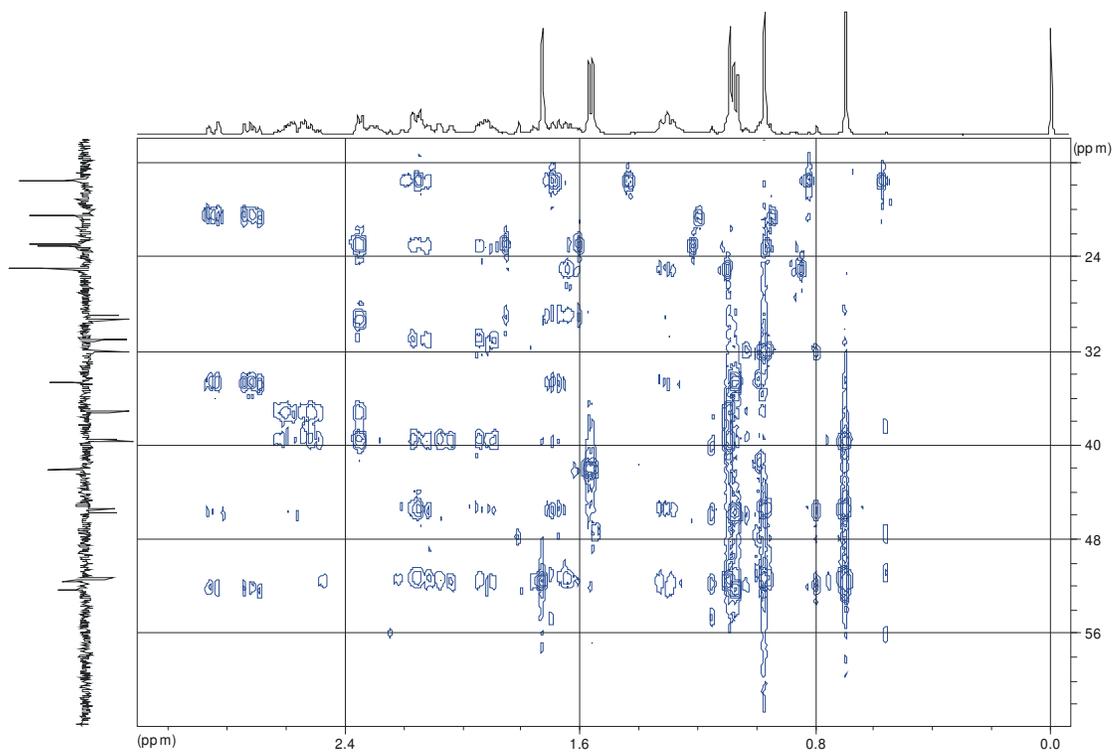


TOCSY-Spektrum (Ausschnitt)

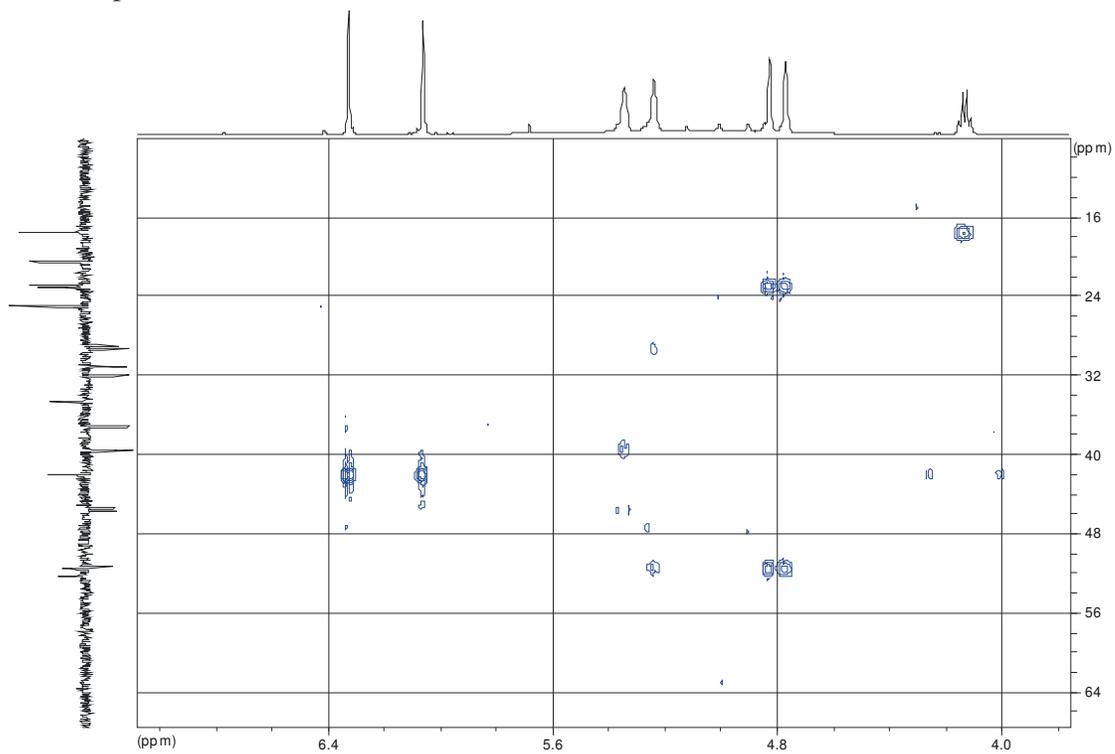


TOCSY-Spektrum (Ausschnitt)

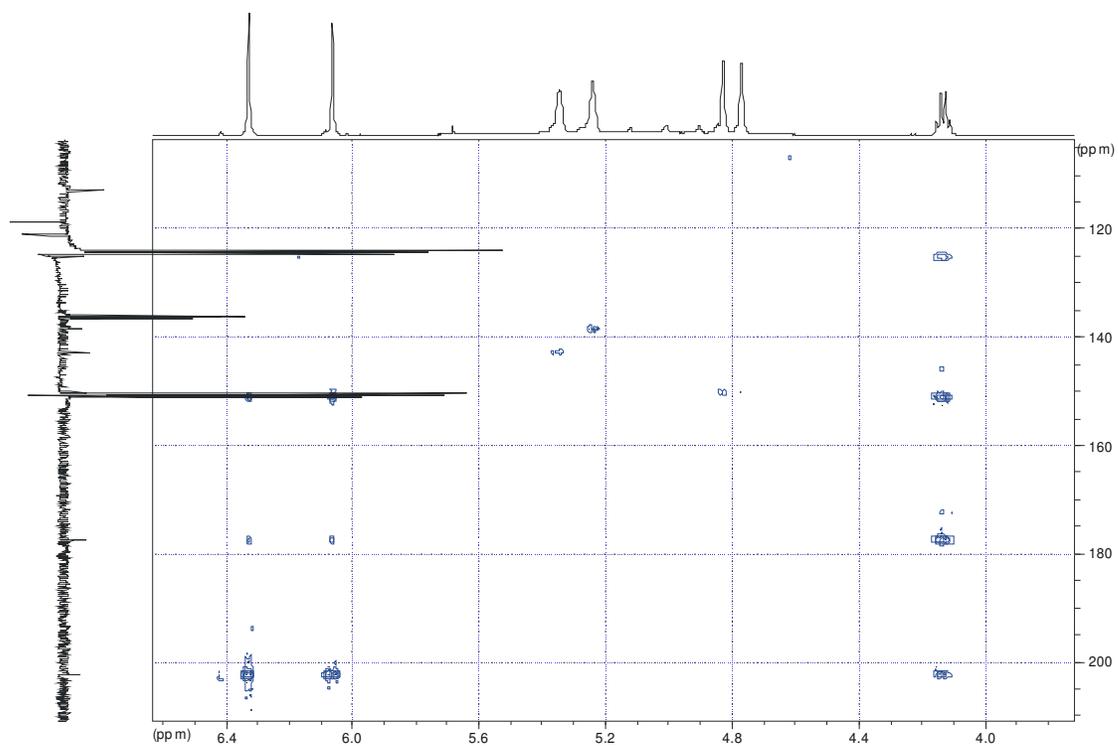
HMBC-Spektrum (LM: Pyridin-d<sub>5</sub>)



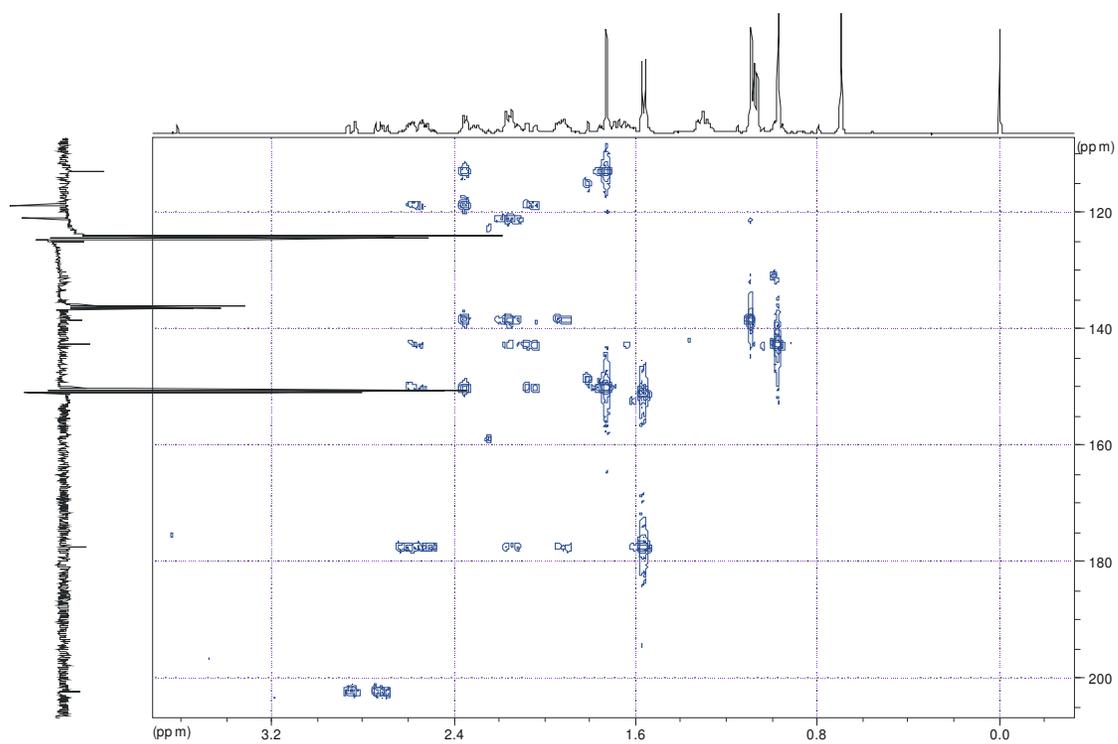
HMBC-Spektrum (Ausschnitt)



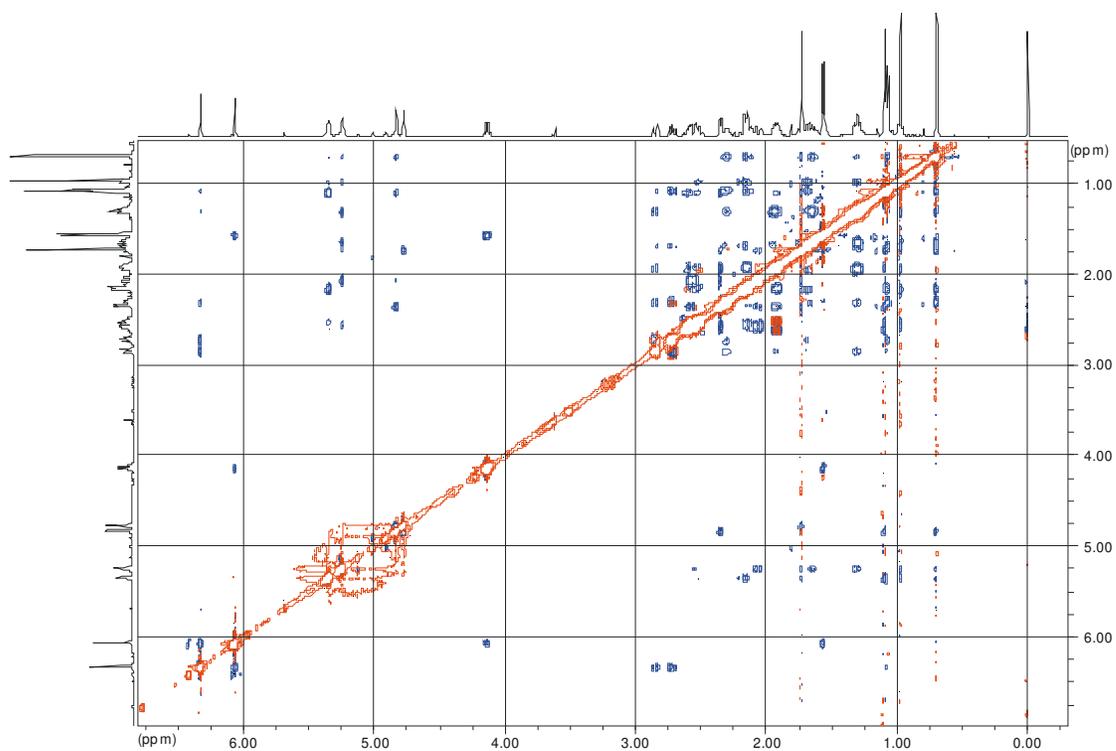
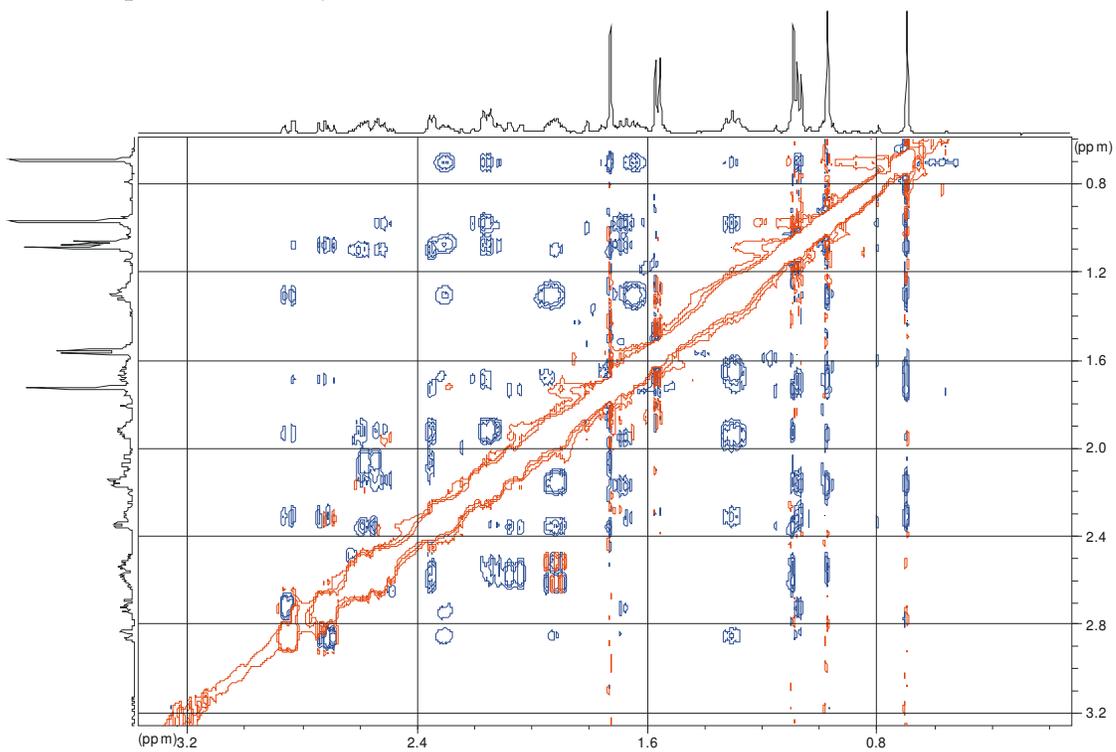
HMBC-Spektrum (Ausschnitt)



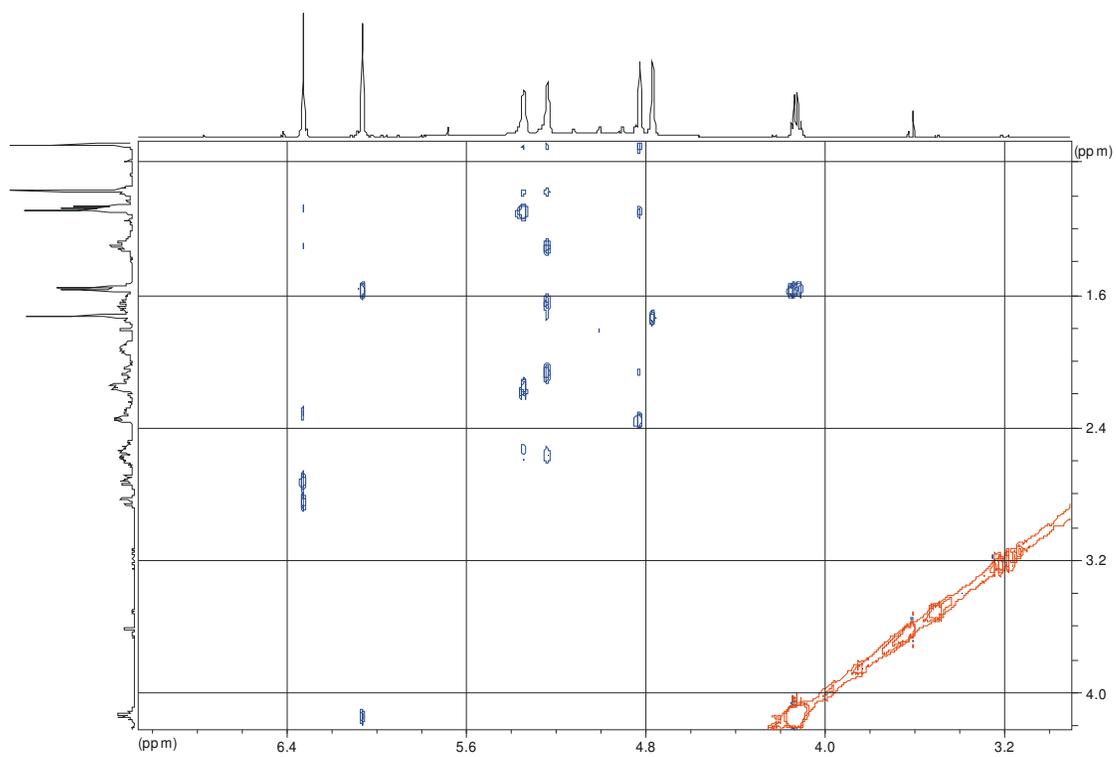
HMBC-Spektrum (Ausschnitt)



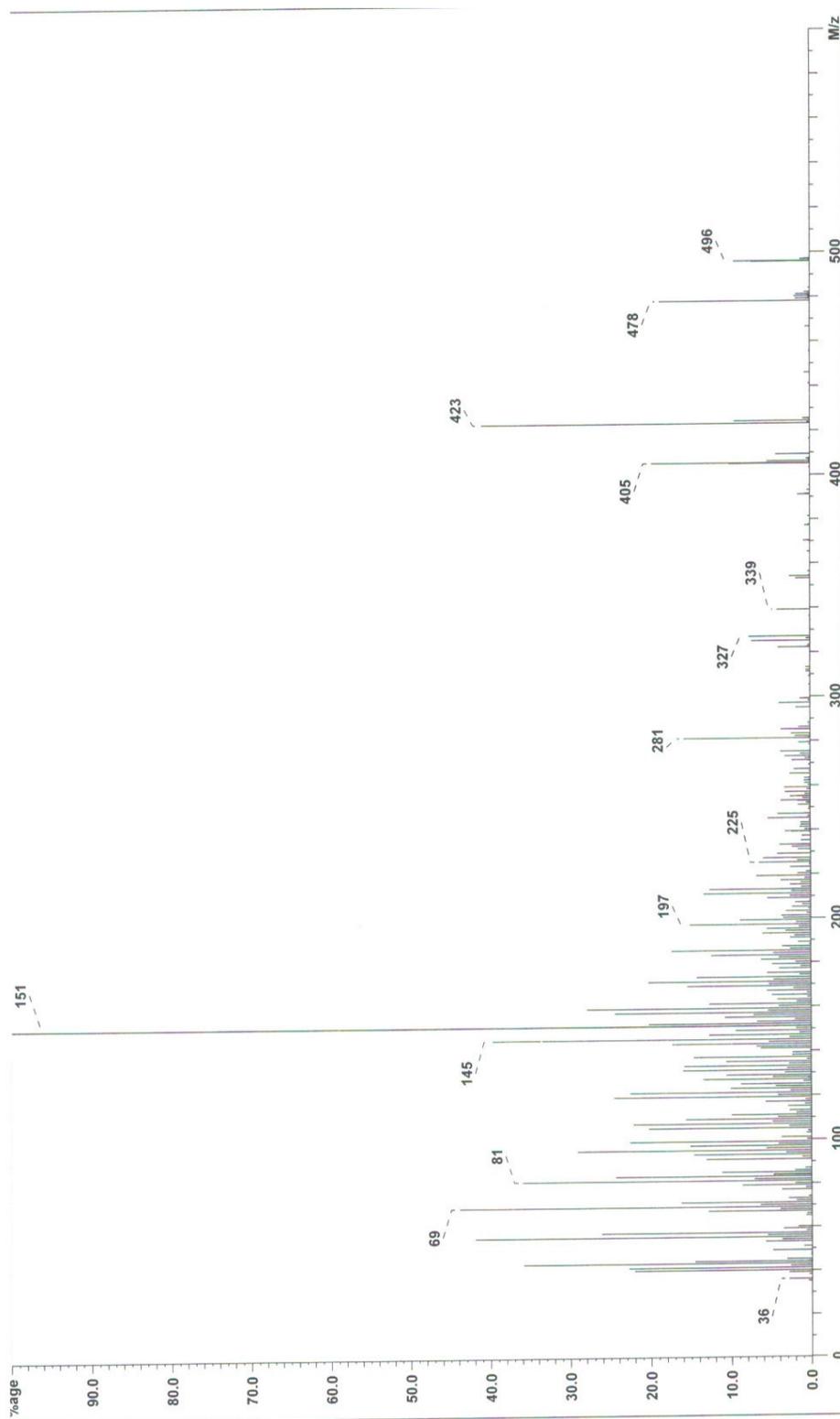
HMBC-Spektrum (Ausschnitt)

NOESY-Spektrum (LM: Pyridin-d<sub>5</sub>)

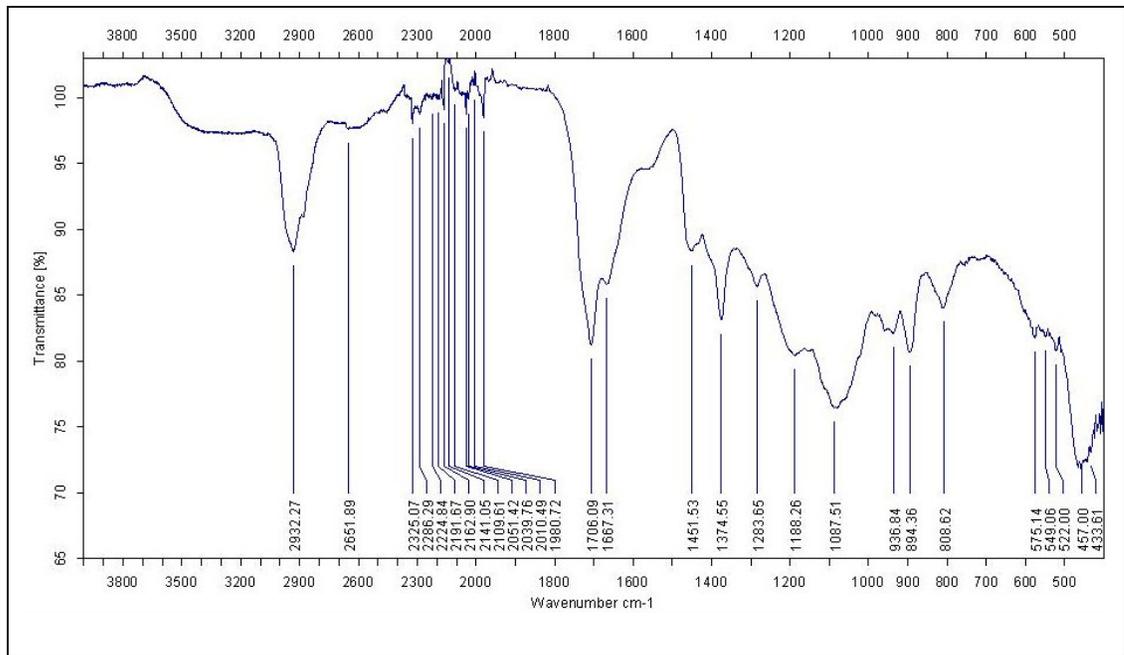
NOESY-Spektrum (Ausschnitt)



NOESY-Spektrum (Ausschnitt)

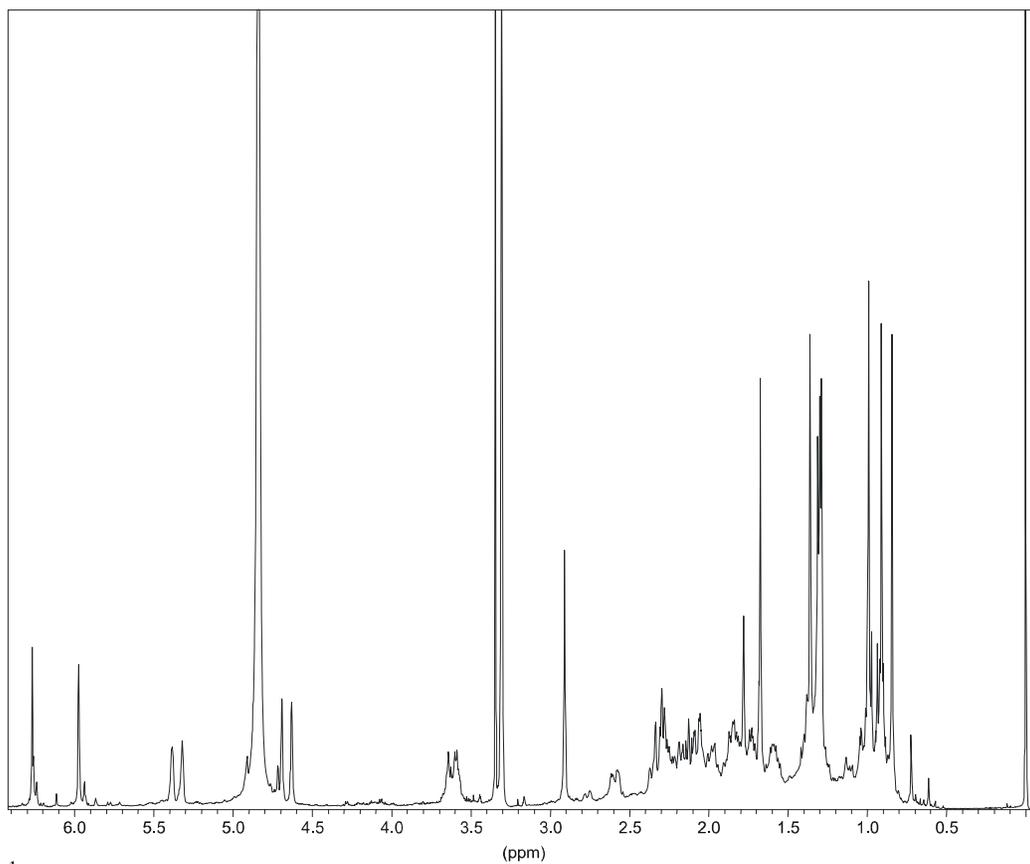
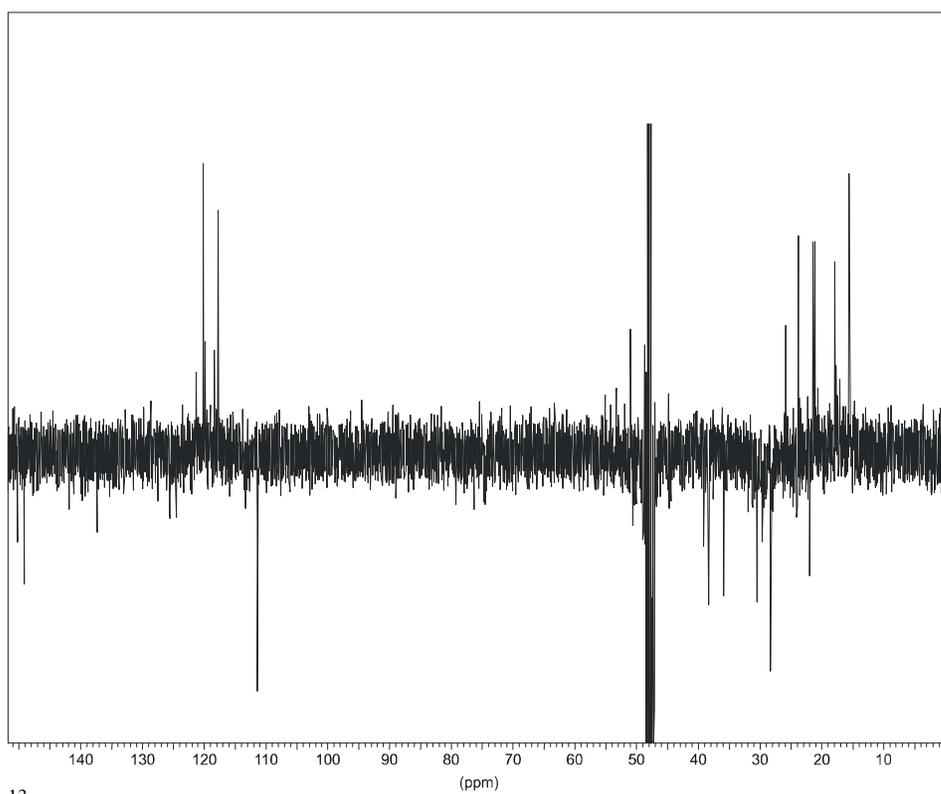


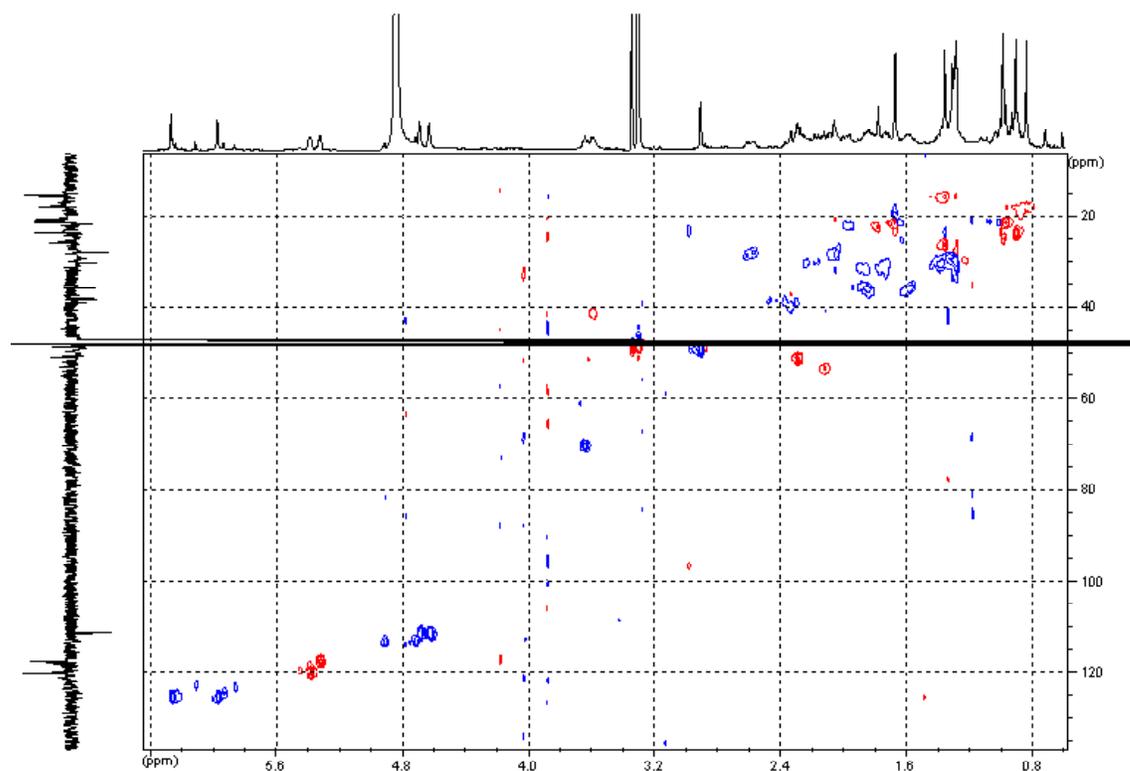
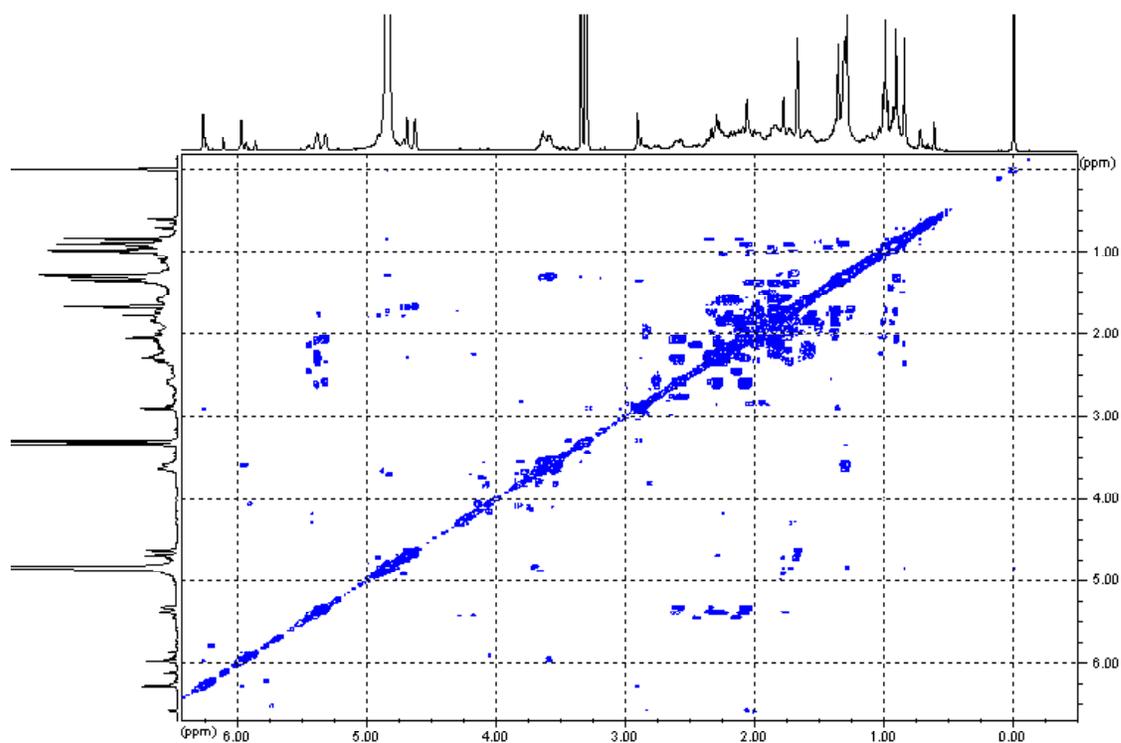
EI-MS-Spektrum

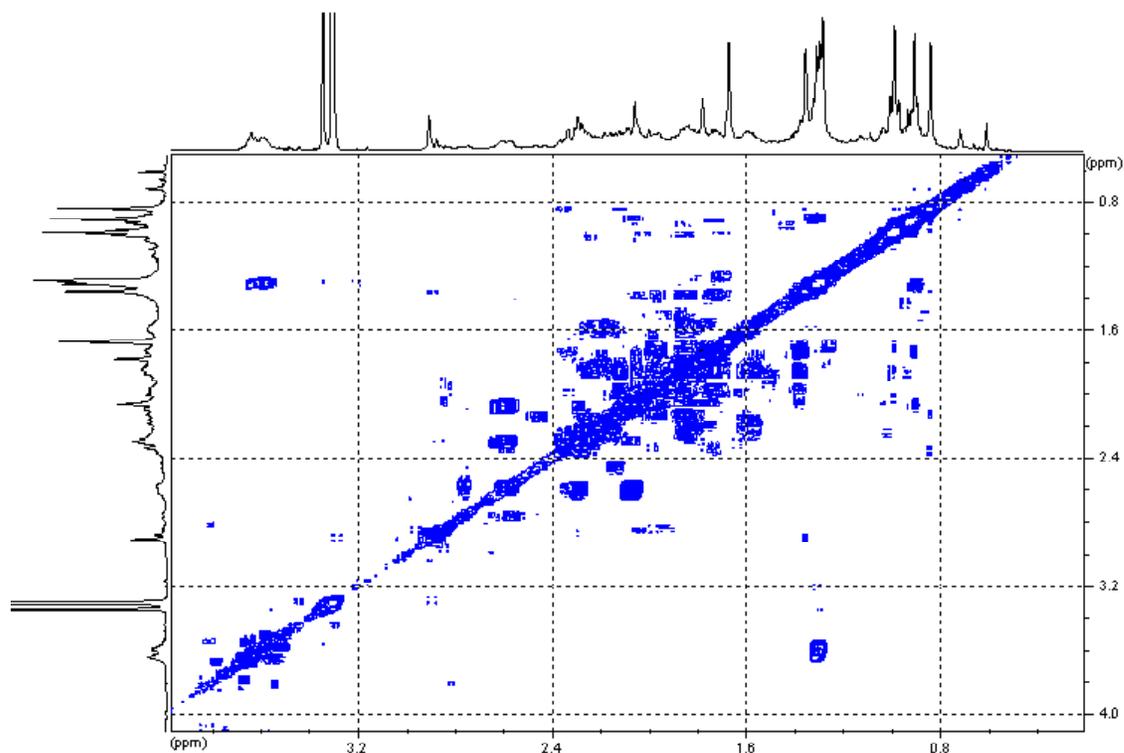
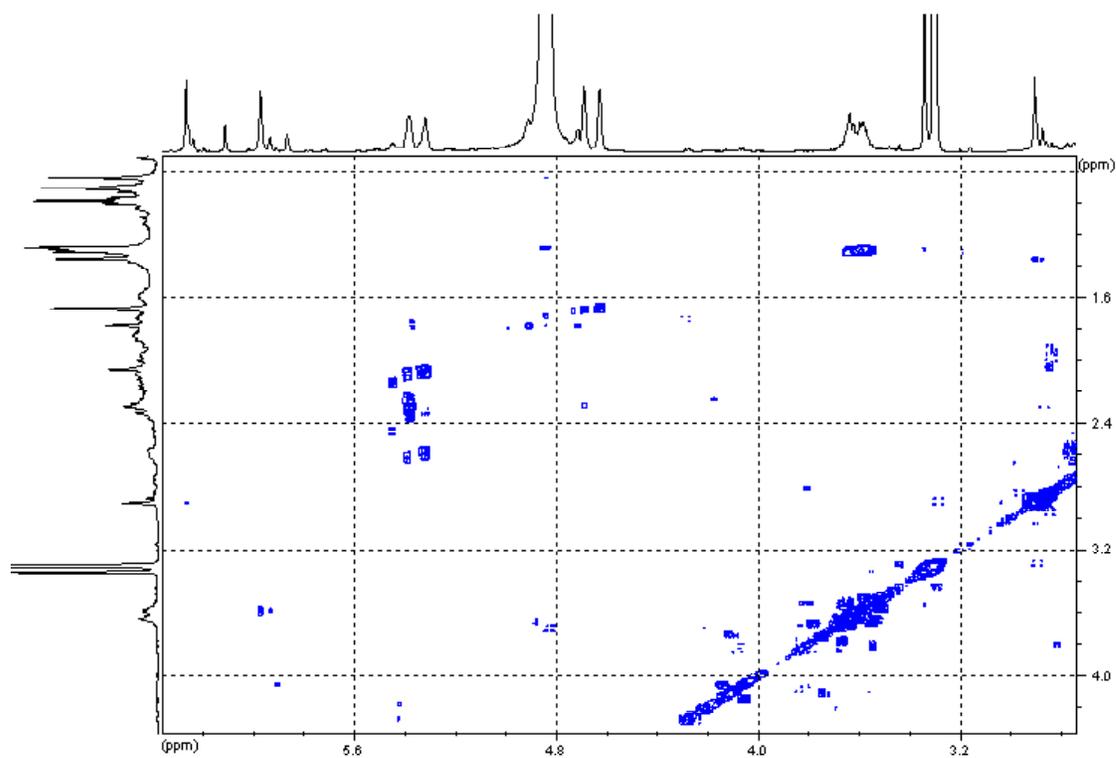


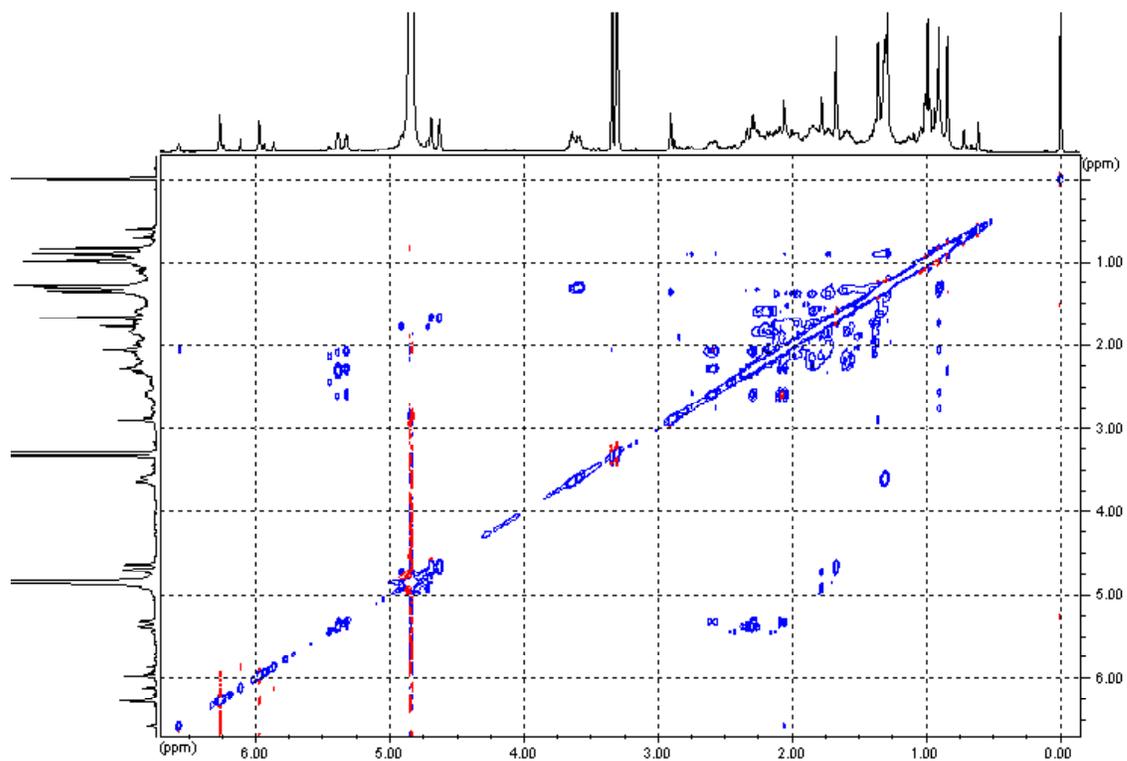
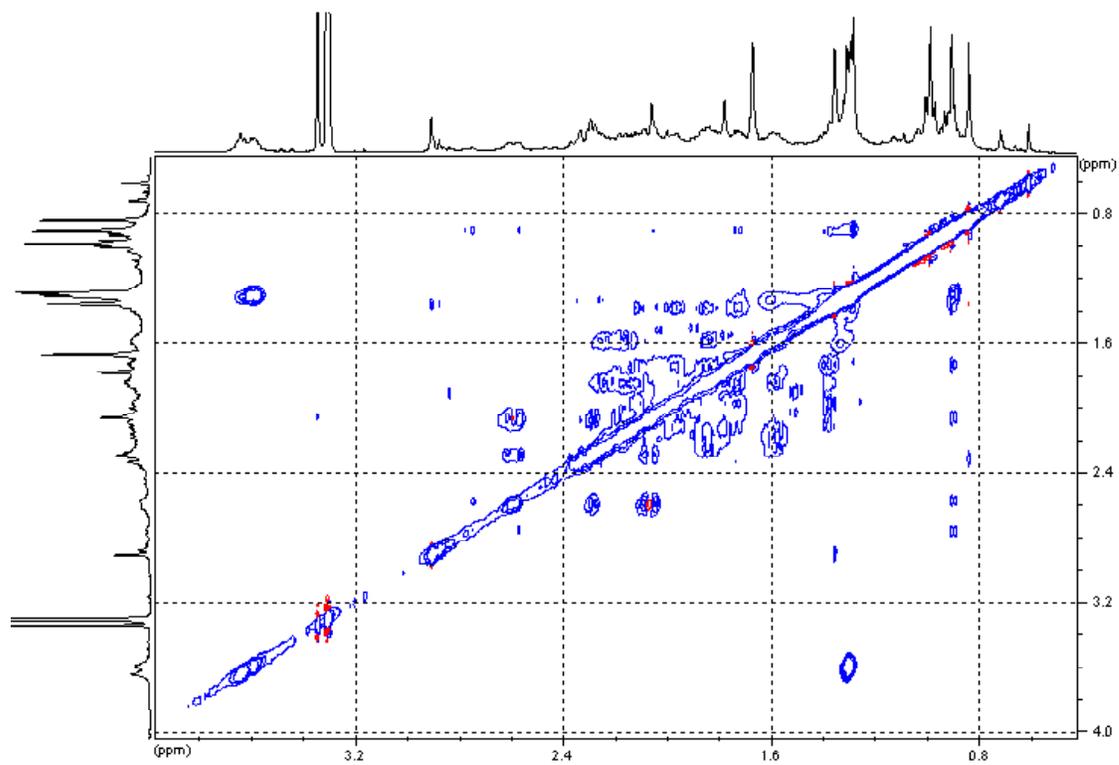
ATR-IR-Spektrum

## Spongiporensäure B

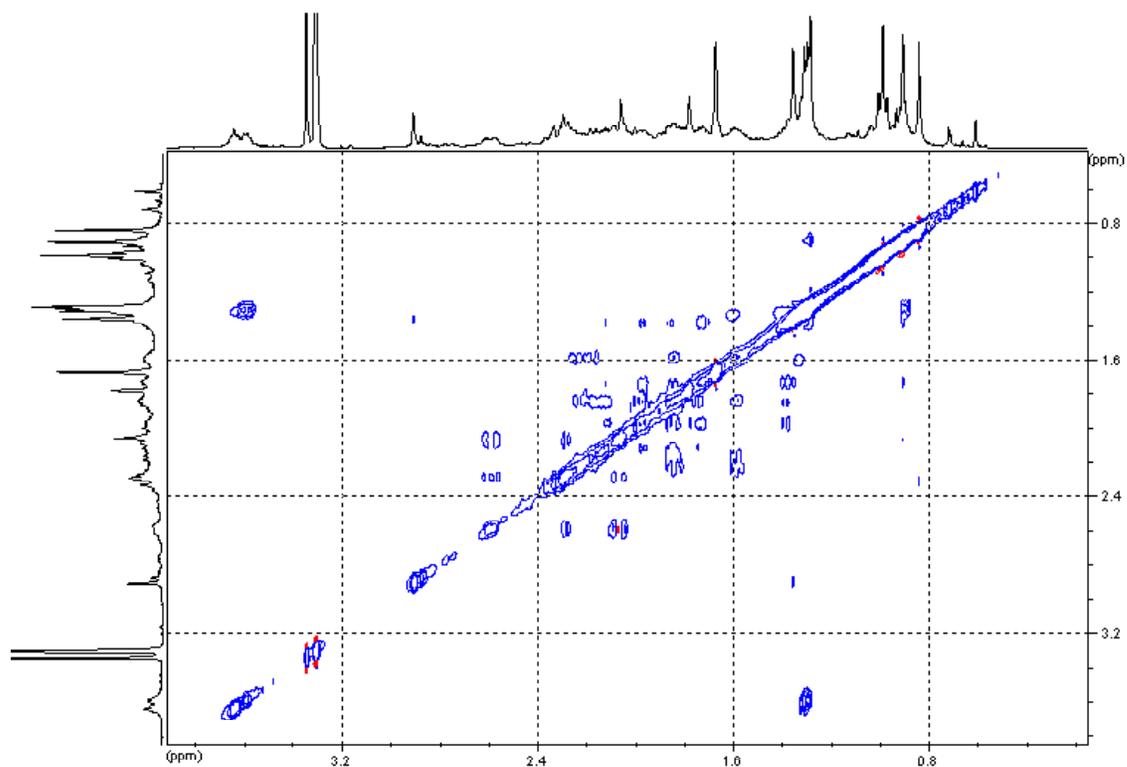
 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (LM: Methanol- $\text{d}_4$ ) $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (LM: Methanol- $\text{d}_4$ )

HMQC-Spektrum (LM: Methanol-d<sub>4</sub>) $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (LM: Methanol-d<sub>4</sub>)

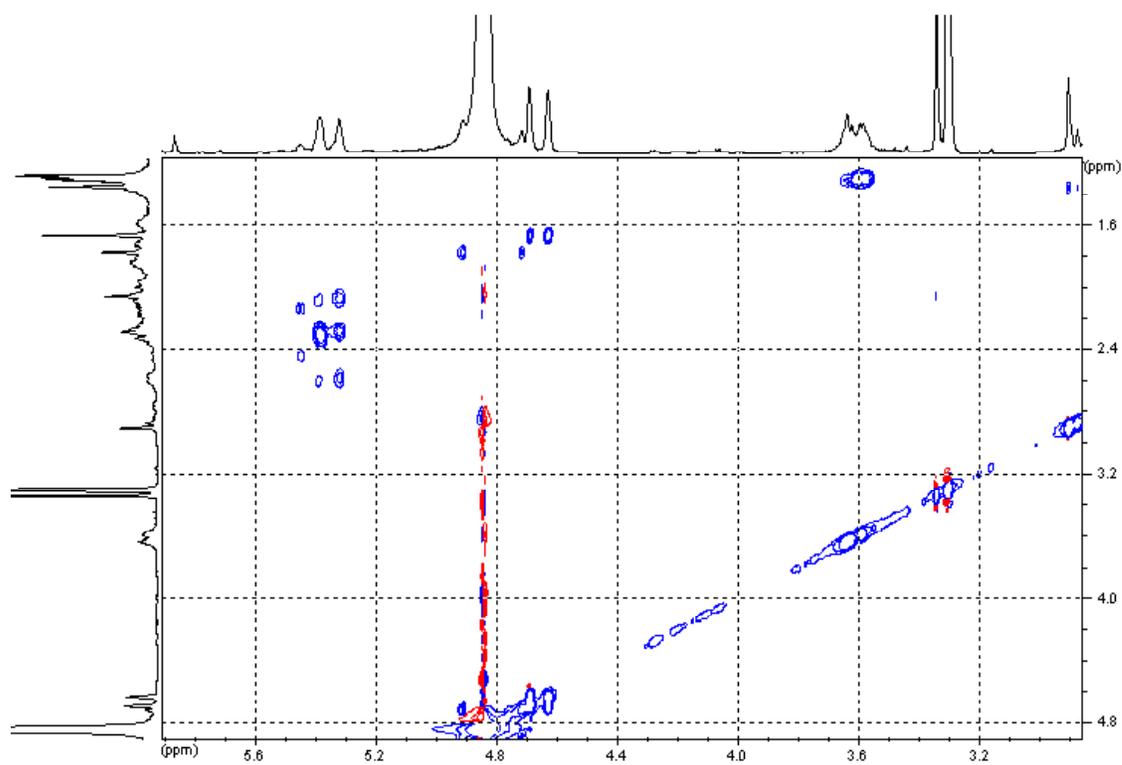
 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Ausschnitt) $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Ausschnitt)

TOCSY-Spektrum (LM: Methanol-d<sub>4</sub>)

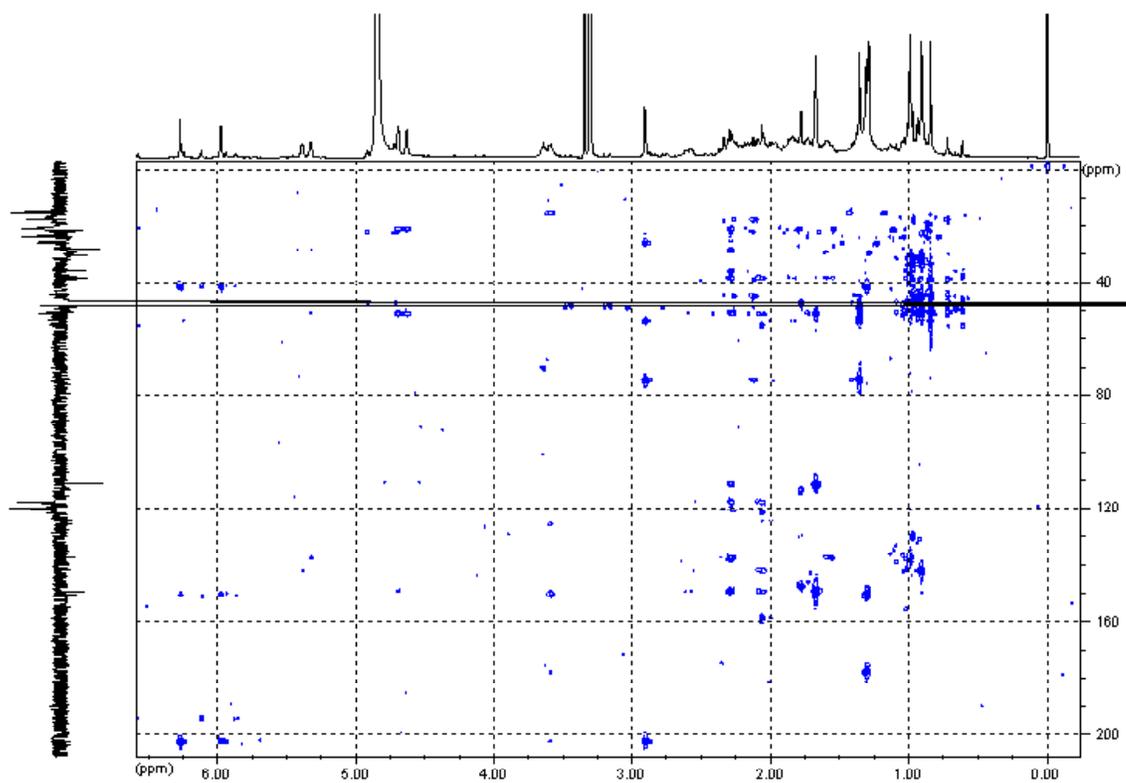
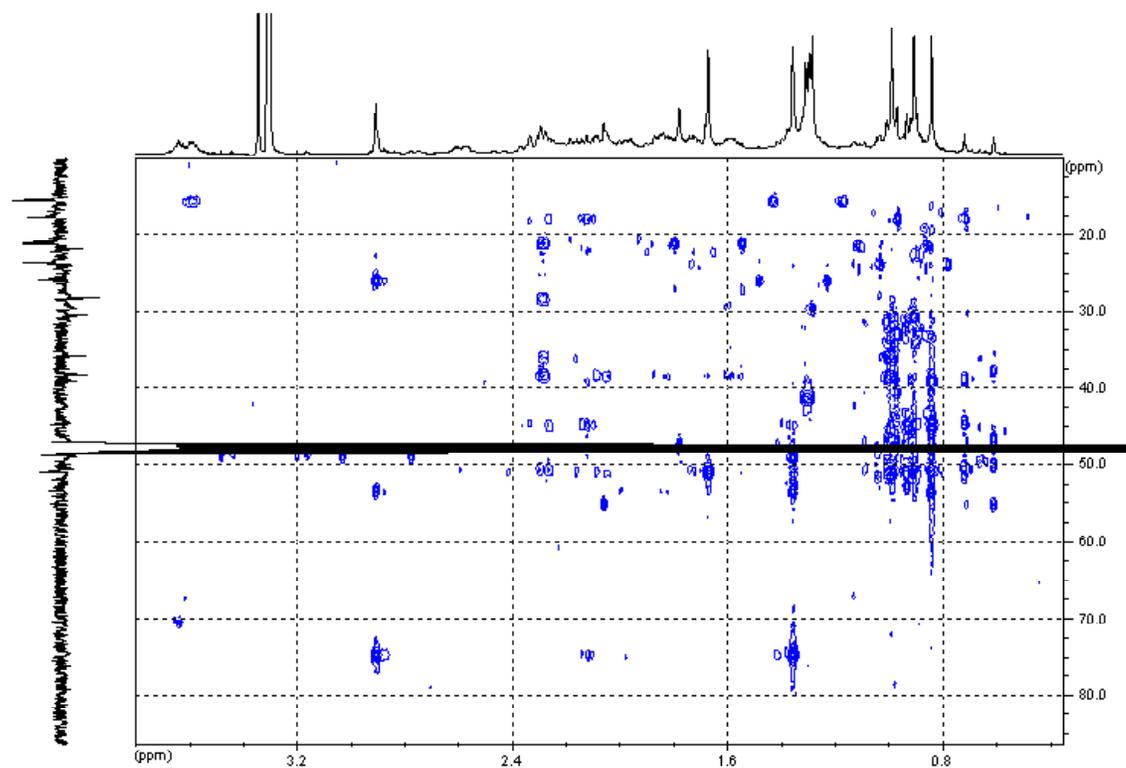
TOCSY-Spektrum (Ausschnitt)



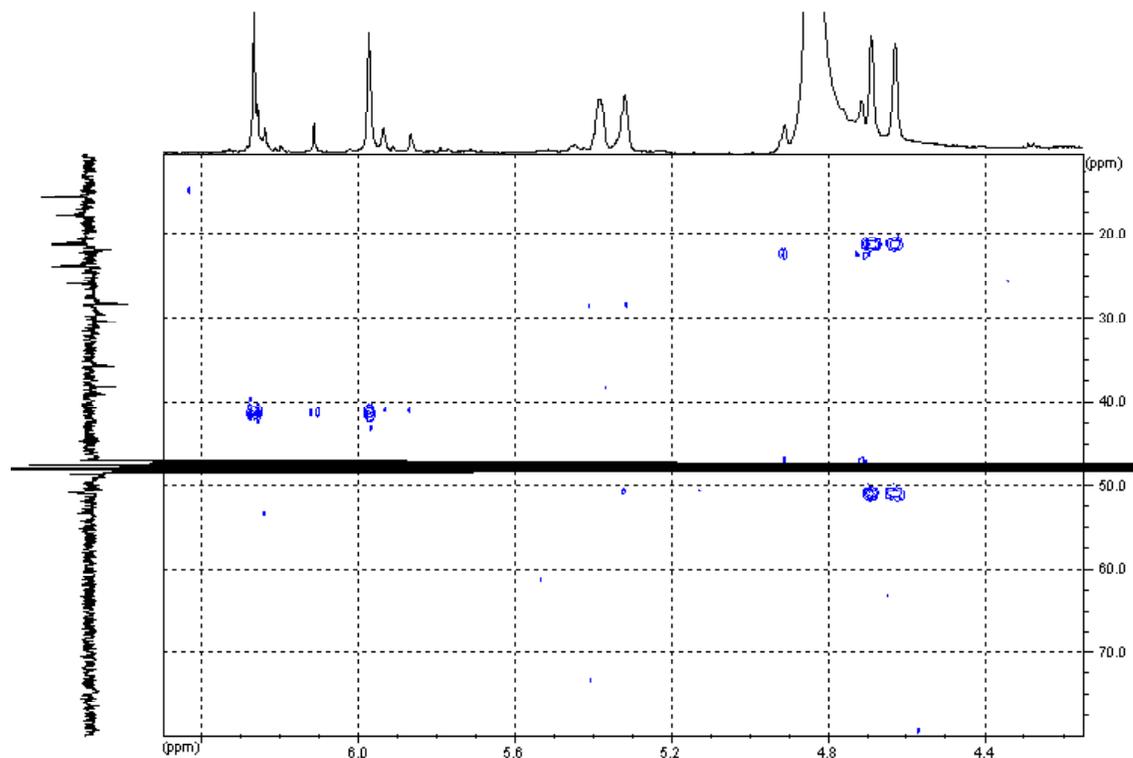
TOCSY-Spektrum (Ausschnitt, Verkleinerung)



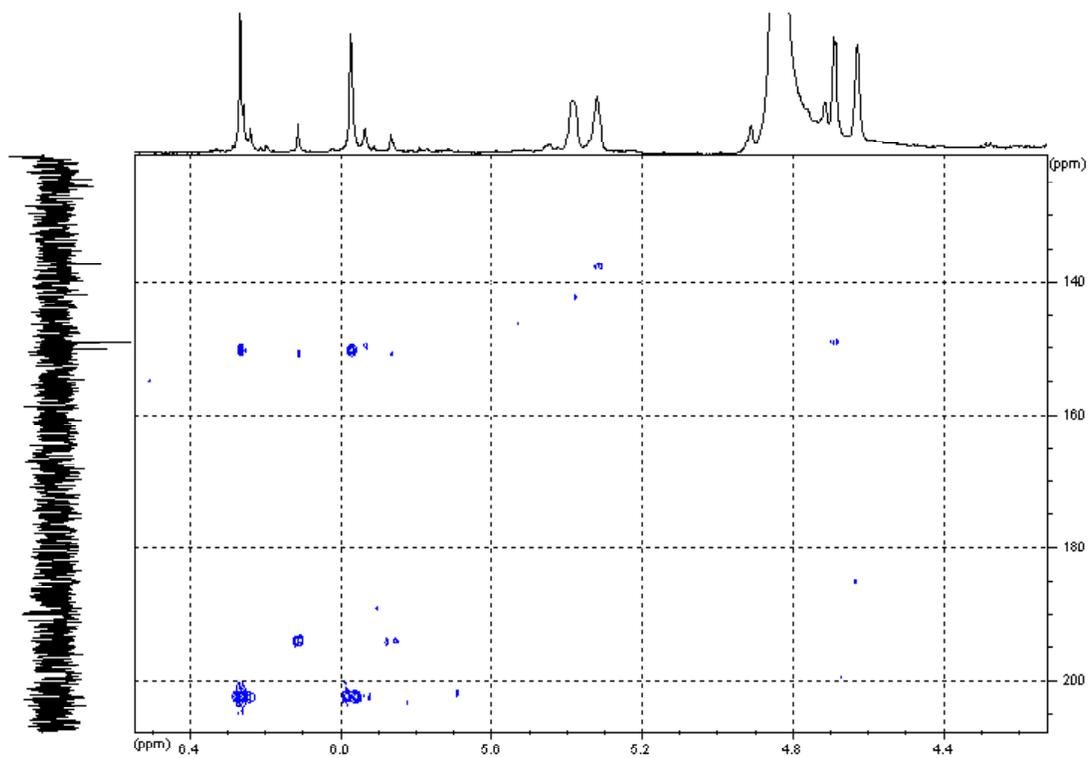
TOCSY-Spektrum (Ausschnitt)

HMBC-Spektrum (LM: Methanol-d<sub>4</sub>)

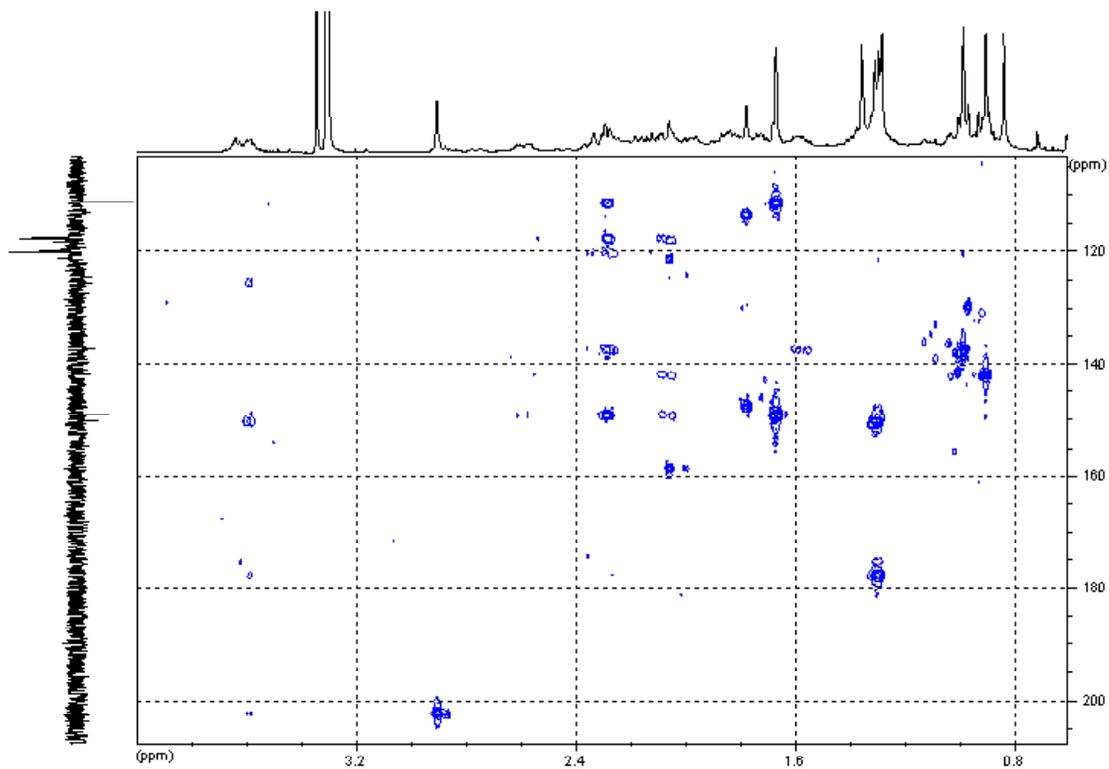
HMBC-Spektrum (Ausschnitt)



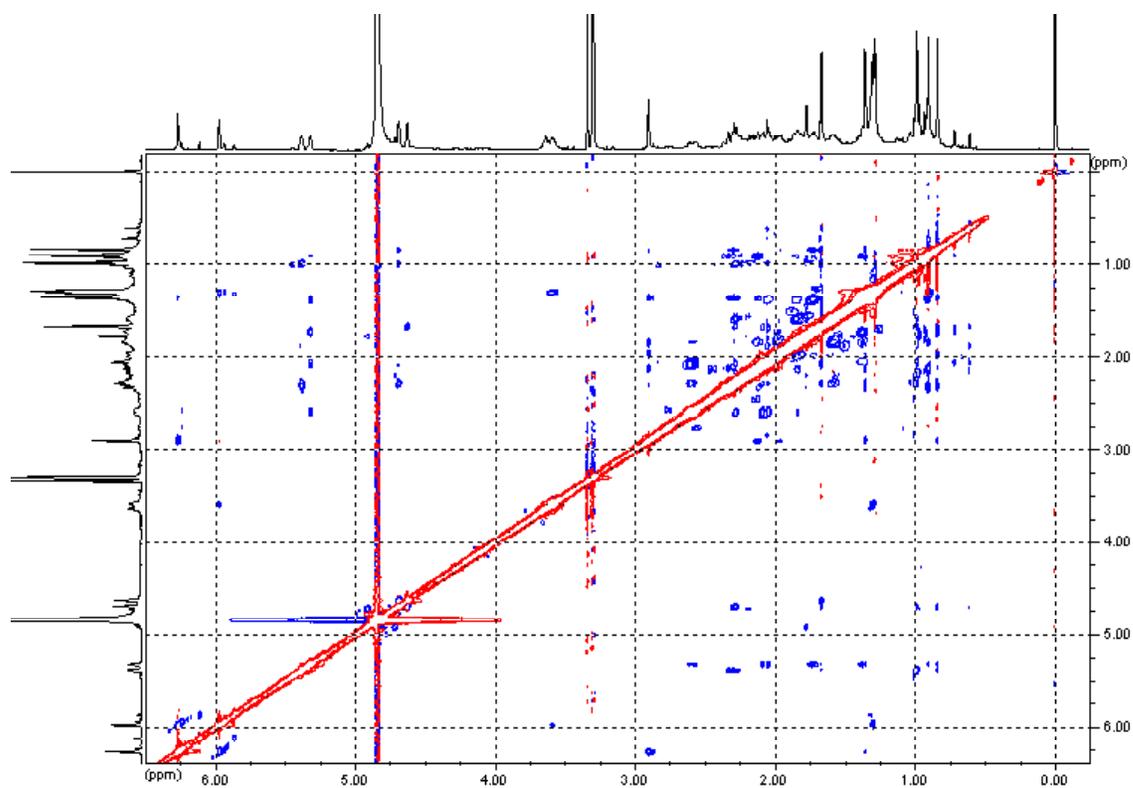
HMBC-Spektrum (Ausschnitt)

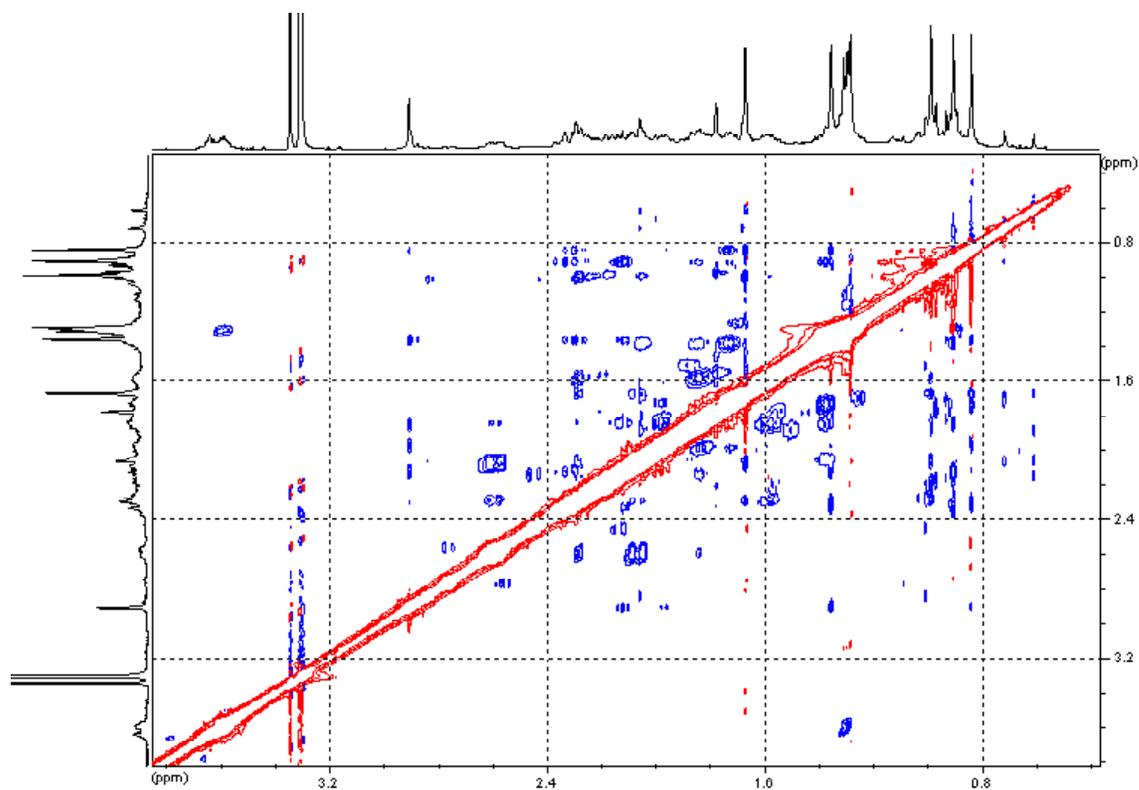


HMBC-Spektrum (Ausschnitt)

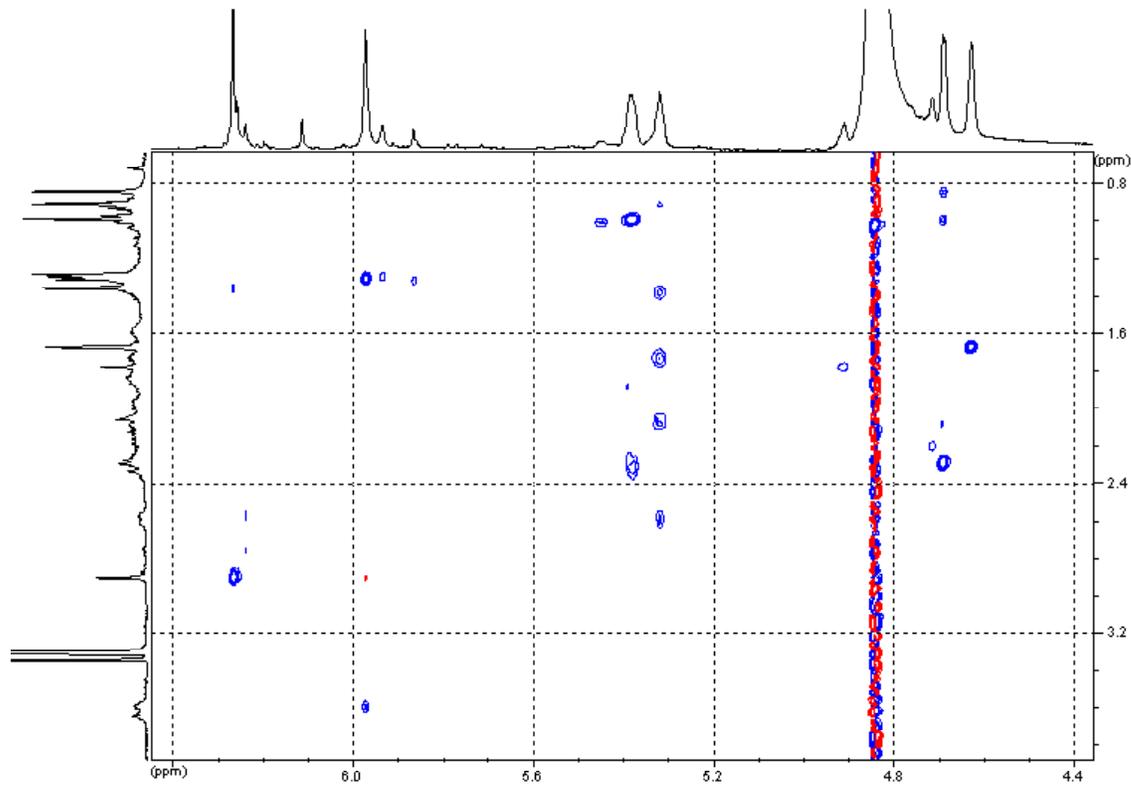


HMBC-Spektrum (Ausschnitt)

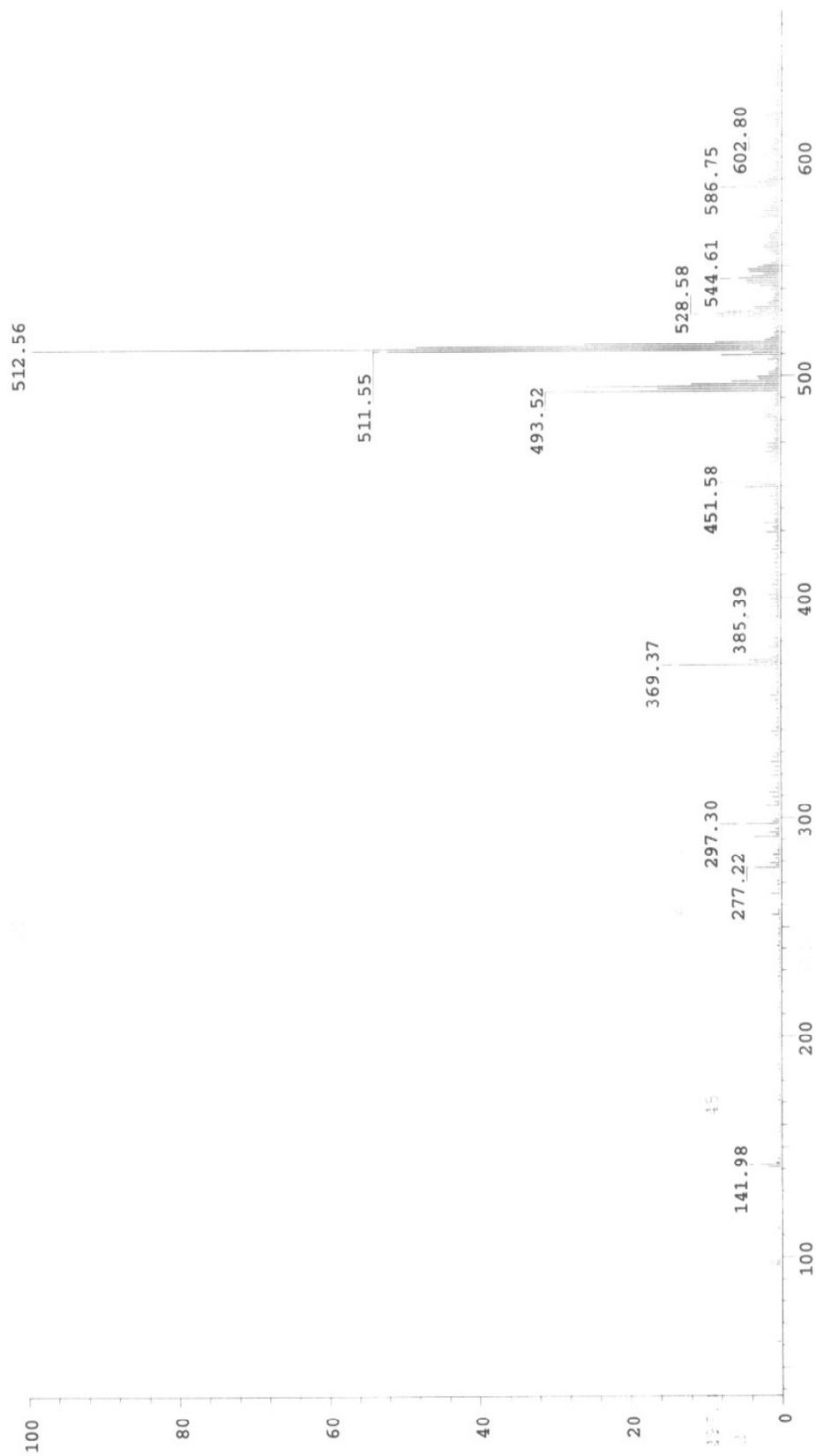
NOESY-Spektrum (LM: Methanol-d<sub>4</sub>)



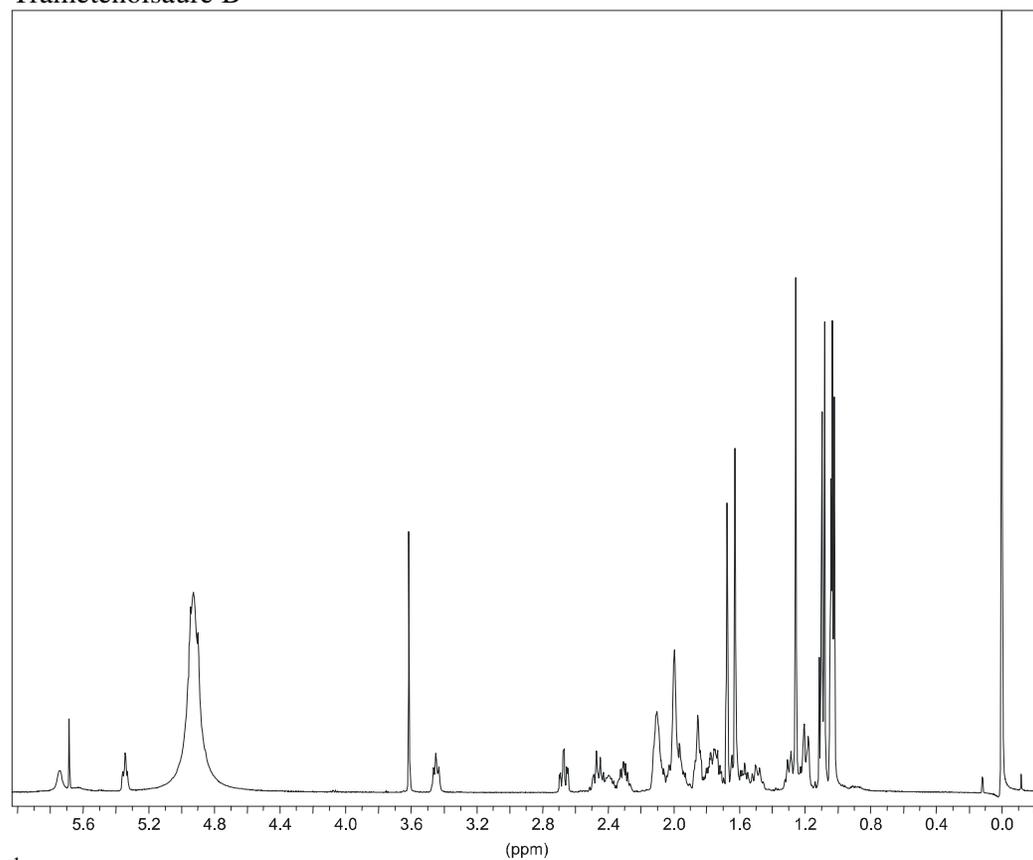
NOESY-Spektrum (Ausschnitt)



NOESY-Spektrum (Ausschnitt)

ESI-Spektrum (Negativ-Ion-Modus; LM: Methanol-d<sub>4</sub>)

## Trametenolsäure B

 $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (LM: Pyridin- $\text{d}_5$ )

## 9 Literatur

- [1] Hobbs, C.: Medicinal Mushrooms, Botanica Press, Santa Cruz (CA) (1995).
- [2] Zhong, J.-J., Fang, Q.H., Tan, Y.-J.: Enhanced Production of Valuable Bioactive Metabolites in Submerged Cultures of Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* by Manipulation of Oxygen Supply, J. Plant Biotechnology 4 (2002) 109-115.
- [3] Hegnauer, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Birkhäuser Verlag, Basel, Bd. 3 (1964).
- [4] Anke, T.: Fungal Biotechnology, Chapman & Hall, Weinheim (1997).
- [5] Kim, H. W., Kim B. K.: Biomedical Triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae). Int. J. Med. Mushrm. Vol. 1 (1999) 121-138.
- [6] Steglich, W., Biologically Active Compounds from Higher Fungi, Pure & Appl. Chem. 53 (1981), 1233-1240.
- [7] Hanssen, H. P., Sinnwell, V.: Volatile Fragrance Compounds from the Fungus *Gloeophyllum odoratum* (Basidiomycotina), Z. Naturforsch. C 41 (9-10) (1986) 825-829.
- [8] Schmidt, C. O.: Isolierung und Identifizierung von leichtflüchtigen Komponenten aus dem Baumpilz *Fomes fomentarius*, Diplomarbeit, Hamburg (1996).
- [9] Rösecke, J.: Isolierung und Identifizierung von leichtflüchtigen und nichtflüchtigen Komponenten aus Basidiomyceten, Diplomarbeit, Hamburg (1998).
- [10] Gunstone, F. D., Harwood, J. L., Padley, F. B.: The Lipid Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition, Chapman & Hall, London (1994).
- [11] Strasburger, E., Noll, F., Schenck, Schimper, A. F. W.: Lehrbuch der Botanik, 33. Auflage, Gustav Fischer Verlag (1993) 548-596.
- [12] Jahn, H.: Pilze die an Holz wachsen, Bussesche Verlagshandlung, Herford (1979).
- [13] Bankhofer, H., Dolinscheck, K. H.: Hörtnagl, P., Heilen mit dem Reishi Pilz, Kneipp Verlag, 1 (2000) 67.
- [14] Wang, J. C., Hu, S. H., Lee, W. L., Tsai, L. Y.: Antimutagenicity of Extracts of *Hericium erinaceus*, Kaohsiung J. Med. Sci. 17(5) (2001) 230-8.
- [15] Wallach, O.: Terpene und Campher: Zusammenfassung eigener Untersuchungen auf dem Gebiet der alicyclischen Verbindungen, Veit und Comp., Leipzig (1909).
- [16] Ruzicka, L., Eschenmoser, A., Heuser, H.: The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds, Experientia 357 (1953) 357-367.
- [17] Bloch, K.: Sterol Molecule: Structure, Biosynthesis and Function, Steroids 57 (1992) 378-382.

- [18] Tavormina, P. A., Gibbs, M.H., Huff, J. W.: The Utilization of  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylvalerolactone in Cholesterol Biosynthesis, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 4498-4499.
- [19] Folkers, K., Wolf, D. E.: Isolation of a New Acetate Replacing Factor, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 5273-5275.
- [20] Bach, T. J.: Some New Aspects of Isoprenoid Biosynthesis in Plants – A Review, *Lipids* 30 (3) 1995 191-202.
- [21] Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., Sahn, H.: Glyceraldehyde 3-phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis, *J. Amer. Chem. Soc.* 118 (1996) 2564-2566.
- [22] Schwarz, M. K.: Terpen-Biosynthese in *Ginko biloba*: Eine überraschende Geschichte, Dissertation (Thesis Nr. 10951), ETH Zürich, Switzerland.
- [23] Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Krieger, C. Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W.: Studies on the Non-mevalonate Pathway of Terpene Biosynthetic Pathway: Metabolic Role of IspH (LytB) Protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002).
- [24] Weete, J. D.: Structure and Function of Sterols in Fungi, *Adv. Lip. Res.* 23 (1989) 115-166.
- [25] Bünzli-Trepp, U.: Handbuch für die systematische Nomenklatur der Organischen Chemie, Metallorganischen Chemie und Koordinationschemie: Chemical-Abstracts-Richtlinien mit IUPAC-Empfehlungen und vielen Trivialnamen, Logos Verlag, Berlin (2001).
- [26] Hart, H., Craine, L. E., Hart, D. J.: Organische Chemie, Wiley-VCH, Weinheim (2002).
- [27] Laux, H. E.: Der große Kosmos Pilzfürer. Franckh-Kosmos-Verlag, Stuttgart (2001).
- [28] Schwantes, H. O.: Biologie der Pilze, Wilhelm Fink Verlag, München (1996) 417.
- [29] Bao, X.-F., Wang, X.-S., Qun, D., Fang, J.-N., Li, X.-Y.: Structural Features of Immunologically Active Polysaccharides from *Ganoderma lucidum*, *Phytochemistry* 59 (2002) 175-181.
- [30] <http://www.fungitobewith.org/The%20weird%20and%20the%20wonderful.htm>
- [31] Menetrez, M. Y., Foarde, K. K.: Microbial Organic Compound Emission Rates and Exposure Model, *Indoor Built Environ.* 11 (2002) 208-213.
- [32] Jelen, H., Kaminski, E., Wiewiorowska, M., Kuta, A., Rudzinska, M.: Assessing the Toxigenicity of Fusaria Contaminating Grain Spikes on the Basis of Headspace Analysis of Trichodiene, *Cereal Res. Commun.* 25(3, Pt. 1) (1997) 331-335.
- [33] Zeppa, S., Gioacchini, A. M., Guidi, C., Guescini, M., Pierleoni, R., Zambonelli, A., Stocchi, V.: Determination of Specific Volatile Organic Compounds Synthesised During *Tuber borchii* Fruit Body Development by Solid-phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Sp.* 18 (2004) 199-205.

- [34] <http://www.speclab.com/compound/c103651.htm>
- [35] Kleemann, A., Engel, J.: *Pharmaceutical Substances. Syntheses, Patents, Applications*, 3. Auflage, Thieme, Stuttgart (1999).
- [36] Huang, T.-C., Chang, I.-Y., Tseng, H.-L., Liang, K.-I.: Preliminary Study on the Relation Between Structure and Activity of Antiasthmone, *Chin. Phar. Bull.* 15 (1980) 40.
- [37] Yakolev, V., von Schlichtegroll, A.: Antiinflammatory Activity of (-)- $\alpha$ -Bisabolol, an Essential Component of Chamomile oil, *Arzneim.-Forsch.* 19 (1969) 615-16.
- [38] Achterrath-Tuckermann, U., Kunde, R., Flaskamp, E., Isaac, O., Thiemer, K.: Pharmacological Studies on the Constituents of Chamolime. V. Studies on the Spasmolytic Effect of Constituents of Chamomile and Kamillosan on the Isolated Guinea Pig Ileum, *Planta Med.* 39 (1980) 38-50.
- [39] Megalla, S. E., El-Keltawi, N. E. M., Ross, S. A.: A Study of Antimicrobial Action of Some Essential Oil Constituents, *Herba Pol.* 26 (1980) 181-6.
- [40] Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., Kole, C. R.: Antibacterial and Antifungal Activity of Aromatic Constituents of Essential Oils, *Microbios.* 89(358) 39-46.
- [41] Hochmuth, D. H., Joulain, D., König, W. A.: Massfinder Software and Data Bank, University of Hamburg (2005) Available from [www.massfinder.com](http://www.massfinder.com)
- [42] Krüger, A.: Bestimmung ausgewählter chiraler Monoterpene zur Beurteilung von ätherischen Ölen mittels enantioselektiver Gaschromatographie an modifizierten Cyclodextrinen, Dissertation, Universität Hamburg (1995).
- [43] König, W. A.: *Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins*, Hüthig Verlag (Heidelberg) (1992).
- [44] Orcutt, D. M., Richardson, B.: Sterols of *Oocystis Polymorpha*, *Steroids* (1970) 429-446.
- [45] Wyllie, S. G., Djerassi, C.: Mass Spectrometry and Stereochemical Problems, CXLVI, Mass Spectrometric Fragmentations Typical of Sterols with Unsaturated Side Chains, *J. Org. Chem.* 33 (1968) 305-313.
- [46] Schulte, E., Weber, K.: Schnelle Herstellung der Fettsäuremethylester aus Fetten mit Trimethylsulfoniumhydroxid oder Natriummethylat, *Fett Wiss. Tech.* 91, 5 (1989) 181-183.
- [47] Masslib V8.7E-031, 2004. Software for the Processing and Interpretation of Mass Spectra, Max-Planck-Institut für Kohleforschung, Mülheim an der Ruhr.
- [48] Rösecke, J., König, W. A.: Constituents of Various Wood-rotting Basidiomycetes, *Phytochemistry* 54 (2000) 603-610.
- [49] Lin, C.-N., Tome, W.-P., Won, S.-J.: A Lanostanoid of Formosan *Ganoderma lucidum*, *Phytochemistry* 29 (1990) 673-675.

- [50] Lin, C.-N., Tome, W.-P.: Novel Cytotoxic Principles of Formosan *Ganoderma lucidum*, *Phytochemistry* 54 (1991) 998-1002.
- [51] Demyttenaere, J. C. R., Moriña, R. M., Sandra, P., J.: Monitoring and Fast Detection of Mycotoxin-Producing Fungi on Headspace Solid-Phase Microextraction and Headspace Sorptive Extraction of the Volatile Metabolites, *J. Chromatogr., A* 985(1-2) (2003) 127-135.
- [52] Fischer, G., Müller, T., Möller, M., Ostroski, R., Dott, W.: Microbial Volatile Organic Compounds (MVOC) of Molds – Use as an Exposure Indicator, *Schriftreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene*, 104 (Stand von Wissenschaft, Forschung und Technik zu Siedlungshygienischen Aspekten der Abfallentsorgung und Verwertung) (1999) 183-192.
- [53] König, W. A., Krebber, R., Evers, P., Bruhn, G.: Stereochemical Analysis of Essential Oils and Flavor Compounds by Enantioselective Capillary Gas Chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr.* 13 (1990) 328-332.
- [54] Knapp, D. R.: *Handbook of Analytical Derivatization Reaction*, Wiley, New York (1979).
- [55] Ramirez, I., Villalobos, D., Bocaranda, G., Bahsas, A., Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol and 5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ ,26-diol Isolated from *Ganoderma applanatum*, *Ciencia (Maracaibo, Venez.)* 11 (4) (2003) 328-333.
- [56] Turner, W. B., Aldridge, D. C.: *Fungal Metabolites*, Academic Press, London (1983).
- [57] Harref, A. F., Lavergne, J.-P.: Triterpenes issus des latex des euphorbes cactoïdes marocaines *E. resinifera*, *E. echinus* et *E. officinarum*: isolement, étude comparative par RMN <sup>13</sup>C des quatre classes tétracycliques, eupho-lanostane, lanostane et nor-31 lanostane. *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1995) 965-972.
- [58] Kenny, P. T. M., Wetzel, J. M.: Fragmentation Studies of Ergosterol. The Formation of the Fragment Ion at *m/z* 337, *Eur. Mass Spectrom.* 1 (1995) 411-413.
- [59] de Queiroz, J. H., Barbosa, L. C de A., Carvalho, M. R., Howarth, O. W.: Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR-Signal Assignments of Ergosterol Peroxide Isolated from *Aspergillus versicolor*, *Cien. Eng.* 10 (2001) 14-17.
- [60] Klayman, D. L.: Quinghaosu (Artemisine): An Antimalarial Drug from China, *Science* 228 (1985) 1049-1055.
- [61] Im, S. I., Kyung, I. N., Chung, J. S., Jung, J. H.: Sterol Peroxide Derivatives from the Marine Sponge *Spirastella abata*, *Kor. J. Pharmacogn.* 31 (2000) 401-406.
- [62] Kamalov, M. A., Aripova, S. F., Isaev, M. I.: Low-molecular-weight Mushroom Metabolites. V. Eburicoic Acid from *Polyporus ailanthus*. *Chem. Nat. Comp.* 36 (2000) 72-75.
- [63] Holmes, J. L., Terlouw, J. K., Vijfhuizen, P. C., A'Campo, C.: Metastable Ion Studies. XII-Molecular and Fragment Ion studies for Isomeric C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> Acids, *Org. Mass Spectrom.* Vol. 14, 4 (1979) 204-212.

- [64] Lauwers, W., Serum, J. W., Vandewalle, M.: Studies in Organic Mass Spectrometry-XIII: Isomerisation of  $\alpha,\beta$ - and  $\beta,\gamma$ -Unsaturated Esters, *Org. Mass Spectrom.* Vol. 7 (1973) 1027-1037.
- [65] Herrmann, R., Schwarz, H.: Zur elektronenstoßinduzierten Isomerisierung und Fragmentierung von Butencarbonsäuremethylestern, *Z. Naturforsch.* 31b (1976) 1013-1014.
- [66] Friebolin, H.: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, VCH-Verlag, 2.Auflage, Weinheim (1992).
- [67] Berger, R. G., Neuhäuser, K., Drawert, F., Characterization of the Odour Principles of Some Basidiomycetes: *Bjerkandera adusta*, *Poria aurea*, *Tyromyces sambuceus*, *Flavour Fragr. J.* 1 (1986) 181-185.
- [68] [http://home.hccnet.nl/andre.biemans/n\\_bjerk\\_ad.html](http://home.hccnet.nl/andre.biemans/n_bjerk_ad.html)
- [69] Millington, S., Leach, D. N., Wyllie, S. G., Claridge, A. W.: Aroma Profile of the Australian Truffle-like Fungus *Mesophellia glauca*, *ACS Sym. Ser.*, 705(Flavor Analysis) (1998) 331-342.
- [70] Zeid, A. H. S. A., Saleh, M. M., Haggag, M. Y., Mohamed, R. S.: Study of the Volatile Lipids and Amino Acid Contents of *Trichoderma harzinum* Rifai and *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain and their Antifungal Activity, *Egypt. J. Pharm. Sci.* 39, No. 4-6 (1998) 443-461.
- [71] De Simone, F., Sica, D., Zollo, F.: Sterols from Some Basidiomycetes, *Phytochemistry* 18 (1979) 1572-3.
- [72] Senatore, F., Dini, A., Marino, A., Schettino, O.: Chemical Constituents of Some Basidiomycetes, *J. Sci. Food Agric.* 45 (1988) 337-45.
- [73] Senatore, E.: Chemical Constituents of Some Mushrooms, *J. Sci. Food Agric.* 58(4) (1992) 499-503.
- [74] León, F., Quintana, J. Rivera, A., Estévez, F., Bermejo, J.: Lanostanoid Triterpenes from *Laetiporus sulphureus* and Apoptosis Induction on HL-60 Human Myeloid Leukemia Cells, *J. Nat. Prod.* 67 (2004) 2008-2011.
- [75] [http://pkaminski.homestead.com/files/Laetiporus\\_sulphureus\\_12\\_L.jpg](http://pkaminski.homestead.com/files/Laetiporus_sulphureus_12_L.jpg)
- [76] J. M. Guider, T. G. Halsall, Jones, E. R. H.: The Chemistry of the Triterpenes and Related Compounds. Part XXVII. Pinicolic acid A, *J. Chem. Soc.* (1954) 4471-4475.
- [77] Keller, A. C., Maillard, M. P., Hosettmann, K.: Antimicrobial Steroids from the Fungus *Fomitopsis pinicola*, *Phytochemistry* 41 (1996) 1041-1046.
- [78] Rösecke, J., König, W. A.: Steroids from the Fungus *Fomitopsis pinicola*, *Phytochemistry* 52 (1999) 1621-1627.

- [79] Protiva, J., Skorkovska, H., Urban, J., Vystreil, A.: Triterpenes and Steroids from *Ganoderma applanatum* Basidiomycete, Coll. Czech. Chem. Comm. 45 (1980) 2710-2713.
- [80] Jain, A. C., Gupta, S. K.: The Isolation of Lanosta-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ ,21-diol from the Fungus *Ganoderma australe*, Phytochemistry 23 (1984) 686-687.
- [81] Villanueva, V. R.: Triterpenes and Sterols of *Lenzites trabea*, Phytochemistry 10(2) (1971) 427-430.
- [82] Hanssen, H. P., Sinnwell, V.: Volatile Fragrance Compounds from the Fungus *Gloeophyllum odoratum* (Basidiomycotina), Z. Naturforsch., C 41(9-10) (1986) 4825-9.
- [83] Ying, J., Mao, K., Ma, Q., Zong, Y., Wen, H.: Icons of Medicinal Fungi from China, Science Press, Beijing (China) (1987)
- [84] [http://www.mykoweb.com/CAF/species/Schizophyllum\\_commune.html](http://www.mykoweb.com/CAF/species/Schizophyllum_commune.html)
- [85] Stoessl, A.: Metabolites of *Cercospora arachidola*. The First Report of Long-Chain Aldehydes from a Fungus, Can. J. Microbiol. 31 (1985) 129-133.
- [86] Breheret, S., Talou, T., Rapior, S., Bessiere, J.-M.: Monoterpenes in the Aromas of Fresh Wild Mushrooms (Basidiomycetes), J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 831-836.
- [87] [http://sevlauqu.club.fr/images/Datronia\\_mollis.jpg](http://sevlauqu.club.fr/images/Datronia_mollis.jpg)
- [88] Buchanan, M. S., Hashimoto, T., Yasuda, A., Asakawa, Y.: The Structures of Novel Cytochalasins, Azaphilones and Aromatic Compounds Isolated from Five Ascomycetous Fungi, Symp. Chem. Nat. Prod. Symp. Pap., 37<sup>th</sup> (1995) 409-414.
- [89] Elmore, J. S., Campo, M., Enser, M., Mottram, D. S.: Effect of Lipid Composition on Meat-like Model Systems Containing Cysteine, Ribose and Polyunsaturated Fatty Acids, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 1126-1132.
- [90] Dubin, G.-M., Fkyerat, A., Tabacchi, R.: Acetylenic Compounds from *Stereum hirsutum*, Phytochemistry 59 (2000) 571-574.
- [91] Yun, B.-S., Lee, I.-K., Cho, S.-M., Yoo, I.-D.: New Tricyclic Sesquiterpenes from the Fermentation Broth of *Stereum hirsutum*, J. Nat. Prod. 65 (2002) 786-788.
- [92] Aquino, R., Cerri, R., Cordella, G., Morrica, P. Senatore, F.: Fatty Acids and Sterols of some Basidiomycetes, Rendiconto dell'Accademia delle Scienze Fisiche e Matematiche 49 (1983) 97-101.
- [93] Yun, B.-S., Cho, Y., Lee, I.-K., Cho, S.-M., Lee, T. H., Yoo, I.-D., Sterins A and B, New Antioxidative Compounds from *Strerum hirsutum*, J. Antibiot. 55 (2002) 208-210.
- [94] Kleinwächter, P., Dahse, H.-M., Luhmann, U., Schlegel, B., Dornberger, K.: Epicorazine C, an Antimicrobial Metabolite from *Stereum hirsutum* HKI 0195, J. Antibiot. 54 (2001) 521-525.

- [95] [http://www-biol.paisley.ac.uk/bioref/Fungi\\_basidiomycetes/Stereum\\_hirsutum.html](http://www-biol.paisley.ac.uk/bioref/Fungi_basidiomycetes/Stereum_hirsutum.html)
- [96] Rapior, S., Ceballos, L., Mousain, D., Andary, C., Bessiere, J. M.: Chemical Investigation of Mushrooms (Basidiomycetes): Preliminary Study on Accumulation of Volatiles in Mycelium of *Suillus* on Solid and Unagitated liquid Media, *Rivista Italiana (Spec. Num., 15<sup>th</sup> Journées Internationales Huiles Essentielles, 1996)* (1997) 603-606.
- [97] Abraham, B. G., Berger, R. G.: Higher Fungi for Generationg Aroma Components through Novel Biotechnologies, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2344-2348.
- [98] Fäldt, J., Eriksson, M., Valterová, Borg-Karlson, A.-K.: Comparison of Headspace Techniques for Sampling Volatile Natural Products in a Dynamic System, *Z. Naturforsch. C* 55(3-4) (2000) 180-8.
- [99] Chairul, T., Tokuyama, T., Hayashi, Y., Nishizawa, M., Tokuda, H., Chairul, S. M., Hayashi, Y.: Applanoxidic Acids A, B, C and D, Biologically Active Compounds from *Ganoderma applanatum*, *Phytochemistry* 30 (1991) 4105-4109.
- [100] Chairul, T., Chairul, S. M., Hayashi, Y.: Lanostanoid Triterpenes from *Ganoderma applanatum*, *Phytochemistry* 35(5) (1994) 1305-1308.
- [101] [http://www.mykoweb.com/CAF/species/Ganoderma\\_applanatum.html](http://www.mykoweb.com/CAF/species/Ganoderma_applanatum.html)
- [102] Sullivan, G., Henry, E. D.: Occurrence and Distribution of Phenoxazine Pigments in the Genus *Pycnoporus*, *J. Pharm. Sci.* 60 (1971) 1097-8.
- [103] [http://www.cegep-sept-iles.qc.ca/raymondboyer/champignons/Images/Pycnoporus\\_cinnabarinus.JPG](http://www.cegep-sept-iles.qc.ca/raymondboyer/champignons/Images/Pycnoporus_cinnabarinus.JPG)
- [104] Rapior, S., Cavalié, S., Andary, C., Pélissier, Y., Marion, C., Bessière, J.-M.: Investigation of Some Volatile Components of Seven Fresh Wild Mushrooms (Basidiomycetes), *J. Essent. Oil Res.* (1996) 199-201.
- [105] <http://www.duinkerken.nu/paddestoelen/images/blauwe%20kaaszvam%20-%20tyromyces%20caesius-1200x776.jpg>
- [106] Joulain, D., König, W. A.: *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*, E. B.-Verlag (Hamburg) (1998)
- [107] Liu, J. K.: Biologically Active Substances from Mushrooms in Yunnan, China, *Heterocycles* 57 (2002) 157-167.
- [108] Anke, H., Bergendorff, O., Sterner, O.: Assays of the Biological Activities of Guaiane Sesquiterpenoids Isolated from the Fruit Bodies of Edible *Lactarius* species. *Food Chem. Toxicol.* 27 (1989) 393-398.
- [109] Zapf, S., Hoßfeld, M., Anke, H., Velten, R., Steglich, W.: Darlucins A and B, New Isocyanide Antibiotics from *Sphaerellopsis filum* (*Darluca filum*). *J. Antibiot.* 48 (1995) 36-41.

- [110] Mirabelli, C. K., Bartus, H., Bartus, J. O. L., Johnson, R., Mong, S. M., Sung, C. P., Crooke, S. T.: Application of a Tissue Culture Microtiter Tests for the Detection of Cytotoxic Agents from Natural Products, *J. Antibiot.* 38 (1985) 758-766.
- [111] Erkel, G., Anke, T., Velten, R., Gimenez, A., Steglich, W.: Hyphodontal, a New Antifungal Inhibitor of Reverse Transcriptases from *Hyphodontia* sp. (Corticaceae, Basidiomycetes), *Z. Naturforsch. C*, 49(9-10) (1994) 561-570.
- [112] Eilbert, F., Engler-Loehr, M., Anke, H.: Bioactive Sesquiterpenes from the Basidiomycete *Resupinatus leightonii*, *J. Nat Prod.* 63 (2000) 1286-1287.
- [113] Schreier, P.: Chromatographic Studies of Biogenesis of Plant Volatiles, Hüthig, Heidelberg (1984).
- [114] Sandra, P., Bicchi, C.: Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis, Hüthig, Heidelberg (1987).
- [115] Sugisawa, H., Teranishi, R., Flath, R. A., Sugisawa, H. (eds.): Sample Preparation. Isolation and Concentration in Flavour Research. Recent Advances, Food Science Ser. 7 (New York) (1981).
- [116] Tswett, M. S.: Chromatographic Adsorption Analysis. Selected Works, M. R. Masson (Translation editor), V. G. Berezkin (Compiler), Ellis Hollywood, New York (1990).
- [117] Maier, H. G.: Lebensmittel- und Umweltanalytik, Steinkopff (Darmstadt) (1990).
- [118] Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A.: Rapid Chromatographic Techniques for Preparative Separation with Moderate Resolution, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 2923-5
- [119] Kovats, E.: Gas Chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen, I. Retentions indices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone, *Helv. Chim. Acta* 41 (1958) 1915-1932.
- [120] Van den Dool, H., Kratz, P. D.: A Generalization of the Retention Index System Including Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography, *J. Chromatogr.* 11 (1963) 463-471.
- [121] McLafferty, F. W., Tureček, F.: Interpretation of Mass Spectra, 4<sup>th</sup> Edition, University Science Books (Sausalito) (1993).
- [122] Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., Alice, M. B.: Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* 49 (1968) 2240-2249.
- [123] Clegg, G. A., Dole, M.: Molecular Beams of Macroions. III. Zein and Polyvinylpyrrolidone. *Biopolymers* 10 (1971) 821-826.
- [124] Iribarne, J. V., Thomson, B. A.: On the Evaporation of Small Ions from Charged Droplets, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2237-2294.

- [125] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M.: Electrospray Ionization for Mass Spectrometry for Large Biomolecules, *Science* 246 (1989) 64-71.
- [126] Carroll, D. I., Dzidic, I. Stillwell, R. N., Haegele, K. D., Hornig, E. C.: Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry: Corona Discharge Ion Source for Use in Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer-Computer Analytical System, *Anal. Chem.* 44, 14 (1975) 2369-2373.
- [127] Raffaelli, A., Saba, A.: Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 22 (2003) 318-331.
- [128] Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U.: Matrix-assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-volatile Compounds, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 78 (1987) 53-68.
- [129] Karas, M., Bahr, U., Gießmann, U.: Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 10 (1991) 335-357.
- [130] Michel, D. Grundlagen und Methoden der kernmagnetischen Resonanz, Akademie Verlag (1981).
- [131] Canet, D.: NMR-Konzepte und Methoden, Springer Verlag, Heidelberg (1994).
- [132] Ernst, R. R., Anderson, W. A.: Application of Fourier Transform Spectroscopy to Resonance, *Rev. Sci. Instr.* 37 (1966) 93-102.
- [133] Berger, S., Braun, S.: 200 and more NMR Experiments, Wiley-VCH, Weinheim (2004).
- [134] Günzler, H., Gremlich, H.-U.: IR-Spektroskopie. Eine Einführung. 4. Auflage, Wiley-VCH (2003).
- [135] Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W.: Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart (1998).
- [136] Dorland's Illustrated medicinal Dictionary, 30<sup>th</sup> Edition, Saunders, Philadelphia (PA) (2003).

## Veröffentlichungen

- [1] Campos Ziegenbein, F., Hanssen, H.-P., König, W. A.: Secondary Metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*, *Phytochemistry*, 2(1) (2006), 202-211.
- [2] Campos Ziegenbein, F., Hanssen, H.-P., König, W. A.: Volatile Metabolites from Three Wood Rotting Fungi, *Flavour Fragr. J.* (2006) (im Druck).

## Poster

- [A] Campos Ziegenbein, F., König, W. A.: Terpenes from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*, *Terpnet 2005 Plant Research International*, 20-23 April 2005 in Wageningen/Niederlande
- [B] Campos Ziegenbein, F., König, W. A.: Chemical constituents of five wood rotting mushrooms, *Terpnet 2005 Plant Research International*, 20-23 April 2005 in Wageningen/Niederlande

## **Danksagungen**

Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich der NMR-Abteilung und Herrn Dr. V. Sinnwell.

Für die nette Atmosphäre danke ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises König. Besonderen Dank gilt Dr. F. Werner und Dr. Hans-Peter Hanssen für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. S. Franke danke ich für die Einführung in die Bedienung der LC-MS/MS-Anlage.

Frau Meiners und Herrn Manfred Preuße danke ich für die Aufnahme der EI- und FAB-Massenspektren.

Frau Prof. H. Anke danke ich für die Durchführung der biologischen Tests im IBWF e. V. in Kaiserslautern.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und dafür nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen habe.

Fernando Campos Ziegenbein