

Phytochemische Untersuchungen an einheimischen  
Baumpilzen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dennis Lass  
aus Hamburg

Hamburg 2009

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 2001 bis September 2007 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt:

- a) September 2001 bis Mai 2004: Unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W.A. König bis zu seinem Tod
- b) Mai 2004 bis September 2007: Herr Priv. Doz. Dr. W. Schultze (Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Hamburg).
- c) Mai 2004 bis September 2007: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Francke am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg.

**1. Prüfer:** Prof. Dr. W. Francke

**2. Prüfer:** Prof. Dr. J. A. C. Broekaert

**Tag der Disputation:** 3. Juli 2009

---

**Für meine Eltern**

---

## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. W.A. König danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die intensive Zusammenarbeit, Betreuung und Förderung bis zu seinem Tode.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. W. Francke danke ich für das fortwährende Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme der Begutachtung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Schultze danke ich für die Übernahme meiner Betreuung, der Bereitstellung der beiden Themenpunkte *Heterobasidion annosum* und *Inonotus obliquus*, sowie für die zahlreichen Diskussionen.

---

Herrn Dr. V. Sinnwell und dem NMR-Team danke ich für die Aufnahmen von NMR-Spektren und die freundliche und hilfsbereite Art mich auch bei schwierigen NMR-spektroskopischen Problemen zu unterstützen.

Herrn M. Preuße und Frau M. Meiners danke ich für die Anfertigung der Massenspektren und der vielen GC-MS-Messungen.

Herrn Kay Haacker und Herrn Frank Meyer danke ich für die Durchführung von GC-Analysen und die Bearbeitung von zahlreichen Grafiken.

Meinen Kollegen Herrn Dipl. Chem. Stephan von Reuß und Master of Science (Biophysical Chemistry) Adewale Martins Adio danke ich für die Hilfe bei technischen und NMR-spektroskopischen Problemen.

Herrn Prof. Dr. O. Sterner (Universität Lund) danke ich für die Bereitstellung von NMR-Daten.

Herrn Dr. Norbert Amelang danke ich für die Übersendung der Proben von *Phellinus robustus*.

Meinen beiden Schwestern Ilka und Karin Lass danke ich für die Korrekturlesung. Meinen Eltern Anke und Wolfgang Lass danke ich für ihre Geduld, die sie in den Jahren aufbringen mußten.

Herrn Dipl. Chem. Sönke Asmusen und Herrn Dipl. Chem. York Zimmermann danke ich für zahlreiche aufbauende Gespräche und viele unterhaltsame Momente, die zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Pilze / Baumpilze .....	1
1.2	Pilzinhaltsstoffe .....	2
1.3	Verwendung und Bedeutung von Pilzen .....	3
A)	Pilze als Nutzorganismen.....	3
B)	Pilze als Schadorganismen .....	4
2	Problemstellung.....	7
3	Allgemeiner Teil.....	9
3.1	Untersuchte Pilzarten .....	9
3.1.1	Taxonomische Zuordnung.....	9
3.1.2	<i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.: Fr.) Bref. (Wurzelschwamm) .....	9
3.1.3	<i>Phellinus robustus</i> (Karst.) Bourdot & Galzin (Eichenfeuerschwamm) .....	12
3.1.4	<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw.: Fr.) P.Karst. ....	13
3.1.5	<i>Inonotus obliquus</i> (Pers.: Fr.) Pil. ....	16
3.2	Flüchtige Inhaltsstoffe / Etherische Öle .....	20
3.3	Nicht flüchtige Inhaltsstoffe von Pilzen .....	21
3.3.1	Steroide.....	21
3.3.2	Aromaten.....	23
3.4	Naturstoff-Isolierung und Analytik.....	24
3.4.1	Allgemeines Vorgehen bei der Naturstoffisolierung aus Pilzen .....	24
3.4.2	Extraktionsmethoden .....	25
3.4.3	Chromatographische Trennmethode.....	27
3.4.4	Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung.....	30
4	Spezieller Teil.....	31
4.1	Isolierung von Inhaltsstoffen aus <i>Phellinus robustus</i> .....	31
4.1.1	Aufarbeitung von <i>Phellinus robustus</i> .....	31
4.1.2	Auftrennung des Hexan-Extraktes .....	32
4.1.3	Auftrennung des Dichlormethanextraktes .....	38
4.1.4	Inhaltsstoffe des Dichlormethanextraktes.....	40
4.2	Isolierung von Inhaltsstoffen aus <i>Heterobasidion annosum</i> .....	84
4.2.1	Aufarbeitung von <i>Heterobasidion annosum</i> .....	84
4.2.2	Auftrennung des Wasserdampfdestillates.....	85
4.2.3	Inhaltsstoffe aus dem Wasserdampfdestillat .....	86
4.2.4	Überprüfung der isolierten Sesquiterpene von <i>H. annosum</i> auf Artefaktbildung .....	129
4.2.5	Weitere Substanzen aus dem Wasserdampfdestillat .....	133
4.2.6	Untersuchung des Methanolextraktes .....	140
4.3	Isolierung von Inhaltsstoffen aus <i>Fomitopsis pinicola</i> .....	146
4.3.1	Dichlormethanextrakt der Kruste .....	146
4.4	Das Wasserdampfdestillat von <i>Inonotus obliquus</i> .....	152
4.5	Vergleiche der RI-Werte von Substanzen aus <i>I. obliquus</i> und <i>H. annosum</i> ...	156
5	Zusammenfassung .....	159
6	Summary .....	163
7	Experimenteller Teil.....	167
7.1	Chemikalien, Messgeräte und Methoden .....	167
7.1.1	Reagenzien und Lösungsmittel .....	167

7.1.2	Dünnschichtchromatographie.....	167
7.1.3	Flüssigchromatographie .....	167
7.1.4	Hochleistungsflüssigchromatographie.....	167
7.1.5	Konventionelle Kapillargaschromatographie .....	168
7.1.6	Enantioselektive Kapillargaschromatographie.....	169
7.1.7	Präparative Kapillargaschromatographie .....	169
7.1.8	Präparative Gaschromatographie .....	170
7.1.9	Massenspektrometrie und GC-MS .....	170
7.1.10	NMR-Spektroskopie .....	172
7.1.11	Polarimetrie .....	172
7.1.12	Wasserdampfdestillation .....	172
7.1.13	Extraktionsverfahren des Pilzmaterials .....	172
7.1.14	Herkunft des Pilzmaterials.....	173
7.2	Isolierung von Inhaltsstoffen aus <i>Phellinus robustus</i> .....	173
7.2.1	Hexan-Extrakt .....	173
7.2.2	Dichlormethan-Extrakt.....	175
7.3	Isolierung von Inhaltsstoffen aus <i>Heterobasidion annosum</i> .....	181
7.3.1	Auftrennung des Wasserdampfdestillates.....	181
7.4	Isolierung von Inhaltsstoffen aus <i>Fomitopsis pinicola</i> .....	193
7.4.1	Dichlormethanextrakt der Kruste von <i>Fomitopsis pinicola</i> .....	193
7.5	Herstellung und Fraktionierung des Wasserdampfdestillates von <i>Inonotus obliquus</i> .....	196
8	Gefahrstoffanhang .....	198
9	Spektrenanhang .....	199
10	Literaturverzeichnis.....	209

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>br</i>	breit
C	Anzahl der C-Atome, Elementsymbol Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
<sup>13</sup> C-NMR	Kohlenstoff-13-resonanzspektroskopie
CD	Cyclodextrin
COSY	Correlated Spectroscopy
<i>d</i>	Dublett
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie
SC	Säulenchromatographie
GC	Gaschromatographie
EI	Elektronenstoß-Ionisation
FID	Flammenionisationsdetektor
GC/MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie Kopplung
g	Gramm
GPC	Gelpermeationschromatographie
H	Elementsymbol Wasserstoff
<sup>1</sup> H-NMR	Protonenresonanzspektroskopie
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
Hz	Herz
i.D.	Innendurchmesser
J	Kopplungskonstante
LM	Laufmittel
L	Liter
LC	Flüssigchromatographie
<i>m</i>	Multipllett
m	Meter; Vorsilbe Milli (10 <sup>3</sup> )
m/z	Masse pro Ladung
[M+]	Molekülion

Me	Methyl-
min	Minuten
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spektroskopie
PENDANT	Polarisation Enhancement that is Nurtured During Attached Nucleus Testing
ppm	parts per million
<i>q</i>	Quartett
R	Alkylrest; chemischer Rest
rel. int.	relative Intensität
RI	Retentionsindex
s	Singulett
Tab.	Tabelle

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Pilze / Baumpilze <sup>1,2</sup>

Pilze sind im Gegensatz zu Pflanzen, bedingt durch das Fehlen von Plastiden, heterotrophe, eucaryotische Organismen. Sie können die für den Stoffwechsel benötigten Kohlenstoffverbindungen und z. T. auch Stickstoffverbindungen nicht selber synthetisieren und müssen diese aus anderen Quellen beziehen, d.h. sie sind C-heterotroph (z.T. auch N-heterotroph). Aufgrund dieser Tatsache haben sich drei Ernährungsformen bei den Pilzen entwickelt: Saphrophytismus (Aufschluss und Verwertung abgestorbener Organismen), Parasitismus (Befall gesunder oder kranker Organismen) und Symbiose (Zusammenleben mit einem Wirtsorganismus zu gegenseitigem Nutzen). Bei den Baumpilzen findet man hauptsächlich die ersten beiden Ernährungsformen, was sie zwar einerseits in den meisten Fällen als Forst- und Bauholzschädlinge kennzeichnet, andererseits üben sie als Holzzersetzer aber auch eine wichtige Rolle im Ökosystem aus. Die Aufnahme der Nährstoffe erfolgt in den meisten Fällen in gelöster Form (osmotroph). Nur wenige Gruppen der Schleimpilze (*Myxomycota*) sind in der Lage, auch feste Partikel durch Inkorporation aufzunehmen (phagotroph). Bei Baumpilzen findet man zwei Erscheinungsformen der Zersetzung, die Weiß- und die Braunfäule. Bei der Weißfäule entzieht der Pilz dem Holz Lignin und hinterläßt die Cellulose (weiß). Braunfäule erzeugende Baumpilze entziehen ihrem Wirt die Cellulose und Hemicellulosen und hinterlassen die rotbraun gefärbten, aromatischen Ligninbestandteile. Es ist nicht immer möglich, vom Erscheinungsbild des Holzes auf die Art der jeweiligen Holzfäule zu schließen. So hinterläßt der Wurzelschwamm *Heterobasidion annosum* einen rot gefärbten Rückstand. Dieses führte zur Bezeichnung „Rotfäule“. *H. annosum* baut aber im Wirt nur Lignin ab und gehört somit zu den Weißfäule erzeugenden Baumpilzen.

Wesentliche Merkmale im Bauplan der Pilze sind neben dem Vorkommen einer Zellwand (nur wenige Ausnahmen) die Existenz von Vakuolen, Organellen und Cytoplasmamembranen, sowie eines echten Zellkernes. Damit zählen sie zu den Eukaryoten. Sie bilden ein wenig differenziertes, thalloses Flechtgewebe (Mycel), welches im Einzelnen aus Hyphen (Pilzfäden) besteht (Thallophyten). Die Hyphen sind lange, schlauchartige, verzweigte Einheiten mit einem Durchmesser von 0,5 bis 100 µm und besitzen fast immer mehrere Zellkerne (coenocytisch). Die Hyphe kann in einzelne Bereiche aufgeteilt sein (septiert) oder keine Trennungen zeigen

(unseptiert). Unseptierte Hyphen findet man z.B. bei *Zygomyceten* und septierte bei *Ascomyceten*. Beim Wachstum des Mycels kann es auf Grund unterschiedlicher Anforderungen zur Bildung verschiedener Hyphenformen kommen, welche an die entsprechenden Aufgaben angepasst sind. Man kann sie einteilen in Hyphen für das vegetative Wachstum, z.B. Keimhyphen, Infektionshyphen, Fanghyphen und Laufhyphen. Außerdem findet man Hyphen für die vegetative und sexuelle Vermehrung, z.B. Konidien- und Basidiosporenbildung, sowie für die Überdauerung (Dauersporen, wie Chlamydosporen).

Der Lebenszyklus eines Baumpilzes (gehören überwiegend zur Klasse der Ständerpilze = Basidiomycetes) beginnt mit dem Zusammentreffen zweier verschiedengeschlechtlich determinierten Basidiosporen; unter günstigen Bedingungen keimen diese aus und bilden ein haploides Mycel (Primärmycel). Beim Aufeinandertreffen verschiedengeschlechtlicher Hyphen fusionieren zwei undifferenzierte Zellen (Somatogamie), wobei es lediglich zur Plasmogamie kommt. Aus dieser dicaryotischen Zelle („Zweikernstadium“) entsteht dann durch konjugierte Mitosen (oft kombiniert mit Schnallenbildung) ohne stattfindende Kernverschmelzung ein dicaryotisches Mycel (Sekundärmycel).

Unter günstigen, z. T. bisher nicht bekannten, Bedingungen kann das Sekundärmycel Fruchtkörper bilden. Diese entstehen durch enge Verflechtung der Pilzhyphen (Plectenchym), die z. T. auch eng verkleben können (Pseudoparenchym). Im Hymenium eines Fruchtkörpers differenzieren sich Endzellen der Hyphenstränge zu Basidien, in denen nach Karyogamie und Meiose meist vier haploide Sporen entstehen, die dann jeweils in einen Auswuchs (Sterigma) einwandern und als Basidiospore abgeworfen werden<sup>153</sup>.

Bei den Pilzen geht man heute von ca. 80000 bis 100000 bekannten Arten aus. Es wird aber vermutet, dass min. 1,5 Millionen Arten existieren. Jährlich werden ca. 1800 neue Pilzarten beschrieben, was indirekt diese Schätzungen bestätigt<sup>3, 4</sup>.

## 1.2 Pilzinhaltsstoffe

Pilzinhaltsstoffe kann man aufteilen in Substanzen, die am Primärstoffwechsel beteiligt sind und Verbindungen, die sich daraus über spezielle Stoffwechselwege ableiten (Sekundärstoffe). Diese können ganz unterschiedliche Funktion haben, wie z.B. Abschreckung für Fraßfeinde, Lockstoffe oder zur Abwehr von konkurrierenden

Pilzen und Bakterien (Antimycotika / Antibiotika). An Verbindungen des Primärstoffwechsels kommen in Pilzen unterschiedliche Polysaccharide, wie z.B. Cellulose, Glykogen, Glucan, Chitin (in den Zellwänden höherer Pilze), Chitosan, Polygalactosamin, Galactane und Mannan vor, sowie Fette und Fettsäuren. Charakteristische Reservestoffe für Pilze sind Glykane, die strukturell weitgehend dem Glykogen entsprechen. Stärke sowie Saccharose fehlen.

An Verbindungen des Sekundärstoffwechsels findet man in den unterschiedlichen Pilzen Verbindungen wie Polyine, Polyketide, Phenole (Chinone, Anthrachinone, Xanthone) und Terpene (Mono- bis Triterpene (incl. Sterole)). Desweiteren kommen N- und S-haltige Verbindungen, wie z.B. zyklische Peptide, S-haltige Amide, Harnstoff, Amine und Betaine vor. Bestimmte Verbindungen sind auf Pilze beschränkt, wie z.B. Penicillin und Muskarin<sup>5</sup>.

### 1.3 Verwendung und Bedeutung von Pilzen

Pilze haben eine immense Bedeutung als Schad- und Nutzorganismen. Das folgende Übersichtsschema zeigt, welche Aufgaben und Eigenschaften Pilze haben.

#### Pilze als Nutz- und Schadorganismen (Übersicht)<sup>6</sup>

##### A) Pilze als Nutzorganismen

###### 1.1 Pilze im Ökosystem

###### 1.1.1 Holzerstörende Pilze

Meist Basidio- seltener Asco- oder Deuteromycozyten, die saprotroph (z.T. auch fakultativ parasitisch) auf Holz leben und durch Ausscheidung von Ektoenzymen das Holz (Abbau von Cellulose bzw. Cell. und Lignin) zersetzen (Holzfäule, Vermoderung)  
Beispiele: *Armillariella mellea* (Hallimasch), *Fomes fomentarius* (Zunderschwamm)

###### 1.1.2 Saprophyten anderer Substrate

Zahlreiche andere organische Materialien können durch – z. T. stark spezialisierte – Pilze zersetzt werden

###### 1.1.3 Symbiotische Pilze

###### *Mykorrhiza:*

- Symbiotisches Zusammenleben vieler Landpflanzen (Samenpflanzen, aber in abgewandelter Form auch Moose und Farne) mit Pilzen
- Pilzpartner: versorgt über sein feinverzweigtes Hyphensystem Pflanze mit Wasser, Nährsalzen, Stickstoff und Phosphat
- Pflanze: liefert organische Verbindungen (meist Kohlenhydrate) an den C-heterotrophen Pilz

###### *Flechten*

Enge Symbiose aus Pilz (Mycobiont) und Algen und/oder Cyanobakterien (Phyco- oder Photobiont), als ernährungsphysiologisch und morphologisch eigenständige Einheit (Flechtenthallus, „Doppelorganismus“)

## 1.2 Pilze als Nahrungsquelle

Erwerbsmäßiger Anbau: z.B. Kulturchampignon (*Agaricus bisporus* – Jahresweltproduktion ca. 800.000 t), Austernseitling (*Pleurotus ostreatus*); Shii-Take-Pilze (*Lentinus edodes*)

## 1.3 Produzenten von Nahrungs- und Genussmitteln (Auswahl)

- *Gärungsprodukte* (Ethanol): z.B. Bier, Wein, Sekt, Sake
- Nahrungsmittel: Backhefe, Sauerteig, Käsesorten (Camembert, Brie), Kefir; Combuca = „Teepilz“ (Bakterien + Hefen + Tee); viele asiatische Nahrungsmittel (Shoyusauce, Miso-Paste, Tempeh); Gemüse-Salzlake, Einzeller-Protein (als Tierfutter).
- *Chemikalien*: Ethanol, Glycerin, zahlreiche organische Säuren (z.B. Citronensäure)
- *Enzyme*: Amylasen (Brauvorgang), Cellulasen (Brauprozeß, Abfallaufarbeitung), Pektinasen (Fruchtsaftindustrie), Proteasen (Hydrolyse von Proteinen in Lebensmitteln und Getränken, besonders bei Käseherstellung), u.a.  
Biotechnologische Enzymprod. mit Mikroorganismen: Weltweit jährlich über 1 Mrd. €

## 1.4 Produzenten von Arzneistoffen

- Antibiotika*: Penicilline, Cephalosporine, Griseofulvin u.a.
- Mutterkornalkaloide* (*Claviceps purpurea*): Anwendung in der Frauenheilkunde, bei Migräne; LSD-Herstellung
- Für *mikrobielle Biotransformationen*: Partialsynthese von Steroidhormonen (*Rhizopus*, *Mucor* u.a.); Phenylacetylcarbinol zur Ephedrinproduktion; bei der Vitamin E- und Prostaglandinsynthese u.a.
- Cholesterolsenker*: HMG-Reduktase-Inhibitoren (z.B. Lovastatin) von *Aspergillus terreus*
- Immunstimulantien/Antitumoraktivität*: Pilzglucane wie Schizophyllan (*Schizophyllum commune*) und Lentinan (*Lentinus edodes*) bzw. Proteoglycane wie PSK und PSP (*Trametes versicolor*)

## B) Pilze als Schadorganismen

### 1.1 Pflanzenkrankheiten

Wirtschaftliche Schäden an Kulturpflanzen erreichen alljährlich Milliardenbeträge. Schätzungen: 10-20 % der möglichen Erträge werden durch Pilzschäden vernichtet. Beispiele:

#### 1.1.1. Rost- und Brandpilze

Rostpilze ((Uredinales): obligate Pflanzenparasiten; Erhebliche Schäden an Kulturpflanzen. An Getreide: Getreiderost (*Puccinia graminis*), an Pfefferminze: Minzenrost (*P. menthae*); Malvaceae: *P. malvacearum*; beide gelegentlich als Drogenverunreinigung. Brandpilze (Ustilaginales): Maisbrand (*Ustilago mayidis*)

### 1.2 Materialzerstörung durch Pilze

#### 1.2.1 Holzerstörung (vgl. A 1.1.1)

#### 1.2.2 Zerstörung diverser Materialien

- Papier (Bücher), Baumwolle, Wolle, Seide, Leder sowie entsprechende Textilien; Farben (auch Gemälde, Fresken); Glas, Kunststoffe; pharmazeutische Produkte, Kosmetik, u.a..
- Zerstörung meist durch sog. „Schimmelpilze“ (keine taxonomische Einheit; meist Deteromyceten, selten Zygo- und Ascomyceten; Saprophyten mit echtem Mycel; fast nur ungeschlechtliche Vermehrung; keine Fruchtkörperbildung; rasenartige samtig-flockige Überzüge bildend).

#### 1.2.3. Lebensmittelverderbnis

Schimmelpilze (neben Bakterien und Hefen) sind bedeutende Lebensmittelverderber (Weltweiter Ernte(produkt)Verlust ca. 5. %). Schadwirkung durch Materialabbau (als Nährsubstrat) / Ausscheidung von Mykotoxinen (z.B. Aflatoxine, Patulin) / Mitverarbeitung toxischer Pilzteile (Sklerotien von *Claviceps purpurea*)

### 1.3 Erzeugung von Krankheiten bei Mensch und Tier

#### 1.3.1 Mykotoxikosen

Werden durch Mykotoxine verursacht (= toxische Metaboliten von Mikromyceten, meist Schimmelpilzen).

- Ca. 300 Mykotoxine bekannt; werden durch Erhitzen nicht zerstört

- Toxizität von Schimmelpilzen ist nicht erkennbar (=> verschimmelte Lebensmittel nicht essen !)
- *Aflatoxikose* (durch *Aspergillus flavus* u.a.):  
Stärkste Naturstoffkarzinogene (Aflatoxine → Epoxidierung durch Cytochrom-P<sub>450</sub> → Bindung an Guanin der DNS)  
Höchstmengen der Aflatoxinverordnung: 2 µg/kg Lebensmittel an Aflatoxin B<sub>1</sub>; andere Aflatoxine insgesamt 4 µg/kg
- *Ergotismus* (Sklerotien von *Claviceps purpurea*, Mutterkornalkaloide) → früher im Mehl, aktuell in Biogetreideprodukten

### 1.3.2 Mycetismus

Vergiftung durch Verzehr toxischer (= Pilzgifte enthaltender) Makromyceten (= Giftpilze)  
In Europa mehr als 100 Giftpilze (meist Basidiomyceten, wenige Ascomyceten).

Besonders gefährlich:

- *Amanita phalloides*, *A. verna*, *A. virosa*  
(Grüner, Frühlings- und Spitzkegeliger Knollenblätterpilz)
  - Hauptgifte: Amanitine (α, β, γ) = zyklische Oktapeptide mit Sulfoxid-Brücke (werden beim Erhitzen nicht zerstört!) → Phalloides-Syndrom
- *Inocybe- und Clitocybe-Arten* (Rißpilze und Trichterling)
- Pilzgift: Muscarin (Muscarin-Syndrom)  
Nervengift, ersetzt Acetylcholin (→ direktes Parasympathikomimeticum;  
Antidot Atropin)
- *Amanita muscaria*: Hauptgiftstoffe des Fliegenpilzes Ibotensäure und Muscimol  
(*Amanita muscaria*-Syndrom)

### 1.3.3 Mykosen

Pilz (haupts. Zygomyceten, Ascomyceten, Deuteromyceten) ist aktiver Erzeuger einer infektiösen Krankheit (Zerstörung von Zellen, Schädigung von Organen bzw. des Gesamtorganismus).

### 1.3.4 Allergosen

Inhaltsstoffe bestimmter Pilze können bei Mensch und Tier Allergien auslösen; als Allergene können z.B. *Candida*-Arten bei Dermatomykosen wirken oder Sporen (Inhalation) einer Reihe von Schimmelpilzen.

## Traditionelle und moderne Anwendungen von Pilzen

Pilze spielen seit Jahrtausenden in der Geschichte und Kultur der Menschheit eine Rolle als Nahrung, Sucht- und Heilmittel. Aus Guatemala stammen Pilzskulpturen, die die Wirkung halluzinogener Pilze symbolisieren sollen. Diese Skulpturen werden auf ein Alter von 3000 Jahren geschätzt. In Europa werden die ersten Pilze von Hippokrates (4. Jh. vor Ch.) und von Theophrast (3. Jh. vor Ch.) erwähnt<sup>8</sup>. Im fernöstlichen Bereich werden Pilze, wie z.B. *Ganoderma lucidum*, seit Jahrtausenden in der Medizin verwendet. In der medizinischen Anwendung von Pilzen bildeten sich in den unterschiedlichen Kulturbereichen verschiedene Anwendungsmuster aus. In der traditionellen chinesische Medizin (TCM) wird Nahrung und Medizin als Einheit gesehen. Daraus folgt, dass in der TCM der gesamte Pilz für die gewünschte Wirkung verantwortlich ist. In der traditionellen westlichen Medizin (TWM) wurde früh versucht, Krankheiten mit bestimmten Pilzen, deren Teilen oder Extrakten zu behandeln<sup>8</sup>. Dieses Vorgehen wurde bis in die Gegenwart beibehalten und

verfeinert. Heute kommen standardisierte Extrakte, Einzelsubstanzen oder deren Derivate in der Medizin zum Einsatz. So werden Alkaliode aus dem Mutterkorn *Claviceps purpurea* in der Gynäkologie oder bei niedrigem Blutdruck eingesetzt. Neben den früher verwendeten *Basidiomyceten* finden seit dem letzten Jahrhundert auch vermehrt die Stoffwechselprodukte der Fungi imperfecti (*Deuteromycetes*) medizinische Verwendung. Diese liefern z.B. Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine und Lovastatine, sowie Immunsuppressiva, wie Cyclosporine<sup>8</sup>. Neben diesen Wirkstoffen sind in letzter Zeit immunstimulierende Polysaccharide, wie z.B. Lentinan, Schizophyllan, PSK (Kristin) und PSP (Polysaccharide-Peptide) aus Pilzen wie *Trametes versicolor* und *Schizophyllum commune* als mögliche Arzneistoffe entdeckt worden<sup>7</sup>. Diese Verbindungen sind durch die immunstimulierende Wirkung in der Lage, das Wachstum von Tumorzellen zu vermindern. Ein weiteres interessantes Polysaccharid ist das Pullulan aus *Aureobasidium pullulans* (1/4 1/6)- $\alpha$ -D-Glucan). Diese Verbindung kann durch ihre Eigenschaften als Stärkeersatz, Filmbildner für die Wundheilung und viskositätserhöhendes Hilfsmittel in kosmetischen und pharmazeutischen Produkten verwendet werden<sup>7</sup>. Für die Gewinnung dieser Stoffwechselprodukte wird zunehmend die Fermentier-Technologie eingesetzt, die es erlaubt, unter kontrollierten Bedingungen große Mengen an den gewünschten Verbindungen zu gewinnen. Durch Kombination der Fermentier- mit der Gentechnologie ist es möglich, wirksame Verbindungen aus Großpilzen (*Basidiomyceten*) schnell und kostengünstig zu produzieren<sup>8</sup>.

Seit einiger Zeit wird auch versucht, die Fähigkeiten von Pilzen zum Abbau von Umweltgiften und Schadstoffen zu nutzen<sup>9</sup>. So konnte gezeigt werden, dass Hefen wie *Saccharomonospora viridis* in der Lage sind, innerhalb von acht Tagen Phenole, wie z.B. PCP in Flüssigkeiten abzubauen<sup>10</sup>. Es wird versucht, diese und ähnliche Fähigkeiten von Pilzen, z.B. den Abbau von Pestiziden, Roh-, Altöl und anderen Substanzen zur Reinigung von Industrieabfällen (Abwasser / Boden) zu nutzen<sup>9</sup>.

## 2 Problemstellung

Die Untersuchung von Inhaltsstoffen aus Pflanzen und Pilzen ist aus unterschiedlichen Gründen von Interesse. Zum einen dient das Wissen über die stoffliche Zusammensetzung einer Spezies zur besseren Zuordnung in der Taxonomie (Chemotaxonomie). Zudem ist es für die Grundlagenforschung nützlich, indem Hinweise über das Vorkommen von Substanzen geliefert werden, die z.B in der Pharmazie als neue Leitstrukturen für die Entwicklung von Arzneimitteln dienen können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Baumpilze *Phellinus robustus* (Eichenfeuerschwamm), *Heterobasidion annosum* (Wurzelschwamm), *Fomitopsis pinicola* (Rotrandiger Baumschwamm) und *Inonotus obliquus* (Schiefer Schillerporling) im Bezug auf ihre stoffliche Zusammensetzung und das Vorkommen möglicher neuer Verbindungen hin untersucht werden. Dies schien aus zwei Gründen interessant zu sein:

1. Bis auf *Fomitopsis pinicola*, existierten über die anderen Arten bis zum jetzigen Zeitpunkt keine oder nur unzureichende Untersuchungen.
2. Für alle genannten Pilze wurden unterschiedliche Bioaktivitäten nachgewiesen.

Von *Phellinus robustus* ist lediglich bekannt, dass Extrakte dieses Pilzes Immunsystem stärkende Wirkungen aufweisen, welche auf das Vorkommen von Melaninen zurückzuführen sein sollen<sup>29</sup>. Weitere Inhaltsstoffanalysen existieren bisher nicht.

Für *Heterobasidion annosum* und *Inonotus obliquus* ist eine große Anzahl an pharmakologischen Wirkungen beschrieben worden; auch werden z.T. zahlreiche medizinische Anwendungen genannt. Untersuchungen auf mögliche Wirkstoffe beschränkten sich in diesen Fällen aber nur auf nichtflüchtige Verbindungen. Hier sollte deshalb bei diesen Arten das Spektrum der flüchtigen Verbindungen geklärt werden. Bei *Inonotus obliquus* schien dies auch deshalb von Interesse weil aus diesem Pilz im großen Stiel ein erfrischendes und belebendes Getränk gewonnen wird, dem auch arzneiliche Wirkungen zugeschrieben werden.

Bei *Heterobasidion* existierte zwar bereits eine Untersuchung, die die flüchtigen Inhaltsstoffe zum Gegenstand hat, allerdings sind dort zahlreiche neue Sesquiterpene aufgeführt, die in ihrer Struktur nicht aufgeklärt wurden<sup>141</sup>.

Aus dem ebenfalls medizinisch verwendeten Pilz *Fomitopsis pinicola* konnten in der Vergangenheit eine Reihe an bioaktiven Steroiden isoliert werden. Vorversuche deuteten allerdings auf das Vorliegen einiger weiterer unbekannter Verbindungen hin, deren Struktur ich aufklären wollte.

Zur genauen Klärung der einzelnen Fragestellungen sollten in dieser Arbeit unterschiedliche Extrakte und die Wasserdampfdestillate der einzelnen Baumpilze auf ihre Zusammensetzung und das Vorkommen unbekannter Naturstoffe hin untersucht werden. Die Auftrennung der mit unterschiedlichen Lösungsmitteln hergestellten Extrakte und Wasserdampfdestillate sollte mit gängigen chromatographischen Methoden (Gelpermeations- und Säulenchromatographie, sowie DC, HPLC und GC im analytischen und präparativen Maßstab) getrennt und isoliert werden. Für die Identifizierung standen gängige Methoden der Massenspektrometrie (EI-MS in Hoch- und Niederauflösung, GC/MS) und NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMQC, HMBC, HH-COSY, NOESY) zur Verfügung.

## 3 Allgemeiner Teil

### 3.1 Untersuchte Pilzarten

#### 3.1.1 Taxonomische Zuordnung

Die in dieser Arbeit untersuchten Spezies an Baumpilzen werden taxonomisch der Abteilung *Basidiomycota*, der Unterabteilung *Basidiomycotina*, der Klasse *Basidiomycetes*, der Unterklasse *Hymenomycetidae* und der Ordnung *Poriales* zugeordnet<sup>11</sup>. Weiter werden die Spezies wie folgt eingeteilt:

*Heterobasidion annosum*: Familie *Poriaceae*, Gattung: *Heterobasidion*.

*Phellinus robustus*: Familie *Hymenochaetaceae*, Gattung: *Phellinus*.

*Fomitopsis pinicola*: Familie *Poriaceae*, Gattung *Fomitopsis*.

*Inonotus obliquus*: Familie *Hymenochaetaceae*, Gattung: *Inonotus*.

#### 3.1.2 *Heterobasidion annosum* (Fr.: Fr.) Bref.

##### (Wurzelschwamm)

Synonyme für diesen Pilz sind auch *Fomitopsis annosa* (Fr.) P. Karst., *Polyporus annosus* Fr. und *Fomes annosus* (Fr.) Cke. .



Abb. 1: *Heterobasidion annosum* (Fr. :Fr.) Bref.

Systematik: Die Ordnung der *Poriales*, zu der *Heterobasidion* gerechnet wird bzw. wurde, ist derzeit noch als provisorisch aufzufassen und auch über die Familienzugehörigkeit dieses Pilzes gibt es durchaus unterschiedliche Auffassungen; je nach Autor und Konzept wurde dieser Pilz z.B. zu den *Heterobasidiaceae*, *Perenniporiaceae*, *Coriolaceae* oder *Polyporaceae* s.l. gerechnet. Neuerdings wird *Heterobasidion annosum* aufgrund von Merkmalen in der Mikrostruktur und in der DNA in die

Ordnung der *Russulales*, und zwar der Fam. der *Bondarzewiaceae*, gestellt <sup>11, 12</sup>. Nach Stalpers et al. <sup>13</sup> besteht die Gattung *Heterobasidion* weltweit aus sechs Arten, wobei in Europa nur *H. annosum* vorkommt. Diese ist charakterisiert durch das Fehlen von Schnallen, dextrinoide aber nicht amyloide Hyphen und 4-6 Poren pro mm.

**Makroskopische und mikroskopische Beschreibung:** Fruchtkörper resupinat, semipileat bis pileat; einzeln oder dachziegelig übereinander wachsend. Pileate Formen mit Hüten bis 150 mm breit und 100 mm vom Substrat abstehend, sowie bis 30 mm dick, konsolenförmig, halbrund bis langgestreckt, breit angewachsen, Oberseite höckerig, unregelmässig wulstig konzentrisch gezont, jung etwas filzig, später kahl, hellbraun, graubraun bis dunkelbraun und alt schwärzlich, Rand wellig, scharf, rotbräunlich, mit steriler Zone, junge Zuwachszonen weisslich, Unterseite feinporig, Poren rundlich-eckig bis aufgeschlitzt an seitlich wachsenden Fruchtkörpern, 3-4 (5) pro mm, Röhrenlänge 3-6 mm, bei mehrjährigen Fruchtkörpern sind die Röhren übereinander geschichtet, weisslich, cremefarben bis ockerlich. Trama weisslich bis cremefarben, Konsistenz frisch elastisch-zäh, trocken hart, holzig. Geruch stark pilzartig. Trama mit Melzers Reagenz dunkel rötlichbraun verfärbend. Hyphenstruktur dimittisch; generative Hyphen hyalin. Septen ohne Schnallen. Skeletthyphen ebenfalls hyalin, meist unverzweigt, cyanophil und dextrinoid. Sulpho-Cystiden vorhanden. Basidien keulig, hyalin, ohne basale Schnalle, 4-sporig. Sporenpulver weiß. Sporen breit ellipsoid-kugelig, feinwarzig, dünnwandig, schwach amyloid, 4-7 x 3-5 µm.

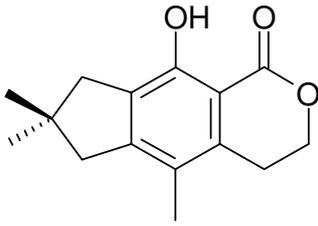
An feuchtem frischen Holz bildet das Myzel an blasenförmig angeschwollenen Hyphenenden zahlreiche Konidien; dies ist ein gutes Erkennungsmerkmal bei fehlenden Basidiocarprien <sup>14, 15</sup>.

**Standort / Ökologie:** In allen heimischen Wald- und Forstgesellschaften, zerstreut in naturnahen Mischwäldern, häufig in jüngeren Fichtenplantagen und anderen Forsten, gelegentlich auch in Parks, Gärten und Friedhöfen. Parasit und Saprobiont an Stammschäften, Stammbasen, Wurzeln und Stümpfen diverser Laub- und Nadelbaumarten von der Initial- bis zur Finalphase der Vermorschung. Nicht selten sitzen die Basidiocarprien am Wurzelhals oder in der inneren Aushöhlung alter Stümpfe. In Fichtenmonokulturen, besonders in jungen Aufforstungen auf ehemaligem Acker- oder Weideland, wo er oft epidemisch auftritt, kann der Pilz Schäden in Millionenhöhe anrichten. Die Infektion erfolgt meist über die Wurzeln, gewöhnlich von den Stammbasen befallener Bäume oder den Stümpfen ausgehend, die sehr rasch nach dem Fällen durch die allgegenwärtigen Sporen oder Konidien infiziert werden. Das Myzel steigt bei Fichten im Lauf der Jahre mehrere Meter im Stamm empor und verursacht eine intensive Weißfäule des Kernholzes, das sich rötlichbräunlich verfärbt und daher von den Forstleuten als „Rotfäule“ bezeichnet wird; schließlich löst sich das Holz faserig auf. Bei Kiefern kann die Fäule nicht im Stamm hochsteigen, dafür werden aber die Wurzeln zerstört und der Baum stirbt ab <sup>15</sup>.

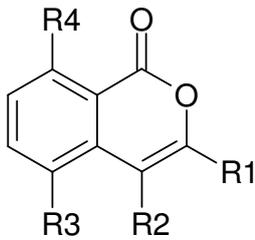
In der Vergangenheit konnte aus Extrakten von in Dualkulturen gezogenen Pilzen verschiedene bioaktive Benzopyran- und Benzodihydrofuranerivate isoliert werden <sup>18 - 21, 23</sup>. Untersuchungen verschiedener Fraktionen des ätherischen Öls zeigten ebenfalls Bioaktivitäten <sup>141</sup>. Koch und Lindequist et al. konnten beim Extrakt eine Hemmung des CD14-Rezeptors von Immunzellen nachweisen, der durch Lipopolysaccharide septische Schocks auslösen kann <sup>16, 17</sup>.

Verbindung	Literatur
7,8-Dihydro-9-hydroxy-5,7,7-trimethylcyclopenta-(g)-2-benzopyran-(6H)-1-on	18
5-Chloro-8-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-methyl-1H-2-benzopyran-1-on	19
8-Hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-methyl-1H-2-benzopyran-1-on	19
8-Hydroxy-3,4-bis-(hydroxymethyl)-1H-2-benzopyran-1-on	19
4-(1,2-Dihydroxyethyl)-8-methoxy-1H-2-benzopyran-1-on	19
Fomannoxinalcohol	20
Fomannosin	21
Fomannoxin	22
Fomajorin S	23

**Tab. 1: Substanzen aus Extrakt vom in Kultur gezogenen *Heterobasidion annosum*.**



7,8-Dihydro-9-hydroxy-7,7,7-trimethylcyclopenta-(g)-benzopyran-(6H)-1-on



R1=CH<sub>3</sub>, R2=CH<sub>2</sub>OH, R3=Cl, R4=OH ;

5-Chloro-8-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-methyl-1H-2-benzopyran-1-on

R1=CH<sub>3</sub>, R2=CH<sub>2</sub>OH, R3=H, R4=OH

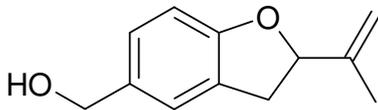
8-Hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-methyl-1H-2-benzopyran-1-on

R1=CH<sub>2</sub>OH, R2=CH<sub>2</sub>OH, R3=H, R4=OH

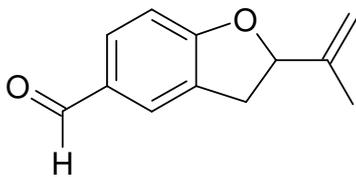
8-Hydroxy-3,4-bis-hydroxymethyl-1H-2-benzopyran-1-on

R1=H, R2=C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>(OH)<sub>2</sub>, R3=H, R4=OCH<sub>3</sub>

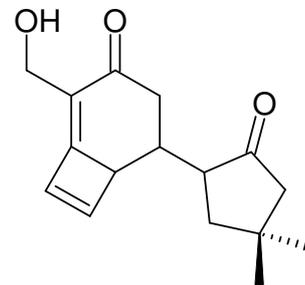
4-(1,2-Dihydroxyethyl)-8-methoxy-1H-2-benzopyran-1-on



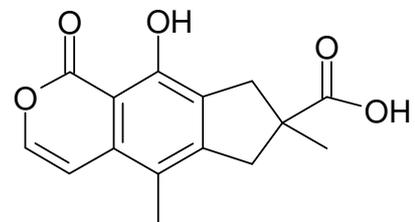
Fomannoxinalcohol



Fomannoxin



Fomannosin



Fomajorin S

Abb. 2: Verbindungen aus dem Extrakt von in Kultur gezogenen *Heterobasidion annosum*.

### 3.1.3 *Phellinus robustus* (Karst.) Bourdot & Galzin (Eichenfeuerschwamm)



**Abb. 3: *Phellinus robustus* (Karsten) Bourdot & Galzin.**

Systematik: Die Gattung *Phellinus* gehört zu den *Hymenochaetaceae* und umfaßt etwa 80 Arten, wovon in Europa 19 vorkommen<sup>15</sup>. Eine Synopsis (mit Schlüssel) der weltweit vorkommenden Arten findet sich bei Larsen et al.<sup>24</sup>. Zahlreiche Arten, die heute der Gattung *Phellinus* zugeordnet werden, sind in älterer Literatur unter anderen Gattungsbezeichnungen, wie z.B. *Ochroporus*, *Fomitiporia*, *Polyporus* u.a. beschrieben worden<sup>25</sup>.

Makroskopische und mikroskopische Beschreibung: Die Fruchtkörper des Eichenfeuerschwamms oder „Derben Korkporlings“ wachsen jung knollen-, später konsolen- bis hufförmig und oft mit schräg aufwärts gerichtetem Hymenophor, 80-250 mm breit, 50-200 mm hoch und 50-100 mm vom Substrat abstehend, Oberseite +/- glatt, krustig, wellig konzentrisch gezont, bisweilen etwas rissig, rost- bis grau-braun, alt schwarz-braun, Zuwachszone gelbbraun, Rand +/- stumpf, meistens abgerundet, gelbbraun, Unterseite fein porig, anfangs gelbbraun, dann rostbraun, Poren rundlich, 5-6 pro mm, Röhrenlänge bis 5 mm, Röhrenlagen geschichtet und deutlich durch dünne Tramalagen getrennt, gelb- bis rostbraun. Trama holzig, zäh, gezont, gelbbraun. Am Ende der Vegetationsperiode werden die Poren durch braune Hyphen überwachsen, so dass sie kaum noch zu erkennen sind. Einzelne, seltener mehrere gesellig beisammen und bisweilen verwachsen, Weisfäuleerzeuger.

Bei Beachtung der typischen Merkmale wie gelbbraune Trama, sehr kleine Poren, sowie runde, dickwandige, dextrinoide und cyanophile Sporen (6,5-7,5 x 6-7 µm), wie auch geschnäbelte Pseudosetae ist die Art beim Vorkommen auf *Quercus* gut zu erkennen<sup>14</sup>.

Standort und Ökologie: Parasitisch an lebenden *Quercus* (Eichen), auch an *Castanea* (Edelkastanie) und *Robinia* (Robinie), sowie seltener an andern Laubbäumen. Das ganze Jahr hindurch. Selten. Mehrjährig. Meist an einzeln stehenden, mächtigen alten Eichen. Schwächeparasit (greift das Splintholz an) und Saprobiont an (dicken) alten, stehenden Stämmen und Hauptästen, oft 10 und mehr Meter hoch, sowie an liegenden Stämmen, Stammabschnitten und Ästen. Der Pilz kann mehrere Jahrzehnte alt werden und tötet seinen Wirt nur sehr langsam ab. Spechte bauen ihre Höhlen mit Vorliebe in das weißfaule, leicht ausräumbare Holz direkt unter den Basidiocarprien<sup>14, 15</sup>.

*Phellinus robustus* wurde bisher, mit Ausnahme der Melanine, nicht auf seine Inhaltsstoffe hin untersucht. Erwähnt wird nur die Isolierung einer Substanzmischung, die als Pherofunginum bezeichnet wird<sup>26</sup>. Pherofunginum zählt, wie z.B. Tinkturen aus *Panax ginseng* oder *Eleutherococcus senticosus* zu den Adaptogenen<sup>27</sup>, welche

das Immunsystem stärken und unterstützen sollen <sup>28</sup>. Shcherba et al.<sup>29</sup> konnte antioxidative und genprotektive Wirkungen, welche durch die in *Phellinus robustus* vorliegenden Melanine bedingt sind, nachweisen. Weitere Untersuchungen erstreckten sich auf die Hemmung der Melanin-Biosynthese in diesem Pilz <sup>30</sup>, sowie die Möglichkeit, ihn als Produzent für Biogas <sup>31</sup> oder für den Abbau von TNT zu nutzen <sup>32</sup>. Der Einsatz des Pilzextrakts als Immunstimulans macht diesen Pilz interessant für eingehendere Untersuchungen im Bezug auf seine Inhaltsstoffe.

### 3.1.4 *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P.Karst.

#### (Rotrandiger Baumschwamm)

Synonyme für diesen Pilz sind *Boletus pinicola* Sw., *Fomes marginatus* (Fr.) Fr., *F. pinicola* (Sw. Fr.) Fr., *F. unguatus* (Schaeff.) Bizzozero, *Placodes unguatus* (Schaeff.) Ricken, *Polyporus pinicola* Sw. Fr., *Ungulina marginata* (Fr.) Pat.



Abb. 4: *Fomitopsis pinicola* (Swartz: Fr.) Karsten.

**Systematik:** Die Gattung *Fomitopsis* wird von Breitenbach et al. <sup>14</sup> und Ryvarden et al. <sup>33</sup> zur Familie der *Polyporaceae* gerechnet, während im „Dictionary of Fungi“ <sup>12</sup> und „Nordic Macromycetes Vol. 3“ <sup>34</sup>, eine – wohl auf Jülich zurückgehende – Zuordnung zur Familie der *Fomitopsidaceae* erfolgt. Nach dem „Dictionary of Fungi“ <sup>12</sup> umfaßt die Gattung *Fomitopsis* 32 Arten; nach Krieglsteiner et al. <sup>15</sup> werden dagegen weltweit nur bis zu 18 Arten unterschieden, wobei nur sieben in Europa vorkommen, die bei Ryvarden et al. <sup>33</sup> aufgeschlüsselt werden. In Deutschland treten davon nur zwei Arten, nämlich *F. pinicola* und *F. rosea*, auf.  
Einige früher gebräuchliche Synonyme für *Fomitopsis pinicola* sind *Boletus pinicola* Swartz, *Polyporus pinicola* Swartz: Fr., *Fomes pinicola*.

**Makroskopische und mikroskopische Beschreibung:** Fruchtkörper konsolen- bis hufförmig, breit am Substrat angewachsen, 50-200 (400) mm breit, 50-100 (200) mm abstehend, an der Anwachsstelle 30-150 mm dick, Oberseite gleichmässig buckelig bis höckerig, mit konzentrisch angeordneten, breiten Zuwachszonen, glatt, krustig, hart durch harzige Oberfläche, welche in der Hitze schmilzt

(Zündholz), alt grau bis schwärzlich, neue Zuwachszonen orange-rot bis gelb- oder grau-rosa mit weisslichem Rand, Rand abgerundet, gleichmässig bis etwas wellig, Unterseite porig, cremefarben, jung auch gelblich, alt bräunlich, Poren rundlich, 3-4 pro mm, Röhren-länge bis 2 mm, Röhren deutlich geschichtet. Im aktiven Wachstum mit Guttationstropfen auf Poren und Rand. Trama bis 40 mm dick an der Anwachsstelle, cremefarben bis ockerlich, hart zäh. Das Hyphensystem ist trimitisch; generative Hyphen (mit Schnallen), Skeletthyphen (dickwandig) und Bindehyphen (dickwandig und verzweigt). Die Basidien sind keulig, mit Basalschnalle. Die Basidiosporen sind elliptisch, glatt, hyalin und inamyloid. Der Geruch ist bei jungen Fruchtkörpern intensiv säuerlich und sehr charakteristisch. Der Geschmack ist bitter.

Die Fruchtkörper wachsen einzeln bis dachziegelig über- und nebeneinander und reagieren positiv geotrop.

Standort und Ökologie: *Fomitopsis pinicola* tritt in allen heimischen Laub-, Misch- und Nadelwaldgesellschaften auf und zwar an lebenden, stehenden Stämmen wie an toten, stehenden oder liegenden Stämmen, größeren Ästen, auch an Stümpfen, von der Initial- bis zur Finalphase der Vermorschung (Braunfäuleerzeuger). Hauptsächlich findet man diesen Pilz an Fichte, in weitem Abstand gefolgt von Rotbuche, Weißtanne, Waldkiefer, Birke und Erle u.a. ; das Wirtsspektrum ist beachtlich breit <sup>14, 15</sup>.

Im Altertum wurde *Fomitopsis pinicola*, wie z.B. *Fomes fomentarius* als Zunder zum Feuer machen eingesetzt <sup>35, 36</sup>. *Fomitopsis pinicola* sagt man eine immun-aktivierende und tumorhemmende Wirkung nach (Tumorart bzw. Zelllinie *Sarcoma* Nr.180). Als Heilpilz war er bei den Cree-Indianern (Ost-Kanada) weit verbreitet. In King's *American Dispensatory* aus dem Jahr 1895, wird der Pilz als Heilmittel gegen anhaltendes periodische Fieber, chronische Durchfälle, Ruhr, Nervenschmerzen, Kopfschmerzen, Harnleiden, Gelbsucht und Erkältungen aufgeführt <sup>37</sup>. Ferner findet *F. pinicola* Verwendung bei Entzündungen des Verdauungstraktes und als krebsvorbeugendes Mittel. An Mäusen konnten leberenzymaktivierende Effekte beobachtet werden <sup>37</sup>. Im „Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe“ <sup>38</sup> werden als Indikationen Fieberanfälle, sowie Leber- und Milzerkrankungen angegeben. Desweiteren findet sich im HAB 34 eine Monographie über diesen Pilz (Angabe nach Hager <sup>38</sup>), ebenso wie im homöopathischen Arzneibuch der vereinigten Staaten (HPUS 92). Insgesamt gibt „Hagers Handbuch“ <sup>38</sup> eine sehr gute Zusammenfassung über den Kenntnisstand bzgl. *F. pinicola*; allerdings ist hier die Formel von Pinicolsäure A falsch wiedergegeben. Der große medizinische Einsatzbereich macht den Pilz interessant für eingehendere Untersuchungen. In dieser Arbeit sollte deshalb das Inhaltsstoffspektrum dieses Pilzes näher untersucht werden. Bisher konnten aus *Fomitopsis pinicola* eine Reihe von Triterpenen und flüchtigen Verbindungen isoliert und nachgewiesen werden (vgl. Tab. 2).

Keller et al. konnte sieben Triterpene isolieren, von denen fünf antibakterielle Wirkung gegen *Bacillus subtilis* zeigten <sup>39</sup>. 2004 wiesen Zrimec et al. beim Extrakt von *Fomitopsis pinicola*, mittels *Vibrio fischeri* Biolumineszenstest eine gute antibakterielle Wirkung nach <sup>40</sup>.

Verbindung	Literatur
Pinicolsäure A	39 41 42
Pinicolsäure B	42
Pinicolsäure C	42
Pinicolsäure D	42
Pinicolsäure E	43
Pinicolol B	42
Pinicolol C	43
Fomitopsäure B	42
Agnosteron	42
Polyporensäure C	39 44 45
Eburicosäure	46
Pachymsäure	39
Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	39 47
Fomitopsäure	39
Lanosta-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ ,15-diol	47 42
21-Hydroxylanosta-7,9(11),24-trien-3-on	46 47
21-Hydroxylanosta-8,24-dien-3-on	39 47
3 $\alpha$ -Acetoxylanosta-8,14-dien-21-carbonsäure	39
Trametenolsäure B	39 44

Tab. 2: In der Literatur beschriebene Inhaltsstoffe von *Fomitopsis pinicola*

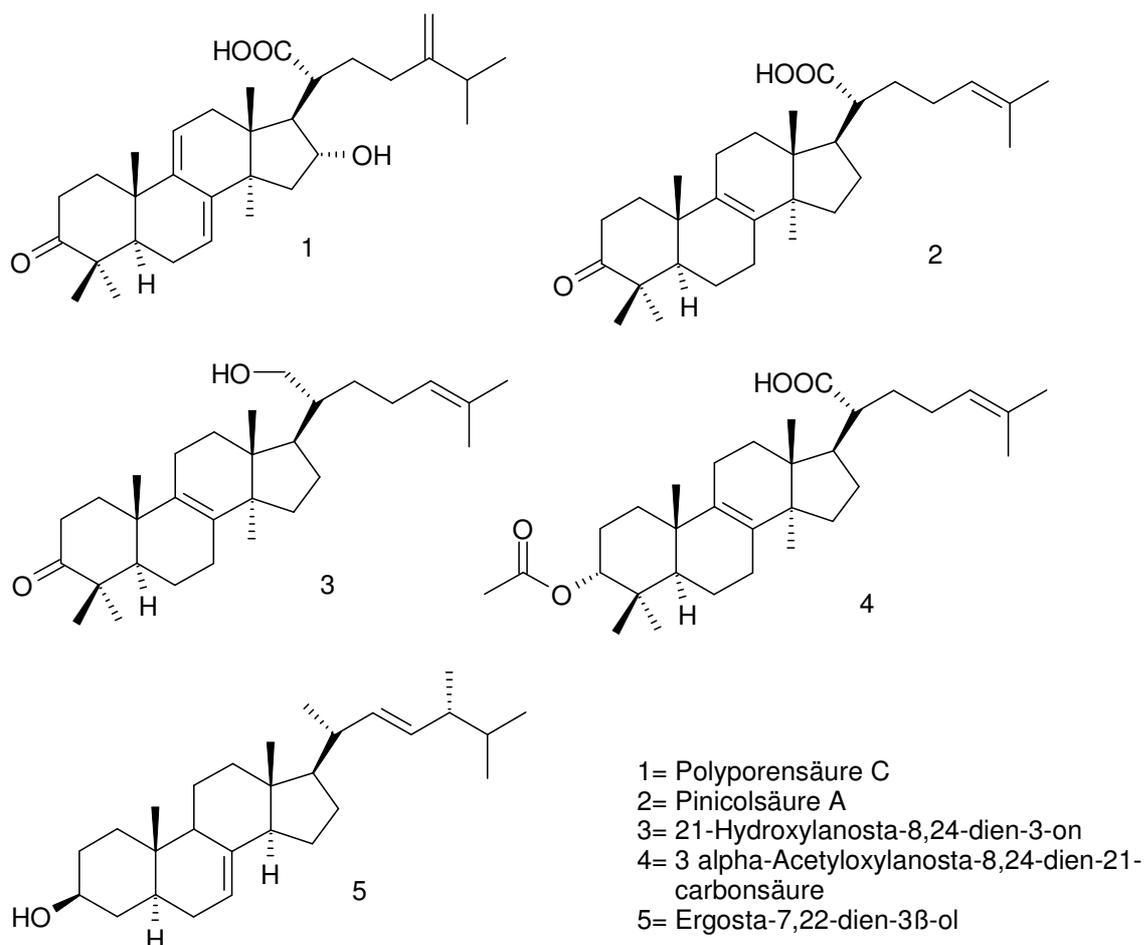
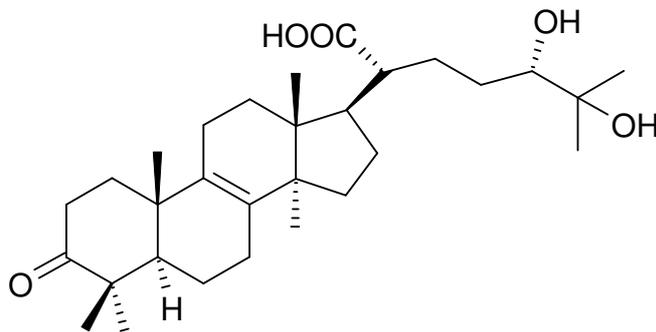


Abb. 5: Einige in *Fomitopsis pinicola* gefundene Triterpene <sup>39</sup>.

*Yoshikawa et al.* hat weitere Lanostan-Triterpe und Glycoside isoliert, welche auf die Aktivität der Isoenzyme der Cyclooxygenase (=COX) COX-1 und COX-2 eine hemmende Wirkung zeigen<sup>48</sup>. Cyclooxygenasen spielen eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Prostaglandinen aus dem Arachidonsäure-Stoffwechsel. Prostaglandine sind im Körper z.B. verantwortlich für den Schutz der Magenschleimhaut, aber auch bei Entzündungen und an der Schmerzweiterleitung sind sie beteiligt. Hemmstoffe von Cyclooxygenasen sind wichtige Wirkstoffe in der Schmerztherapie<sup>49</sup>.



Fomitopinsäure A<sup>48</sup>

Striegler et. al. konnte aus dem Extrakt dieses Pilzes einige Cerebroside isolieren und identifizieren<sup>50</sup>. Rösecke et. al. konnten mittels GC-MS im Wasserdampfdestillat eine Reihe von aliphatischen Alkoholen, Ketonen, Aldehyden und Mono- bzw. Sesquiterpene und aromatische Verbindungen nachweisen<sup>51</sup>.

### 3.1.5 *Inonótus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. (Schiefer Schillerporling)

Andere Namen : Tschaga (Chaga), Tschagapilz oder Kabanoanatake (Japan)<sup>52</sup>.

Systematik: Nach „Dictionary of Fungi“<sup>12</sup> umfaßt die Gattung *Inonotus* P. Karst. 58 Arten und gehört zur Familie der *Hymenochaetaceae*, der 14 Genera mit insgesamt 298 Arten zugeordnet werden. Für den europäischen Bereich geben Ryvarden et al.<sup>33</sup> 18 *Inonotus*arten an; für die nordischen Länder wird in den „Nordic Macromycetes“<sup>34</sup> über das Vorkommen von sieben Arten berichtet. Dabei wird in diesem Werk ein abweichendes systematisches Konzept vertreten, in dem die Gattung *Inonotus* in eine eigene Familie, nämlich den *Inonotaceae* Fiasson & Niemelä, ausgegliedert wird (zusammen mit den Gattungen *Inonotopsis*, *Inocutis* und *Onnia*).

Synonyme: In der alten Literatur werden für *I. obliquus* auch die Namen *Polyporus obliquus* Fr. und *Boletus obliquus* Pers. angegeben<sup>33</sup>.



**Abb. 6: *Inonotus obliquus* (Imperfekte Form = Anamorphe).**



**Abb. 7: *Inonotus obliquus*, Poren der sporenbildende Form (= Teleomorphe).**

Makro- und mikroskopische Beschreibung: Fruchtkörper der imperfekten Form unregelmässig knollig, 100-200 mm hoch und ebenso breit, 50-100 mm vom Stamm abstehend, Oberfläche schwarz, krustig, schollig, aufgerissen, Konsistenz spröde, holzkohlenartig. Im Querschnitt ist der Fruchtkörper fleckig dunkelbraun. Die Konidien sporen sind oval, glatt, olivbraun 1 bis 2 (4) zellig und 7- 10 x 3,5- 5,5  $\mu\text{m}$  groß. Es treten braunrote, dickwandige Seten (50- 100 x 5- 10  $\mu\text{m}$ ) auf.

Die perfekte Form ist resupinat, Überzüge von mehreren Zentimetern bis Dezimetern Ausdehnung bildend, 5- 10 mm dick, Oberseite porig, jung weisslich, dann braun schimmernd, alt dunkelbraun, Poren eckig bis länglich, 3- 5 pro mm, Röhren bis 10 mm lang, schräg abwärts gerichtet. Die Basidiosporen sind elliptisch, hyalin mit Tropfen (8- 10 x 5- 7,5  $\mu\text{m}$ ). Die Seten dieser teleomorphen Form sind kürzer (bis 45  $\mu\text{m}$  lang). Die Konsistenz des perfekten Fruchtkörpers ist frisch weich, korkig, trocken hart und spröde. Der Fruchtkörper entwickelt sich unter der Borke des Wirtsbaumes, die schließlich durch den Druck steriler 1- 2 cm hoher Mycelvorsprünge (sog. Stemmleisten) aufreißt.

Standort und Ökologie: Die imperfekte Form des Pilzes kommt meistens an Stämmen von *Betula* (Birke) vor, seltener auch an *Alnus* (Erle) und anderen Laubbäumen. Selten innerhalb geschlossener Wälder, eher an Moorrändern, Flüssen, Straßen- und Wegrändern. Der Pilz ist ein Weißfäuleerreger. Erst nach Absterben des Baumes bildet sich unter dessen Rinde die perfekte Form mit Poren und Basidien. Der Pilz ist einjährig, überständige Exemplare finden sich bis ins nächste Frühjahr<sup>14, 15</sup>.

*Inonotus obliquus* wird seit dem 16ten bis 17ten Jahrhundert in der russischen und polnischen Volksmedizin eingesetzt<sup>17</sup>. Ferner wird der Pilz in China, Japan und Korea als Medizin und in vorbeugenden bzw. heilenden Nahrungsergänzungsmitteln verwendet. In Korea ist eine Reihe von Patenten auf Rezepturen und Herstellungsvorschriften angemeldet, die anticarcinogene, antiageing, antidiabetische und antioxidative Effekte haben oder den Cholesterolspiegel im Blut senken und Körperfett reduzieren sollen<sup>53, 54, 55, 56</sup>. In der russischen Volksmedizin wird *Inonotus obliquus* bei der Behandlung von Magen- und Darmleiden, wie z.B. Gastritis, Geschwüren und Krebs verwendet. Ferner findet der Pilz Verwendung bei Hungergefühl, zur Erfrischung, Krebsbehandlung und Vorbeugung, Bluthochdruck, Exemen, Dermatitis, Psoriasis und bei der Behandlung von Entzündungen der Atemwege<sup>57</sup>. Kahlos et al.<sup>64, 68</sup> konnte bei aus dem Pilz isolierten Verbindungen und Fraktionen eine tumorhemmende Wirkung auf die Tumorarten bzw. Zelllinien *256 carcinosarcoma*, *MCF-7 adenocarcinoma mammae* (In vitro) und *Leukemia P388* (In vivo) nachweisen. Gavrilo et al. berichten von einer positiven Wirkung der Inhaltsstoffe auf den Aminosäure-Stoffwechsel im Blut und eine daraus resultierende adaptogene Wirkung<sup>58</sup>. Golovko et al. konnte eine herztätigkeitssteigernde Wirkung von Bioglycanen aus *I. obliquus* nachweisen<sup>59</sup>. Cui et al.<sup>60</sup> erwähnt in seiner Arbeit antioxidative Wirkungen von *I. obliquus*, welche nach Lee et al.<sup>61</sup> auf Polyphenole zurückzuführen sind, die von ihm aus dem Pilz isoliert wurden.

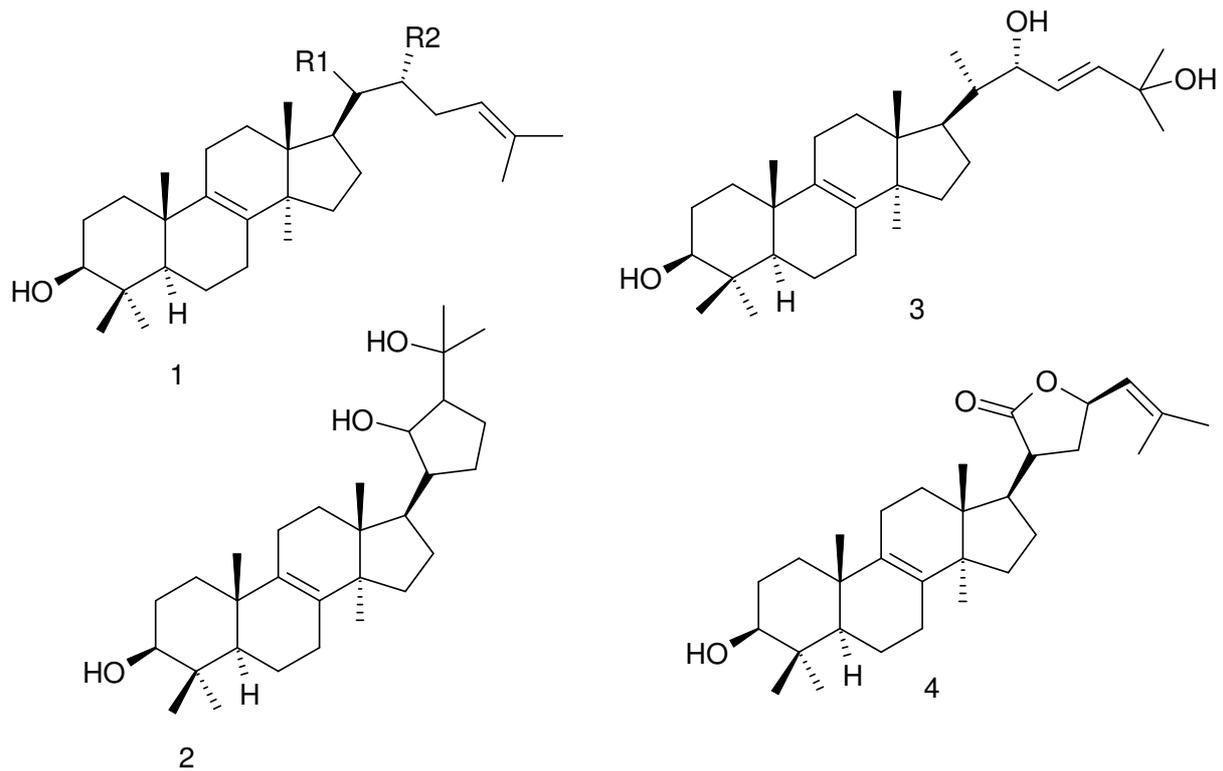
Aus *Inonotus obliquus* konnten in der Vergangenheit eine Reihe von Steroiden und Triterpenen isoliert werden. Hierzu zählen z.B. pilztypische Verbindungen wie Lanosterol, Ergosterol, Trametenolsäure und Ergosterolperoxid (siehe Tab. 3). Bei den Triterpenen wurde z.B. Betulin in *Inonotus obliquus* durch GC-MS nachgewiesen, eine Verbindung die erstmals aus der Rinde der Birke isoliert wurde und offenbar vom Pilz aufgenommen wird<sup>62</sup>. Betulin kann als Ausgangsverbindung zur Synthese von Betulinsäure angesehen werden, bei der man eine Reihe von anticarcinogenen Wirkungen nachweisen konnte. So zeigte Betulinsäure z.B. Wirksamkeiten gegen Zellen des primären Hauttumors (MEL-4), Krebszellen aus den Lymphknoten (MEL-1), der Pleuraflüssigkeit (MEL-2) und der Leber (MEL-3). Desweiteren konnten Wirksamkeiten gegen Zelllinien von Eierstock-, Gebärmutter- und Lungenkrebs nachgewiesen werden. Die Wirkung der Betulinsäure ist selektiv gegen Krebszellen gerichtet, d.h. das Wachstum normaler Zellen wird nicht

gehemmt. Diese Eigenschaft macht diese Verbindung zu einer vielversprechenden neuen Modellschubstanz<sup>63</sup>.

Untersuchungen über die Zusammensetzung der flüchtigen Inhaltsstoffe der anamorphen Form dieses Pilzes wurden bisher nicht durchgeführt. Da *Inonotus obliquus* in der Volksmedizin eine wichtige Rolle spielt und eine Reihe von Bioaktivitäten nachgewiesen werden konnten, stellt der Pilz ein interessantes Objekt für weitere Untersuchungen dar, zumal er inzwischen auch in Deutschland zur Teezubereitung verwendet wird.

Verbindung	Literatur
Lanosterol	52 65 66 68 71
Inotodiol	52 64 65 66 68 69 70 71
3 $\beta$ -Hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al	65 66 68
Trametenolsäure	52 65 66 68 71
Methyltrametenolat	66 68
24-Methylcholesta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol (Ergosterol)	67 71
24-Methylcholesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	67
24-Methylcholest-7-en-3 $\beta$ -ol (Fungisterol)	67
24-Ethylcholest-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -Sitosterol)	67
24-Ethylcholestan-3 $\beta$ -ol (Sitrostanol)	67
Lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diol (Betulin)	67 68
Lup-20(29)-en-3 $\beta$ -ol (Lupeol)	67
Lup-20(29)-en-3 $\beta$ -on (Lupenon)	67
3 $\beta$ ,21-Dihydroxy-lanosta-8,24-dien	64 65 68 69
3 $\beta$ ,22-Dihydroxy-lanosta-8,24-dien-7-on	68 70
3 $\beta$ ,22,25-Trihydroxy-lanosta-8,23-dien	68 69
3 $\beta$ -Hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lacton	52 71
21,24-Cyclopentalanosta-3 $\beta$ ,21,25-triol-8-en	52 71
3 $\beta$ ,22,25-Trihydroxy-lanosta-8-en	71
Ergosterolperoxid	71
Glucositol	71
3 $\beta$ ,22-Dihydroxy-lanosta-7,9(11),24-trien	71
5-(2'-Eten-6',6'-dimethyl-cyclohexa)-3-methyl-propanol	71

**Tab. 3:** In der Literatur beschriebene Inhaltsstoffe von *Inonotus obliquus*



- |   |         |       |                 |
|---|---------|-------|-----------------|
| 1 | R1=Me   | R2=H  | Lanosterol      |
|   | R1=Me   | R2=OH | Inotodiol       |
|   | R1=COOH | R2=H  | Trametenolsäure |

2 21,24-Cyclopentalanosta-3 $\beta$ ,21,25-tiol-8-en

3 3 $\beta$ ,22,25-Trihydroxy-lanosta-8,23-dien

4 3 $\beta$ -Hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lacton

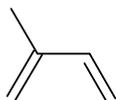
**Abb. 8: Einige Steroide von *Inonotus obliquus*.**

### 3.2 Flüchtige Inhaltsstoffe / Etherische Öle

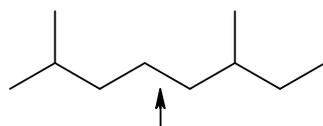
Etherische Öle sind meist komplex zusammengesetzte flüssige Stoffgemische aus flüchtigen (MW < 320 Da), lipophilen Verbindungen, von charakteristischem Geruch. Sie können durch Wasserdampfdestillation aus pflanzlichen Rohstoffen hergestellt werden. Wichtige Komponenten sind überwiegend Kohlenwasserstoffe oder monofunktionelle Verbindungen, wie Aldehyde, Alkohole, Ester, Ether und Ketone<sup>80, 72</sup> von Mono- und Sesquiterpenen. Daneben gibt es aber auch Öle, die durch Phenylpropane oder stickstoff- und schwefelhaltige Verbindungen dominiert werden (Senf- und Lauchöle). In den 80iger Jahren des 19ten Jahrhunderts untersuchte O.

Wallach terpenoide Inhaltsstoffe aus etherischen Ölen und postulierte für diese Verbindungen eine molekulare Zusammensetzung von  $C_{10}H_{16}$  <sup>73</sup>. Ruzicka et al. stellte 1953 die Regel auf, dass alle terpenoiden Verbindungen sich aus einer unterschiedlichen Anzahl an Isopren-Einheiten (2-Methyl-1,3-butadien) zusammensetzen <sup>74</sup>. Die Isopreneinheiten können entweder Kopf-Schwanz, Schwanz-Schwanz, Kopf-Kopf oder Schwanz-Rumpf verknüpft sein.

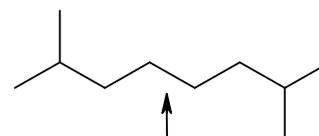
Diese Regeln liefern wichtige Informationen zur Konstitutionsermittlung und zur Unterscheidung der einzelnen Terpengruppen. Anhand der Anzahl der enthaltenen Isopreneinheiten lassen sich Terpene einteilen in Monoterpene ( $C_{10}$ , 2 Isoprene), Sesquiterpene ( $C_{15}$ , 3 Isoprene), Diterpene ( $C_{20}$ , 4 Isoprene), Sesterpene ( $C_{25}$ , 5 Isoprene), Triterpene, von denen sich die Steroide ableiten ( $C_{30}$ , 6 Isoprene) und Tetraterpene ( $C_{40}$ , 8 Isoprene).



Isopren (2-Methylbuta-1,3-dien)



Kopf-Schwanz-Verknüpfung

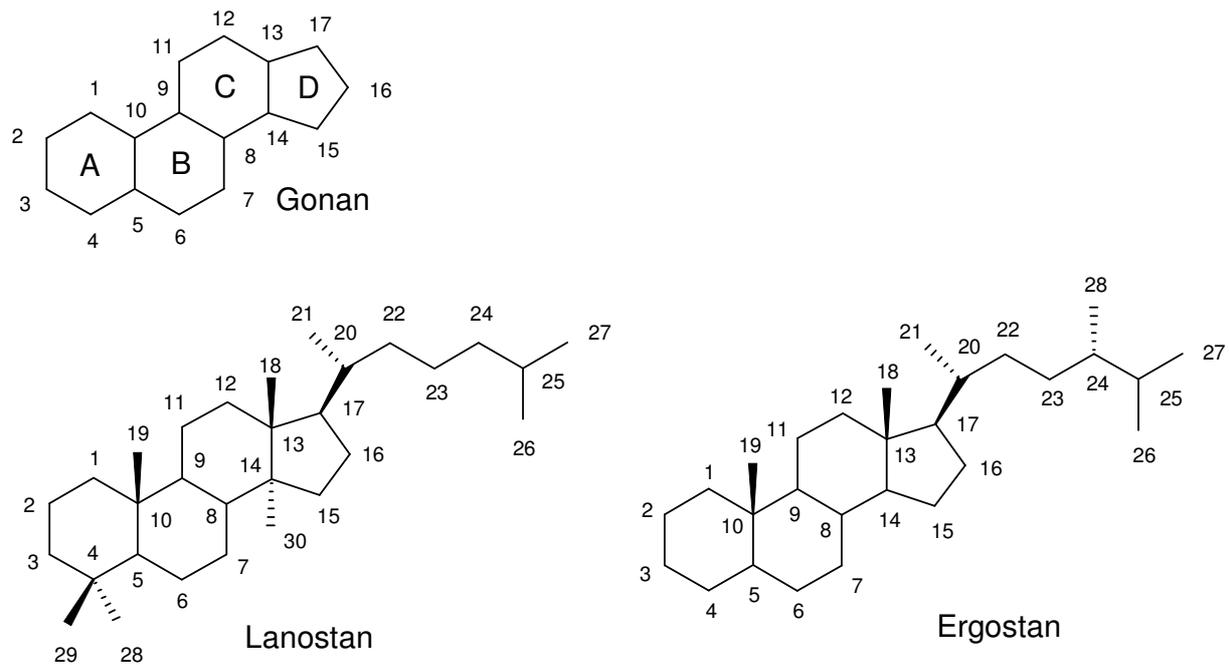


Kopf-Kopf-Verknüpfung

### 3.3 Nicht flüchtige Inhaltsstoffe von Pilzen

#### 3.3.1 Steroide

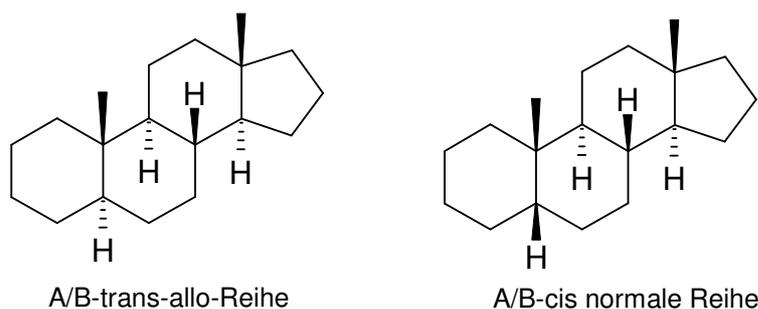
Steroide sind im Tier-, Pflanzen- und Pilzreich weit verbreitet. Nach dem Vorkommen teilt man sie auf in Zoosterine, Phytosterine und Mycosterine. Alle Steroide enthalten ein tetracyclisches Kohlenstoffgerüst, welches sich vom Gonan ableitet. Die einzelnen Steroide unterscheiden sich – neben der Stereochemie – durch die Anzahl an Methyl-Gruppen am Ringsystem und die Länge der Alkylkette am C-17 des Gonan-Gerüsts. Daneben können auch unterschiedliche funktionelle Gruppen (z.B. Hydroxyl-, Carboxyl- und Carbonylgruppen) sowie Doppelbindungen im Molekül enthalten sein.



**Abb. 9: Grundstrukturen von Steroiden.**

Zur Vereinfachung der Benennung dieser komplexen Moleküle hat es sich bewährt, gewissen Grundgerüsten Trivialnamen zu geben. Die wichtigsten Grundgerüste sind in Abb. 9 gezeigt.

Bei der Stereochemie betrachtet man das Molekül in der Papierebene. Liegen die Atomgruppen hinter dieser Ebene, so bezeichnet man diese als  $\alpha$ -ständig. Atomgruppen, die nach vorn ausgerichtet sind werden als  $\beta$ -ständig bezeichnet. Die meisten natürlichen Steroide weisen am C-18 und C-19 jeweils eine anguläre,  $\beta$ -ständige Methyl-Gruppe auf. Die Ringe B und C, sowie C und D sind fast immer *trans*-verknüpft. Diese beiden Eigenschaften haben zur Folge, dass bei der Ringverknüpfung nur zwischen zwei Reihen unterschieden werden kann. Der *A/B-trans allo*-Reihe und der *A/B-cis normale* Reihe (siehe Abb. 10) <sup>75, 76</sup>. Die Stereochemie natürlicher Steroide ist somit auf diese beiden Strukturen festgelegt.



**Abb. 10: Konfigurationen des Steroidgrundkörper am Beispiel des Androstans.**

### 3.3.2 Aromaten

Neben Terpenen bilden nicht-terpenoide Aromaten eine wichtige Stoffgruppe an Sekundärmetaboliten in Pilzen. Diese können sehr unterschiedlich aufgebaut sein (und sehr unterschiedliche Funktionen haben) und reichen von einfachen carbocyclischen Aromaten bis hin zu stickstoffhaltigen und glycosidierten Naturstoffen. So konnte aus *Gleophyllum odoratum* eine Reihe einfach aufgebauter Aromaten, wie z.B. p-Anisaldehyd isoliert werden <sup>77</sup>. Diese Verbindungen machen Pilze als Quelle für Duft- und Aromastoffe interessant.

Weitere aromatische Verbindungen, die in Pilzen nachgewiesen werden konnten sind z.B. Alkaloide, chlorierte Aromaten und Anthrachinone bzw. Xanthone <sup>78 79</sup>. Viele Verbindungen zeigen oft ausgeprägte Bioaktivitäten. So beruht die Giftigkeit verschiedener Knollenblätterpilze (*Amanita spp.*) auf dem Vorkommen von Alkaloiden wie Muscimol <sup>80, 81</sup>. Aus *Phellinus fastuosus* wurde Drosophilin-A-methylether (DAME, Tetrachlor-1,4-dimethoxybenzol) isoliert, welcher sich durch antibiotische Eigenschaften auszeichnet <sup>82</sup>. Aus dem insektenpathogenen Pilz *Cordyceps militaris* konnte eine Reihe von Diphenylethern und Diphenylether-Glycosiden isoliert werden, die eine große Bandbreite an unterschiedlichen biologischen Aktivitäten aufwiesen. So konnten bei diesen Verbindungen antimalarische, sowie Wirkungen gegen Tuberkulose, Herpes Typ 1, Brustkrebs und Lungenkrebs nachgewiesen werden <sup>83</sup>.

Weißfäule erzeugenden Basidiomyceten, wie z.B. *Phanerochaete chrysosporium* beziehen aromatische Verbindungen aus Lignin, das sie metabolisieren <sup>84</sup>. Die so erhaltenen Aromaten können wiederum wichtige Funktionen beim Abbau von Lignin haben. So konnte Paszczyński et al. bei *Phanerochaete chrysosporium* nachweisen, dass Veratrylalkohol eine stimulierende Wirkung auf die Lignin abbauende Enzyme (Ligninperoxidase LiP) hat <sup>85</sup>.

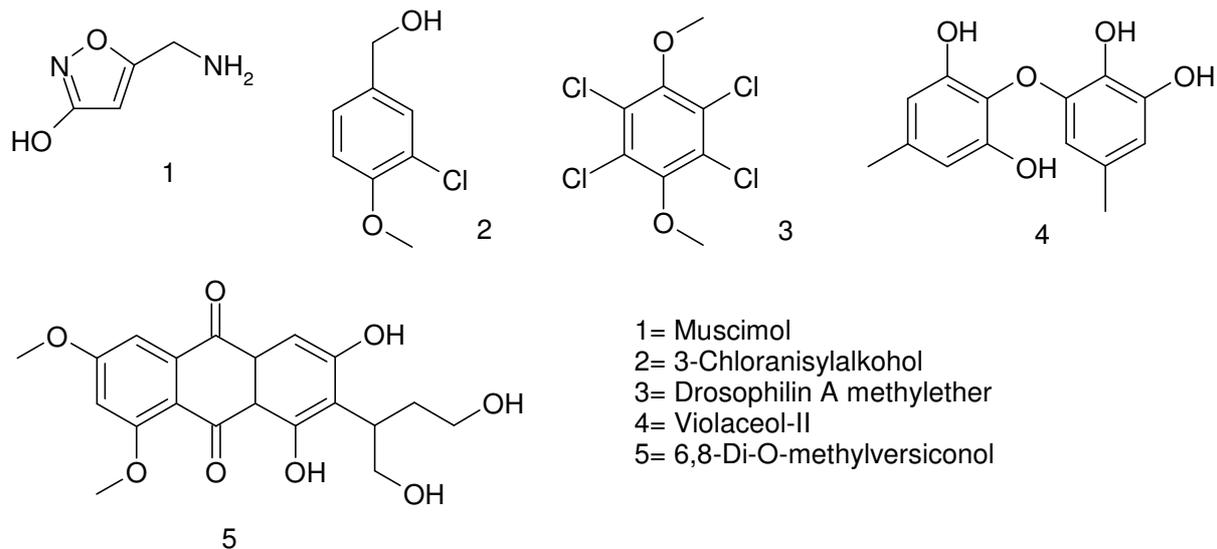


Abb. 11: Einige aus Pilzen isolierte Aromaten

### 3.4 Naturstoff-Isolierung und Analytik

#### 3.4.1 Allgemeines Vorgehen bei der Naturstoffisolierung aus Pilzen

Bei der Isolierung von Pilzhinhaltsstoffen hat sich eine Vorgehensweise bewährt, die man in drei Arbeitsschritte aufteilt<sup>86</sup>.

1. Isolierung einer Verbindung (nach Detektion mittels unterschiedlicher analytischer Methoden, wie z.B. DC, GC, GC-MS)
2. Reinigung der Substanz.
3. Wenn notwendig erfolgt eine erneute Reinigung (Feinschliff / Polishing).

Das Vorgehen und die Auswahl der verwendeten Methoden bei diesen Arbeitsschritten hängt von den Eigenschaften der eingesetzten Ausgangsmatrix (Extrakt oder ätherisches Öl) und von den enthaltenen Inhaltsstoffen ab. So können sich Substanzen aufgrund starker chemischer Ähnlichkeiten oder Instabilitäten nicht trennen lassen. Hier bringt oft auch ein neues Trennverfahren keinen Erfolg. Diese Beobachtung konnte z.B. bei der Auftrennung von flüchtigen Substanzen aus *Phellinus robustus* bzw. bei der Isolierung eines Triterpenes aus *Fomitopsis pinicola* gemacht werden. So kam es z.B. beim Einsatz der Säulenchromatographie zu kieselgelbedingtem<sup>123</sup> bzw. bei der präparativen GC zu thermischen Zersetzungen.

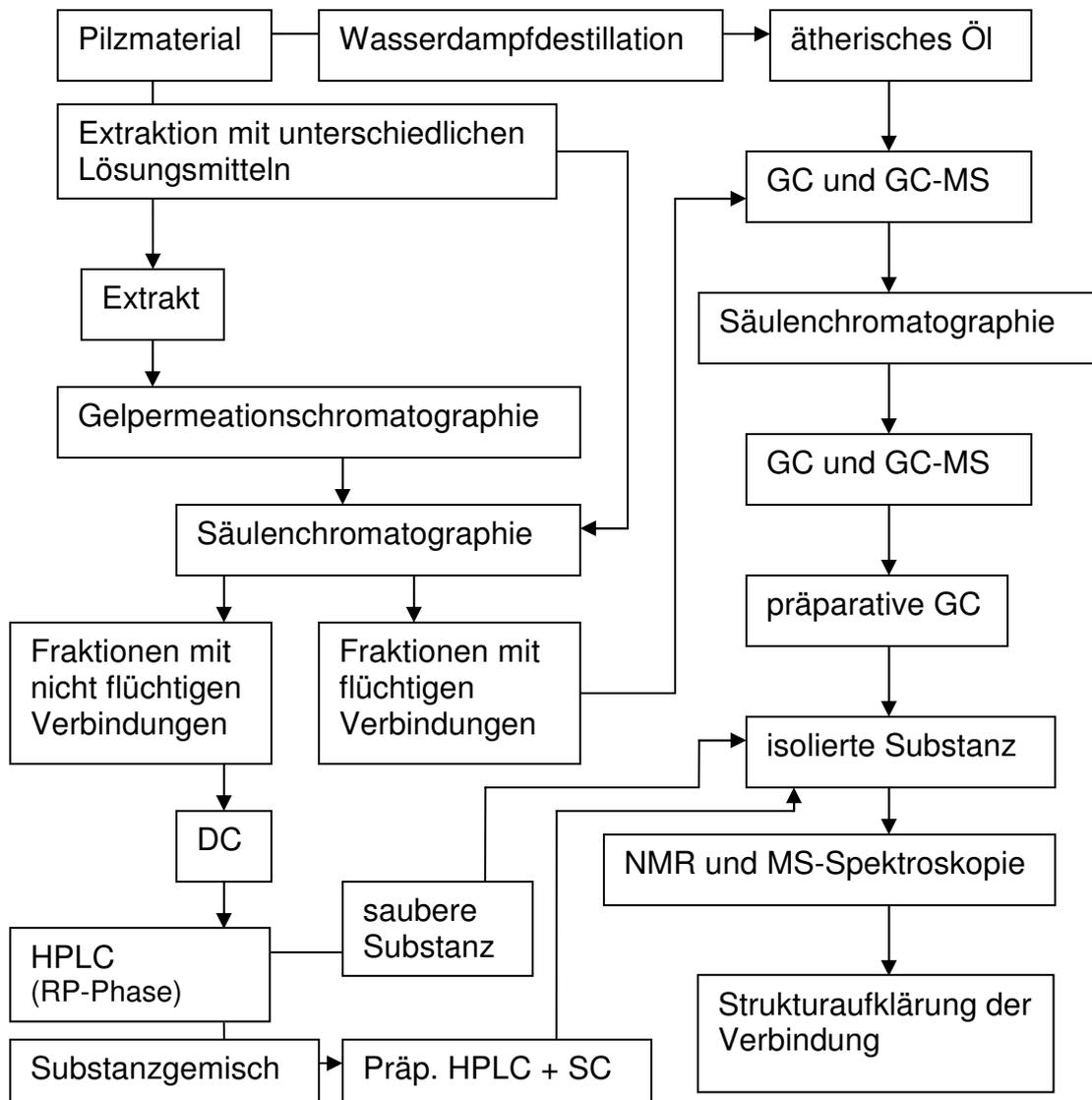


Abb. 12: Schema der Vorgehensweise bei der Isolierung von Pilzinhaltsstoffen.

### 3.4.2 Extraktionsmethoden

Um Verbindungen aus Pflanzen und anderen Organismen zu isolieren oder um Substanzmischungen zu erhalten, die man z.B. für arzneiliche Zubereitungen einsetzt, muss man das Material zunächst extrahieren. Unter dem Begriff Extraktion versteht man das Herauslösen eines oder mehrerer Komponenten aus einem flüssigen oder festen Gemisch mit Hilfe eines nichtmischbaren Lösemittels, das für die abzutrennenden Komponenten selektiv ist. Das angewandte Extraktionsverfahren wird dabei nach den zu isolierenden Stoffgruppen und deren Eigenschaften ausgewählt. So kommen bei schwerflüchtigen Substanzen die unterschiedlichen Methoden der Lösungsmittelextraktion und bei flüchtigen Verbindungen auch die

Wasserdampfdestillation bzw. die Extraktion mit überkritischen Gasen zum Einsatz. Bei diesem Verfahren wird mit überkritischem Kohlendioxid oder Distickstoffmonoxid (verflüssigtes Gas mit einem Druck von 250 bar und einer Temperatur von ca. 60 °C) extrahiert. Entspannt man das Gas-Substanzgemisch, fallen die extrahierten Verbindungen aus. Dieses Verfahren erlaubt eine schonende und selektive Extraktion<sup>87</sup>. Organische Verbindungen lassen sich aus wässrigen Medien zudem durch verschiedene Verfahren der SPME (Solid Phase Micro Extraction), wie z.B. der Gerstel-Twister bzw. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)<sup>88</sup> gewinnen.

Eingeteilt werden die Extraktionsmethoden anhand ihrer Phaseneigenschaften hauptsächlich in Flüssig-Flüssig- und Fest-Flüssig-Extraktion.

Genutzt wird die Eigenschaft von gelösten Stoffen, in einem Zweiphasensystem, zu einem Konzentrationsgleichgewicht zu gelangen, d.h. der gelöste Stoff löst sich so lange in der Phase mit der geringeren Konzentration, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat.

$$k' \cdot w_{ca} = k'' \cdot w_{cb}$$

$w_{ca}$  : Massenanteil des gelösten Stoffes in der Phase a.

$w_{cb}$  : Massenanteil des gelösten Stoffes in der Phase b.

$k'$  und  $k''$  sind Proportionalitätsfaktoren.

$$w_{ca} / w_{cb} = k'' / k' = k \text{ Verteilungskoeffizient}$$

Der Verteilungskoeffizient ist nur konstant, wenn mit verdünnten Lösungsmitteln gearbeitet wird.

Die Geschwindigkeit, mit der ein Gleichgewicht erreicht wird, ist für jedes System eine andere<sup>89</sup>. Das bedeutet, dass man mit unterschiedlichen Methoden die Einstellung des Gleichgewichts beeinflussen kann.

Um eine Verbesserung der Ausbeute an Inhaltsstoffen zu erhalten, wird das Extraktionsgut vor der Extraktion zerkleinert, wodurch eine Vergrößerung der Oberfläche und ein Aufschließen der inhaltsstoffhaltigen Zellteile erzielt wird<sup>90</sup>. Dies kann z.B. insbesondere bei sehr hartem Probenmaterial wie z.B. einigen Baupilzfruchtkörpern, durch Einfrieren des Materials mit flüssigem Stickstoff und anschließendes Zermörsern erreicht werden.

### 3.4.2.1 Lösungsmittlextraktion

Bei der Lösungsmittlextraktion wird das Probenmaterial mit Lösungsmitteln steigender Polarität extrahiert, um erstens eine Vortrennung zwischen unpolaren und polaren Verbindungen zu erhalten und zweitens, um eine möglichst vollständige Extraktion zu erzielen. Der eigentliche Extraktionsvorgang besteht darin, das Pflanzenmaterial in dem Extraktionsmittel einige Zeit, meist einige Tage, stehen zu lassen. Dabei kann man die Extraktion durch gelegentliches Schütteln beschleunigen.

Die Extraktion kann auch durch Einwirkung von Ultraschall, permanentes Rühren oder Schütteln und mehrmaligen Extraktionsmittelwechsel verbessert und beschleunigt werden <sup>90</sup>.

### 3.4.2.2 Wasserdampfdestillation (Hydrodestillation)

Ätherische Öle (flüchtige Substanzen) werden hauptsächlich mittels Wasserdampfdestillation (Hydrodestillation) gewonnen. Hierbei wird das Pflanzenmaterial mit Wasser in einem Rundkolben zum Sieden erhitzt und mehrere Stunden (3,5 – 5 h) in einer Rücklaufdestillationsapparatur destilliert (z.B. <sup>92, 152</sup>). Die flüchtigen Verbindungen werden mit dem heißen Dampf abtransportiert und scheiden sich beim Kondensieren im Kühler wieder vom Wasser ab. Um eine sichere Abtrennung zu erhalten, wird das Kondensat durch eine Lösungsmittelvorlage, wie z.B. n-Pentan, n-Hexan oder Xylol geleitet, in der die Verbindungen zurückgehalten werden. Das Wasser wird anschließend wieder in den Destillationskolben geleitet (Kreislauf).

Die Inhaltsstoffe der Wasserdampfdestillate müssen nicht identisch mit den genuinen Pflanzeninhaltsstoffen sein, da es auf Grund thermischer und pH-abhängiger Reaktionen zur Artefaktbildung und auf Grund der Abhängigkeit von Flüchtigkeit, Wasserlöslichkeit und Siedetemperatur der Verbindungen zur Diskriminierung von Einzelsubstanzen kommen kann <sup>91</sup>.

Anwendung findet dieses Verfahren, neben der Gewinnung von ätherischen Ölen, auch bei der Gehaltsbestimmung dieser Stoffgruppe in Drogen <sup>92</sup>.

### 3.4.3 Chromatographische Trennmethode

Die erste chromatographische Trennung wurde 1903 von dem russischen Botaniker *Michail Tswett* durchgeführt. Er trennte an einer gepackten Säule aus fein verteilten Calciumcarbonat einen Blattextrakt auf und bemerkte dabei das Entstehen mehrerer

farbiger Zonen, z.B. von Chlorophyll oder anderen farbigen Blatinhaltsstoffen in der Säule. Dieser Beobachtung verdankt die Chromatographie ihren Namen (griech. *Chroma*: Farbe, *graphein*: schreiben) <sup>93</sup>. Bisher wurden eine Menge chromatographischer Trennmethode entwickelt, die aber fast alle auf das Prinzip der ersten Chromatographie von *Tswett* zurückzuführen sind. In jedem Fall wird eine mobile Phase mit dem zu trennenden Substanzgemisch, an einer stationären Phase vorbeigeleitet. Eine unterschiedliche Verweilzeit und somit eine Trennung zweier Substanzen wird entweder primär durch eine unterschiedliche Verteilung der einzelnen Substanzen zwischen stationärer und mobiler Phase erreicht oder primär durch Adsorptionsvorgänge an der stationären Phase.

Man unterscheidet die einzelnen Arten der Chromatographie nach dem Aggregatzustand der beiden Phasen. So werden die Verfahren eingeteilt in Fest-Flüssig- (DC, LC, HPLC, GPC), in Fest-Gasförmig- (GSC), und in Flüssig-Gas-Chromatographie (GLC).

Zur Isolation von Naturstoffen spielen chromatographische Trennmethode heute eine wichtige Rolle. So kommen hier Methoden, wie die Dünnschicht-, Flüssig-, Größenausschluß-, Gaschromatographie (kapillar und präparativ), sowie die hochauflösende Flüssigchromatographie (HPLC, analytisch und präparativ) zur Anwendung. Die einzelnen Charakteristika und Einsatzbereiche sind in Tab. 4 gezeigt.

Methode	Beschreibung	Einsatzbereich
Dünnschichtchromatographie DC	Die stationäre Phase (Kieselgel o.a. Materialien) befindet sich in Form einer dünnen Schicht auf einer Glas- oder Aluminium-Platte. Die am Anfang aufgetragenen Substanzen werden durch das aufsteigende Laufmittel (Kapillarkräfte) und durch die Wechselwirkungen zur stationären Phase aufgetrennt.	Einfache Methode, um einen Überblick über das untersuchte Substanzgemisch zu erhalten. Sie kann bei Verwendung präparativer DC-Platten auch zur Isolierung geringer Substanzmengen verwendet werden.
Flüssigchromatographie SC	Die stationäre Phase befindet sich in einer unten verschließbare Glas-Säule. Die oben aufgetragene Substanzmischung wird mit einem geeigneten Laufmittel eluiert. Enthält die Mischung Verbindungen unterschiedlicher Polarität, so kann durch stetige Änderung der LM-Zusammensetzung, eine Auftrennung der einzelnen polaren Gruppen oder Verbindungen erzielt werden. Im Idealfall können am Ende der Säule einzelne Verbindungen gesammelt werden.	Zur Vortrennung von Substanzmischungen; ggf. auch zur Isolierung von einzelnen Verbindungen.
Gaschromatographie GC	Als stationäre Phase dient hier meist ein Flüssigkeitsfilm in einer Kapillare. Als mobile Phase finden Inertgase wie z.B. Helium und Stickstoff aber auch Wasserstoff Verwendung. Diese strömen über die stationäre Phase und transportieren die zu trennenden Substanzen. Die Trennung ist abhängig von den Wechselwirkungen der Verbindungen mit der stationären Phase und dem Siedepunkten der Verbindungen.	Zur Auftrennung und Analyse von Substanzmischungen flüchtiger Inhaltsstoffen. Quantitative (Peakflächenprozent) und qualitative Informationen (Retentionsindex, Massenspektrum bei GC-MS-Kopplung).
Präparative Gaschromatographie GC	Trennmethode wie bei der Gaschromatographie beschrieben. Durch Verwendung spezieller Säulen (gepackt und kapillar mit größerer Filmdicke) und ein Split-System am Säulen-Ende (Aufteilung zum Detektor und zur gekühlten Falle) können gc getrennte Verbindungen isoliert werden.	Zur Isolierung einzelner, flüchtiger Verbindungen oder zur sicheren Entfernung von Lösungsmitteln mit höheren Siedepunkt bei dieser Verbindungsgruppe.
Hochauflösende Flüssigchromatographie HPLC	Hauptsächliche Verwendung von Umkehrphasen (RP18). Durch eine Verkleinerung der Materialien auf 3 bis 10 µm wird die Oberfläche stark vergrößert und die Trennleistung verbessert. Präparative Säulen haben größere Durchmesser und höhere Durchflußraten.	Analytisch: Zur Reinheitsüberprüfung von SC- und DC-Fractionen. Präparativ: Zur Fraktionierung von Substanzgemischen und Isolierung einzelner Komponenten.

Tab. 4: Beschreibung und Einsatzbereiche chromatographischer Verfahren.

### 3.4.4 Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung

Zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen kommt eine Reihe spektroskopischer Methoden zum Einsatz, die jede für sich, eine bestimmte Fragestellung klären kann und somit zur Aufklärung der Struktur beiträgt. So können z.B. Nachweise bestimmter funktioneller Gruppen und eine Identitätsüberprüfung über die IR-Spektroskopie erfolgen. Weitere Informationen, wie z.B. über die totale Zusammensetzung lassen sich anhand der Massenspektrometrie (Hochauflösung) gewinnen. Anzahl von Protonen und Kohlenstoffen in einer Verbindung können in vielen Fällen sicher durch NMR-Spektroskopie abgeklärt werden.

Bei der Strukturaufklärung der von uns isolierten Verbindungen wurden massenspektrometrische Methoden, wie EI-MS, FAB-MS und hochauflösende (HR-)-MS eingesetzt. Die EI-MS, gekoppelt mit der Gaschromatographie (GC/MS) kam bei flüchtigen Verbindungen zum Einsatz. Feststoffen wurden über den Direkteinlaß massenspektrometrisch vermessen. Die detaillierte Strukturaufklärung der isolierten Pilzinhaltsstoffe erfolgte durch eindimensionale NMR-spektroskopische Methoden wie  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$ , sowie zweidimensionale Methoden, wie HH-COSY (Proton Proton Correlation Spectroscopy), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) und NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)<sup>94, 95</sup>.

## 4 Spezieller Teil

### 4.1 Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Phellinus robustus*

Die in dieser Arbeit untersuchten Fruchtkörper von *Phellinus robustus* wurden in der Umgebung von Wilhelminenhof (Güstrow) und im Forst von Hanshagen (Greifswald) gesammelt. Auch wurden Proben aus der weiteren Umgebung von Greifswald verarbeitet.

#### 4.1.1 Aufarbeitung von *Phellinus robustus*

Der aufgetaute, sehr harte Fruchtkörper von *Phellinus robustus* wurde vorzerkleinert und anschließend in flüssigem Stickstoff zu Pulver zerstoßen. Das so zerkleinerte Probenmaterial wurde mit Dichlormethan oder n-Hexan im Ultraschallbad unter mehrmaligem Abfiltrieren und Erneuerung des Lösungsmittels extrahiert.

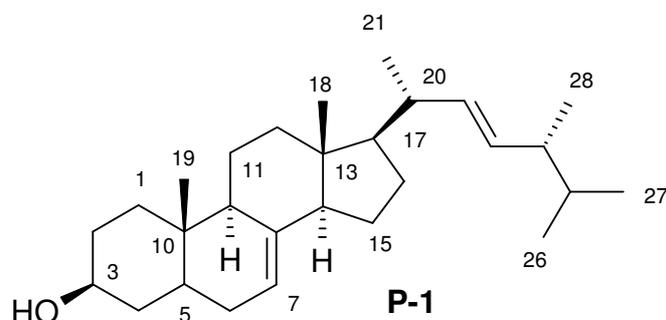
Zunächst wurde nur der n-Hexan-Extrakt aufgetrennt und analysiert. Erst nach Beendigung der Arbeiten mit dem n-Hexan-Extrakt wurde eine neue Pilzcharge mit Dichlormethan extrahiert und der Extrakt aufgetrennt. Die Beschreibung der in dieser Arbeit beschriebenen Substanzen erfolgt in der Reihenfolge ihrer Isolierung aus den entsprechenden Extrakten. In der folgenden Auflistung sind die Ergebnisse zusammengefasst:

1. Hexan-Extrakt: Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**P-1**)
2. Dichlormethan-Extrakt: 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (**P-2**)
3. Dichlormethan-Extrakt: Ergosterolperoxid (**P-3**)
4. Dichlormethan-Extrakt: 2-Hydroxy-5-(3-methylbutanoyl)-benzaldehyd (**P-4**)
5. Dichlormethan-Extrakt: 2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd (**P-5**)
6. Dichlormethan-Extrakt: 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (**P-6**)
7. Dichlormethan-Extrakt: (1R\*,4aS\*,7aS\*7bR\*)-3,3,7b-Trimethyl-5-methylen-decahydrocyclopropa[e]azulen (*cis*-1,8-*epi*-9(15)-Africanen) (**P-7**)
8. Dichlormethan-Extrakt: 3,3,6,11-Tetramethylbicyclo[6.3.0]undeca-1,5-dien (*cis*-*epi*-Precapnelladien) (**P-8**)
9. Dichlormethan-Extrakt: 4,5,5-Trimethyl-8-methylenbicyclo[5.4.0]undec-3-en (**P-9**)

### 4.1.2 Auftrennung des Hexan-Extraktes

Der n-Hexan-Extrakt von *Phellinus robustus* wurde säulenchromatographisch an Kieselgel, mit Petrolether und Ethylacetat in wechselnden Anteilen, vorgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden weiter an Kieselgel säulenchromatographisch mit Dichlormethan und Methanol aufgetrennt. Im Verlauf der Anfertigung wurden Proben der erhaltenen Fraktionen derivatisiert (Silylierung) und durch GC-MS untersucht, um die Zusammensetzung zu prüfen. Enthielten Fraktionen interessante Verbindungen, wurden diese mittels HPLC isoliert (Einzelheiten vgl. 7.2.1).

#### Strukturaufklärung der Komponente P-1 aus dem Hexanextrakt (Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol)



Bei der Auftrennung der säulenchromatographischen Fraktion 6 mittels HPLC konnte die Substanz **P-1** isoliert werden. Das EI-MS läßt einen Molekülpeak von  $[M^+] = 398$  vermuten (mit  $m/z = 383 = [M^+] - 15$ ). Das Fehlen eines nennenswerten Isotopenions  $M+2$  schließt die Existenz von Si, S, Cl und Br aus. Die Intensität des Molekülpeaks (Basispeak) deutet auf das Vorliegen eines polyzyklischen Systems hin; auffälligstes Fragment ist das Ion  $m/z = 271$  ( $[M^+] - 127$ ), das zunächst nicht zu interpretieren war. Da die Verbindung sich vor der MS-Hochauflösungsmessung zersetzt hatte, konnte auf diesem Wege keine Determinierung der Summenformel durchgeführt werden. Diese gelang jedoch unter Hinzuziehung der NMR-Daten (vgl. Tab. 5), d.h. die isolierte Komponente **P-1** hatte die Summenformel  $C_{28}H_{46}O$ . Aus diesen Daten leitet sich für diese Verbindung eine Anzahl von sechs Doppelbindungsäquivalenten ab. Da aus den NMR-spektroskopischen Daten eine Anzahl von zwei Doppelbindungen ersichtlich ist, muß dieses Molekül vier Ringe enthalten.

Nr.	<sup>13</sup> C-NMR (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) in ppm bei 125.77 MHz	C-Atom	Strukturelement	<sup>1</sup> H-NMR-Daten (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) in ppm bei 500.77 MHz	H,H-Kopplung in Hz
1	12.57 q	18	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.61 s	-
2	13.44 q	19	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.75 s	-
3	17.63 q	28	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.01 d	<sup>3</sup> J <sub>H-28, H-24</sub> = 6.85
4	20.38 q	26	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.9 – 0.94 d	<sup>3</sup> J <sub>H-26, H-25</sub> = 6.75
5	20.38 q	27	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.9 – 0.94 d	<sup>3</sup> J <sub>H-27, H-25</sub> = 6.75
6	21.4 q	21	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.11 d	<sup>3</sup> J <sub>H-21, H-20</sub> = 6.63
7	22.11 t	11	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.49 m	-
8	22.98 t	15	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.59 m	-
9	29.06 t	16	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.81 + 1.37 m	-
10	29.71 t	2	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.71 + 1.34 m	-
11	32.53 t	6	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.66 + 1.3 m	-
12	33.61 d	25	-CH<	1H, 1.5 m	-
13	34.28 s	10	>C<	-	-
14	37.08 t	1	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.66 + 0.89 m	-
15	38.38 t	4	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.53 + 1.15 m	-
16	39.68 t	12	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.18 + 1.98 m	-
17	40.2 d	5	-CH<	1H, 1.51 m	-
18	41.2 d	20	-CH<	1H, 2.06 m	-
19	43.37 d	24	-CH<	1H, 1.91 m	-
20	43.56 s	13	>C<	-	-
21	49.88 d	9	-CH<	1H, 1.56 m	-
22	55.73 d	14	-CH<	1H, 1.83 m	-
23	56.39 d	17	-CH<	1H, 1.25 m	-
24	70.7 d	3	-CH< (OH)	1H, 3.34 m	-
25	117.99 d	7	-CH=	1H, 5.23 m	-
26	132.09 d	23	-CH=	1H, 5.27 d	<sup>3</sup> J <sub>H-23, H-22</sub> = 14.76
27	135.99 d	22	-CH=	1H, 5.25 „m“	-
28	139.7 s	8	>C=	-	-

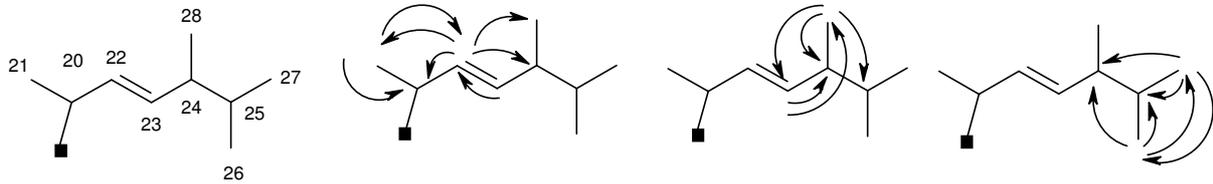
**Tab. 5: Zuordnung der NMR-Signale von Ergosta-7,22-dien-3β-ol (P-1).**

Zur detaillierten Strukturaufklärung wurden <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, HMQC-, HMBC- und HH-COSY-NMR-Spektren ausgewertet:

Von den sechs Methylgruppen stehen zwei (C-26 und C-27) am gleichen C-Atom (C-25), d.h. es liegt eine Isopropylgruppe vor (Aufspaltung der Protonensignale in Dubletts mit <sup>3</sup>J<sub>H27,25</sub>=2.2 Hz). Da die Protonen dieser Methylgruppen sich im H-NMR-Spektrum überlagern, sind auch die C-H-Kopplungen der Gruppen CH (C-25) und CH<sub>3</sub> / CH<sub>3</sub> (C-26 /-27) nicht separat auswertbar.

Das <sup>13</sup>C-Signal des C-25 ist zwar im HMQC- und HMBC auf der <sup>13</sup>C-Achse nicht direkt sichtbar, kann aber durch die vorhandenen Crosspeaks lokalisiert werden.

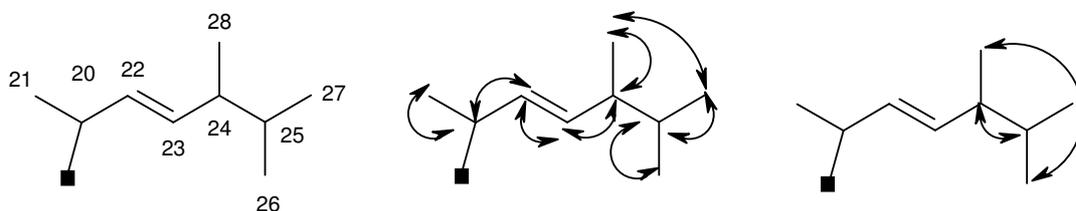
Die Kopplungsverhältnisse für das Strukturinkrement C28 – C20 für die HMBC-Spektren wird durch die folgende Skizzen verdeutlicht; die Zuordnungen von den HMQC-Spektren sind aus Tab. 5 entnehmbar.



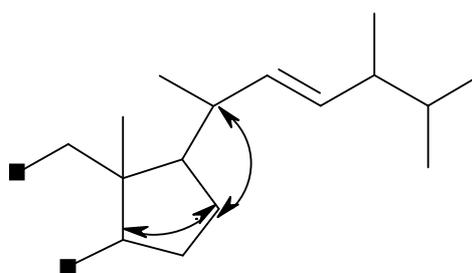
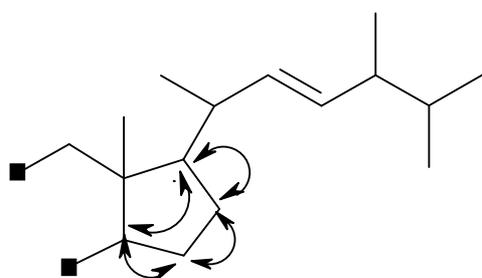
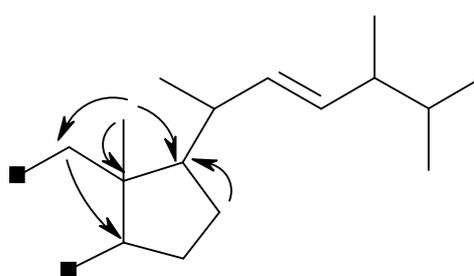
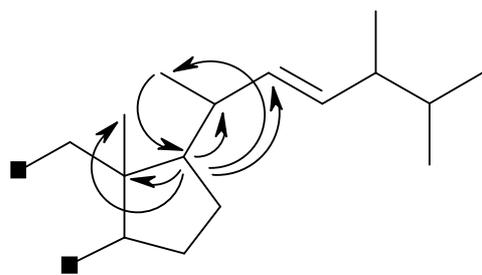
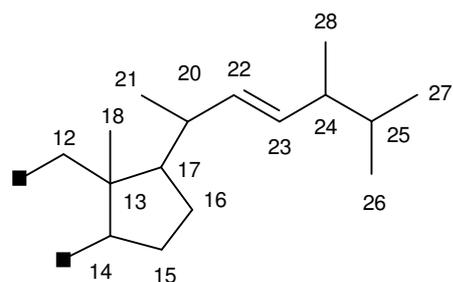
Diese Partialstruktur wird durch folgende Daten des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums gestützt:

- Die Protonen der beiden Methylgruppen (C-26/27) spalten als Teil einer Isopropylgruppe jeweils zu einem Dublett auf ( $\delta$  0.90-0.94 ppm,  $^3J_{\text{H-25, H-26/27}} = 6.75$  Hz).
- Erwartungsgemäß ist auch die Methylgruppe (C-28) am tertiären C-24 zum Dublett aufgespalten ( $\delta$  1.01,  $^3J_{\text{H-24, H-28}} = 6.85$  Hz).
- Im Bereich der olefinischen Protonen findet man zwischen 5.21 und 5.32 ppm ein Multiplett, welches von drei Protonen stammt. Zwei dieser Protonen sitzen an den Kohlenstoffatomen C-22 und C-23. Ihre Kopplungskonstante beträgt  $^3J_{\text{H-22, H-23}} = 14.76$  Hz, d.h. es muß eine *trans*-Konfiguration an dieser Doppelbindung vorliegen.
- Auch die am C-20 inserierte Methylgruppe (C-21) läßt eine Dublettstruktur erkennen ( $\delta$  1.11 ppm,  $^3J_{\text{H-20, H-21}} = 6.63$  Hz).

Die Zusammenhänge der einzelnen H-Kopplungen sind aus dem folgenden HH-COSY-Schema erkennbar:



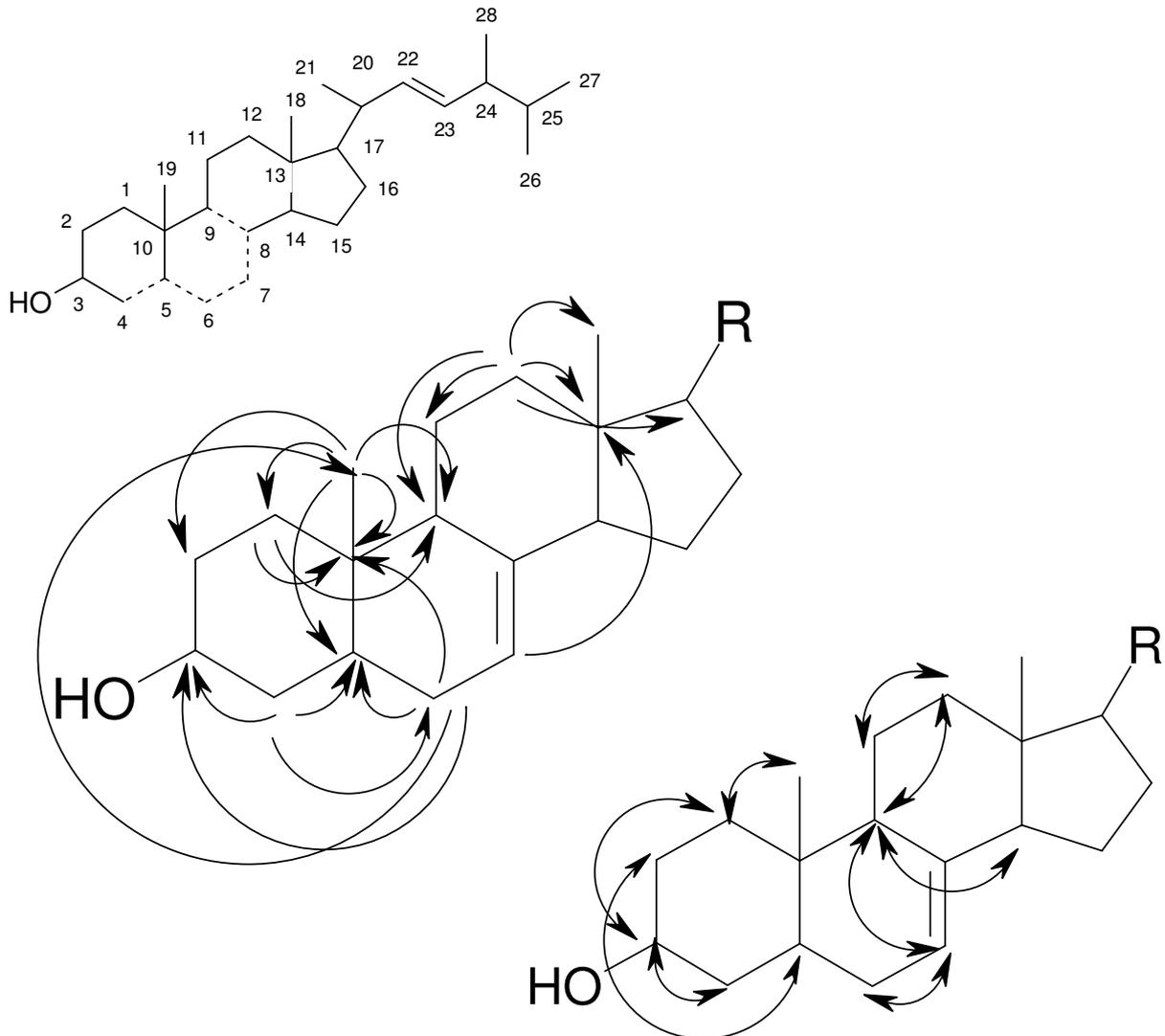
Nach Auswertung der HMQC-, HMBC- und HH-COSY-Spektren läßt sich die weitere Zuordnung dieser Partialstruktur wie folgt fortschreiben:



Die Situation des Ringschlusses in dieser Partialstruktur war schwierig zu etablieren, da im HMBC-Spektrum für den Bereich der Kohlenstoffe C-14, C-15 und C-16 keine verwertbaren  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Korrelationssignale vorlagen. Der Ring konnte durch HH-COSY-Kopplungen zwischen den Protonen H-16/H-17 (vicinal), H-14/H-15 (vicinal) und H-15/H-16 (vicinal) sowie durch die Long-range Kopplung ( $^4\text{J}$ ) zwischen H-14/H-16 gesichert werden. Im HMBC ist eine starke Kopplung der Methylprotonen H-18 zu dem Kohlenstoffbereich C-17 / C-14 (Überlagerung) sichtbar. Vermutlich liegt eine Kopplung zu beiden Kohlenstoffen vor. Unterstützt wird die Ringstruktur durch eine HH-COSY-Kopplung zwischen den Protonen H-14 und H-17 ( $^4\text{J}$ -Kopplung). Vermutlich ist eher von einer  $^4\text{J}$ - als von einer  $^5\text{J}$ -Kopplung auszugehen, welche theoretisch auch denkbar wäre.

Von den ermittelten sechs Doppelbindungsäquivalenten sind in dieser Partialstruktur zwei in Form einer Doppelbindung und eines Rings, enthalten. Somit bleiben für den Rest des Moleküls vier Doppelbindungsäquivalente, die sich auf eine Doppelbindung

und drei Ringe aufteilen. Für diese drei Ringe steht als Differenz eine Summenformel von  $C_{12}H_{19}O$  zur Verfügung. Die Partialstruktur weist zwei ungeklärte Bereiche am C-12 und C-14 auf. Durch fehlende HMBC- und HH-COSY-Kopplungen im Bereich C-14, kann von dieser Molekülseite her keine weitere Aufklärung erfolgen. Die ab der Position C-12 beobachteten HMBC- und HH-COSY-Kopplungen sind in der folgenden Skizze dargestellt:

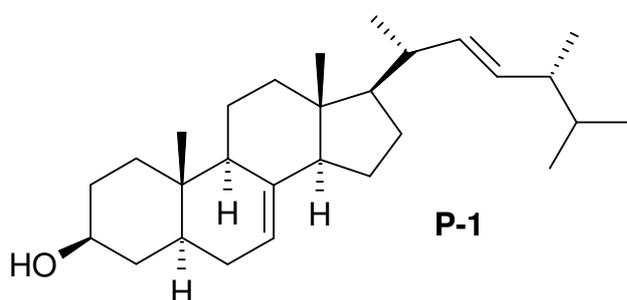


Hierzu ist folgendes anzumerken:

- Das Kohlenstoffatom C-2 wird im HMBC-Spektrum nur von den Protonen der Methylgruppe C-19 gesehen.

- Die Protonkopplungen von H-2 sind schwierig zuzuordnen, da für diese Protonen im  $^1\text{H-NMR}$  starke Überlagerungen bestehen; jedoch läßt sich im HH-COSY-Spektrum eine Longrange-Kopplung ( $^5J_{\text{H-2,H-5}}$ ) feststellen.
- Der stark tieffeldverschobene Kohlenstoff C-3 wird im HMBC nur von den Methylenprotonen H-4 und H-6 gesehen.
- Im HMBC-Spektrum zeigen die Methylenprotonen H-4 Kopplungen zu den Kohlenstoffatomen C-3, C-5 und schwach auch C-6.
- Die HMBC-Daten von den Protonen H-6 (Kopplungen mit C-3, C-5, C-10, C-19) machen die Etablierung des hexacyclischen Ringes A als Strukturelement sicher.
- Die vermutete Struktur des Ringes B mit der olefinischen Bindung konnte durch das HH-COSY-Spektrum bestätigt werden (vicinale Kopplung von H-7 zu H-6 und allylische Kopplung H-7 zu H-9).

Somit kann das Vorliegen folgender steroider Grundstruktur mit entsprechender Seitenkette bestätigt werden:



Die Struktur-Recherche in der CAS-Datenbank ergab, dass es sich hierbei um den bekannten Pilz-Inhaltsstoff Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**P-1**) handelt. Die Stereochemie dieser Komponente konnte mittels NOESY-Daten nicht geklärt werden, da die Verbindung sich als instabil erwies und deshalb keine NOE-Daten erhalten wurden. Aus dem Dichlormethanextrakt gelang die Isolierung zweier steroidaler Peroxide (**P-2** und **P-3**), die im Steroidgrundgerüst der Verbindung **P-1** entsprechen. Die bei diesen Verbindungen (**P-2** und **P-3**) beobachteten NOE-Wechselwirkungen im Bereich der Endkette und des Rings D belegen die relative Konfiguration, wie sie auch bei der hier beschriebenen Verbindung **P-1** vermutet wird. Die hohe Übereinstimmung der  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten dieser drei Steriode (**P-1**, **P-2** und **P-3**) im Bereich der Endkette,

lassen bei der Verbindung **P-3** auf die gleiche relative Konfiguration schliessen, wie sie auch bei den anderen beiden Verbindungen nachgewiesen werden konnte.

Vergleiche der  $^{13}\text{C}$ -NMR- und MS-Daten mit der Literatur <sup>39</sup> und elektronischen Datenbanken (NIST 98 <sup>96</sup>) bestätigten dieses Ergebnis. Ferner konnte über den Abgleich der NMR-spektroskopischen Daten die oben gezeigte relative Konfiguration bestätigt werden.

Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**P-1**) ist ein bekannter und weit verbreiteter Naturstoff. So konnte Orcutt und Richardson diese Verbindung in der Grünalge *Oocystis polymorpha* identifizieren <sup>97</sup>. In Pilzen wurde er erstmals von *Musgrave* et al. in der Gattung *Fomes* nachgewiesen <sup>98</sup>. *Smania* et al. isolierte Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**P-1**) aus dem Pilz *Ganoderma applanatum* und wies eine antibakterielle Wirkung auf *Escherichia coli* und *Pseudomonas*-Arten nach <sup>99</sup>.

In dem Baumpilz *Phellinus robustus* wurde diese Verbindung hier zum erstenmal beschrieben.

#### 4.1.3 Auftrennung des Dichlormethanextraktes

Der Dichlormethan-Extrakt von zerkleinerten Fruchtkörpern von *Phellinus robustus* wurde säulenchromatographisch an Sephadex-LH20 mit Chloroform und Methanol 1:1 in sechs Fraktionen vorgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mehrmals säulenchromatographisch an Kieselgel mit unterschiedlichen Lösungsmittelgradienten aus n-Hexan und Ethylacetat bzw. n-Hexan und Diethylether getrennt.

Die qualitative Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte mittels DC. Fraktionen, die nach der dünnschichtchromatographischen Analyse einheitlich erschienen (nur aus einer Bande bestehend), wurden NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch vermessen.

Fraktionen, die bei der DC-Trennung mehrere Banden erkennen ließen, wurden erneut an Kieselgel säulenchromatographisch aufgetrennt. Konnte auf diese Weise keine weitere Isolierung erzielt werden, wurde eine weitere Separierung mittels HPLC oder präparativer Gaschromatographie durchgeführt.

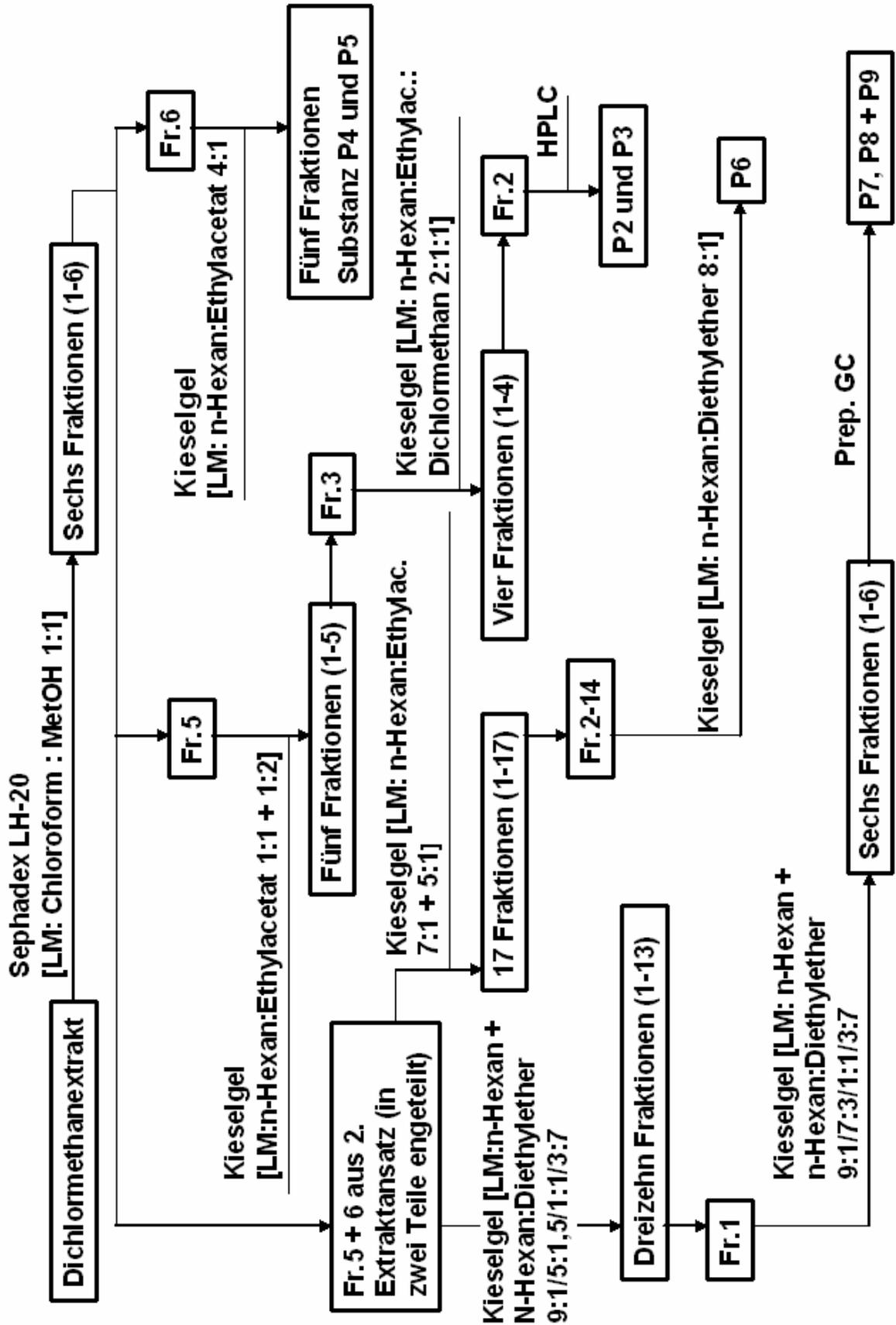
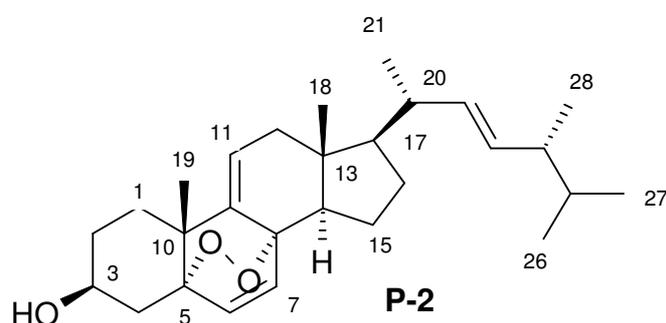


Abb. 13: Übersicht über die Auftrennungsschritte des Dichlormethanextraktes von *Phellinus robustus*.

#### 4.1.4 Inhaltsstoffe des Dichlormethanextraktes

Die aus der oben beschriebenen säulenchromatographischen Trennung mit Sephadex LH-20 erhaltene Fraktion 5, wurde säulenchromatographisch an Kieselgel in fünf Fraktionen aufgetrennt. Eine weiter Separierung der Fraktion 3 an Kieselgel, sowie eine anschließende HPLC-Auftrennung führte zur Isolierung der beiden Verbindungen **P-2** und **P-3**.

#### 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (**P-2**)



Das EI-Massenspektrum dieser Verbindung läßt einen Molekülpeak bei  $m/z$  426 (13%) vermuten. Dies wird gestützt durch die Fragmente  $m/z$  411 ( $M^+ - 15$ ,  $-CH_3$ ),  $m/z$  410 ( $M^+ - 16$ , O(?)),  $m/z$  408 ( $M^+ - 18$ ,  $-H_2O$ ).

Für das Molekülion  $M^+ = 426$  liefert das HR-MS-Spektrum eine Summenformel von  $C_{28}H_{42}O_3$  (Abweichung:  $-0,1$  mmu). Dies steht in Einklang mit der in den NMR-Spektren registrierten Anzahl von  $^{13}C$ -Signalen und Protonen.

Das Massenspektrum wird dominiert durch drei intensive Fragmente:  $m/z$  394 (100%), 376 (74%) und 251 (96%).

Die HR-MS gibt für den Peak bei  $m/z$  394 eine Zusammensetzung von  $C_{28}H_{42}O$  an. Daraus resultiert als Differenz zum Molekülpeak die Abspaltung von zwei Sauerstoffen ( $-O_2$ ) ( $\Delta m = 32$ ). In der Literatur<sup>100, 101</sup> wird eine derartige Abspaltung bei dem Vorliegen von zyklischen Peroxiden beschrieben.

Für den Peak bei  $m/z$  376 ergibt die HR-MS eine Zusammensetzung von  $C_{28}H_{40}$ . Wenn dieses Fragment aus  $m/z$  394 entsteht, geschieht dieses durch Wasserabspaltung. Für den Peak bei  $m/z$  251 präsentiert die HR-MS eine Zusammensetzung von  $C_{19}H_{23}$ .

Aus der Summenformel  $C_{28}H_{42}O_3$  leitet sich für diese Verbindung eine Anzahl von acht Doppelbindungsäquivalenten ab. Da aus den NMR-spektroskopischen Daten

drei Doppelbindungen ersichtlich sind, muß dieses Molekül zusätzlich fünf Ringe enthalten.

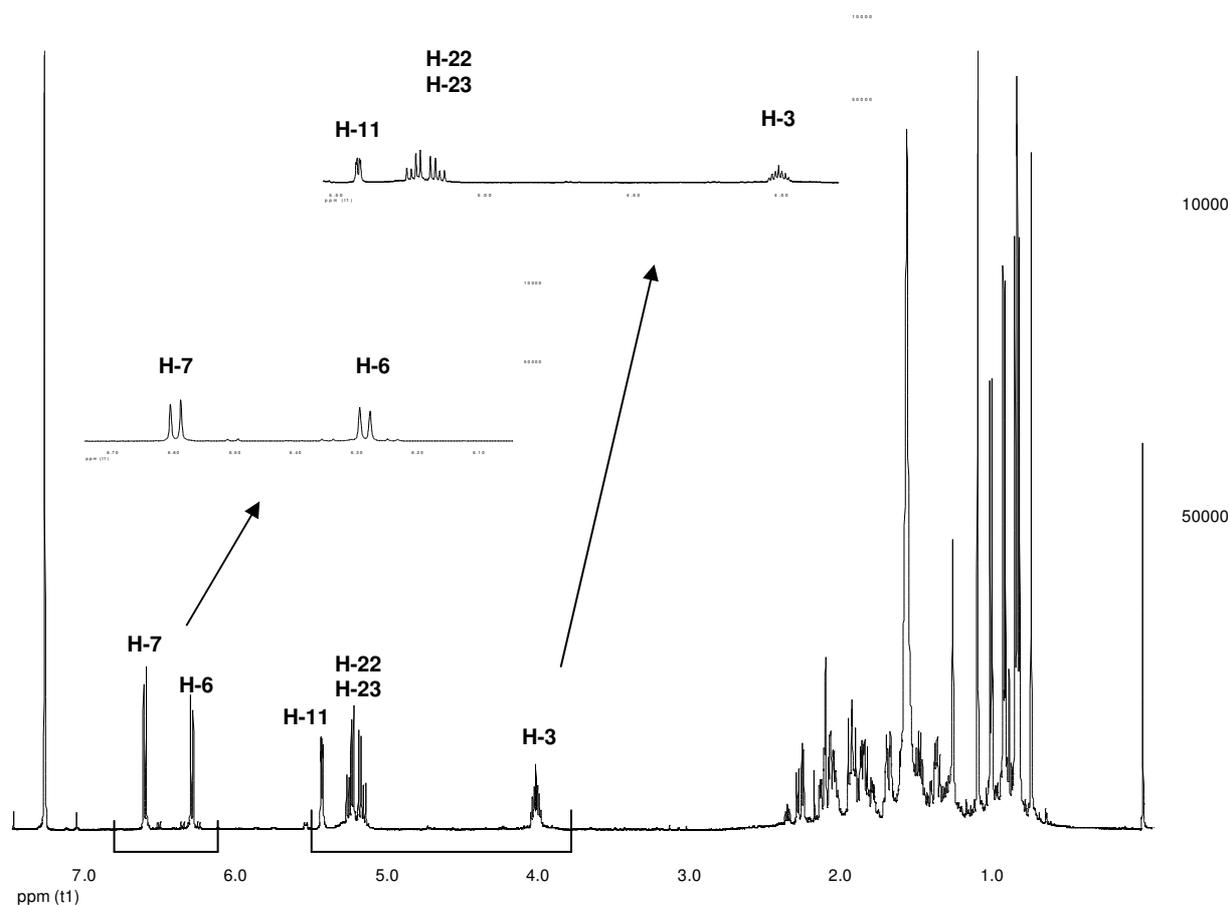
Die Ergebnisse des  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Aus dieser Tabelle ist auch die Verteilung der olefinischen Protonen an den Doppelbindungen ersichtlich: Fünf olefinische C-Atome tragen jeweils ein H-Atom; daneben existiert ein quartärer olefinischer Kohlenstoff.

Nr.	$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) in ppm bei 100.13 MHz	C-Atom	Strukturelement	$^1\text{H}$ -NMR-Daten ( $\text{CDCl}_3$ ) in ppm bei 400.13 MHz	H,H-Kopplung in Hz
1	13.3 q	18	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.73 s	-
2	17.9 q	28	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.91 d	$^3J_{\text{H}28, \text{H}24} = 6.8$
3	20.0 q	26	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.82 - 0.83 d	$^3J_{\text{H}26, \text{H}25} = 6.9$
4	20.3 q	27	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.82 - 0.83 d	$^3J_{\text{H}27, \text{H}25} = 6.9$
5	21.1 q	21	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.00 d	$^3J_{\text{H}21, \text{H}20} = 6.6$
6	21.28 t	15	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.56 + 1.66 m	-
7	25.9 q	19	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.09 s	-
8	29.0 t	16	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.34 + 1.77 m	-
9	30.9 t	2	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.89 m	-
10	32.9 t	1	-CH <sub>2</sub> -	1H, 1.65 m	-
11	33.4 d	25	-CH<	1H, 1.46 m	-
12	36.4 t	4	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.88-1.93/ 2.08 m	-
13	38.3 s	10	>C<	-	-
14	40.29 d	20	-CH<	1H, 2.01 m	-
15	41.5 t	12	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.05 d + 2.23 m	-
16	43.1 d	24	-CH<	1H, 1.84 m	-
17	44.0 s	13	>C<	-	-
18	48.5 d	14	-CH<	1H, 1.82 m	-
19	56.2 d	17	-CH<	1H, 1.34 m	-
20	66.7 d	3	-CH<	1H, 4.01 m	-
21	78.8 s	8	>C<	-	-
22	83.1 s	5	>C<	-	-
23	120.1 d	11	-CH=	1H, 5.42 dd	$^3J_{\text{H}11, \text{H}12\text{a}} = 1.8$ $^3J_{\text{H}11, \text{H}12\text{b}} = 5.9$
24	131.0 d	7	-CH=	1H, 6.59 d	$^3J_{\text{H}7, \text{H}6} = 8.5$
25	132.8 d	23	-CH=	1H, 5.24 dd	$^3J_{\text{H}23, \text{H}24} = 7.55$ $^3J_{\text{H}23, \text{H}22} = 15.3$
26	135.5 d	6	-CH=	1H, 6.28 d	$^3J_{\text{H}6, \text{H}7} = 8.5$
27	135.8 d	22	-CH=	1H, 5.16 dd	$^3J_{\text{H}22, \text{H}20} = 8.3$ $^3J_{\text{H}22, \text{H}23} = 15.3$
28	142.9 s	9	>C=	-	-

**Tab. 6:** Zuordnung der NMR-Signale von 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (**P-2**).

Die Abb. 14 zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der isolierten Komponente **P-2**. Dieses läßt im olefinischen Bereich zwischen 5.1 und 6.6 ppm fünf Protonensignale erkennen

( $\delta$  6.59, 1H, d; 6.2 ppm, 1H, d; 5.42 ppm, 1H, dd; 5.24 ppm, 1H, dd; 5.16 ppm, 1H, dd). Im mittleren  $\delta$ -Bereich bei 4.01 ppm ist das Multipllett eines Protons erkennbar. Im Bereich von  $\delta$  1.2 bis 2.4 ppm zeigen sich eine Reihe komplexer Multipletts, die sich teilweise stark überlagern ( $\delta$  1.56/1.66 ppm, 2H; 1.34/1.77, 2H; 1.89, 2H; 1.65, 1H; 1.46, 1H; 1.88-1.93/2.08, 2H; 2.01, 1H; 1.84, 1H; 1.82, 1H; 1.34, 1H). Bei hohem Feld sind zwischen  $\delta$  0.7 und 1.1 ppm die Signale von sechs Methylgruppen sichtbar ( $\delta$  0.73 ppm, 3H, s; 0.80-0.85 ppm, 6H, 2x d,  $J=6.9$  Hz; 0.91 ppm, 3H, d,  $J=6.8$  Hz; 1.0 ppm, 3H, d,  $J=6.6$  Hz; 1.09 ppm, 3H, s).



**Abb. 14:**  $^1\text{H-NMR}$  von 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (P-2) (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum weist 28 getrennte Signale auf. Im olefinischen Bereich erscheinen sechs Resonanzsignale, davon sind fünf Methylgruppen ( $\delta=120.1, 131.0, 132.8, 135.5, 135.8$  ppm [d]), und eines repräsentiert einen quartären Kohlenstoff ( $\delta=142.9$  ppm [s]).

Bei der Analyse des  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrums fiel eine hohe Ähnlichkeit mit dem Spektrum der Komponente **P-1** auf, die als Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol identifiziert wurde

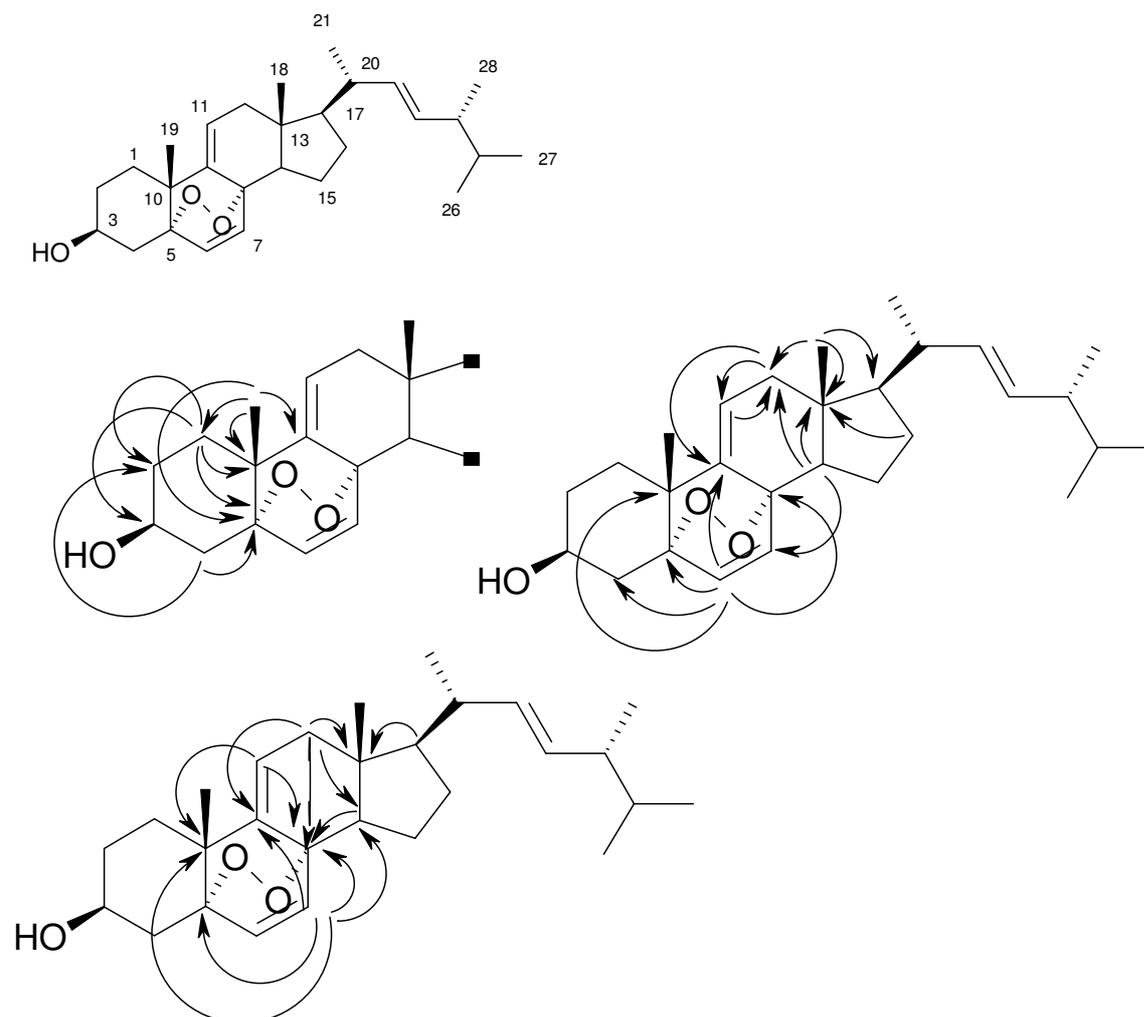
(siehe Kap. 4.1.2). Dabei waren die chemischen Verschiebungen von 17 C-Atomen dieser beiden Verbindungen nahezu identisch (vgl. Tab. 5 und Tab. 6). Es lag deshalb nahe, zu vermuten, dass es sich bei der isolierten Komponente **P-2** ebenfalls um ein Ergosterolderivat handelt.

Insgesamt ergab der NMR-Vergleich der beiden Steroide **P-1** und **P-2** folgendes:

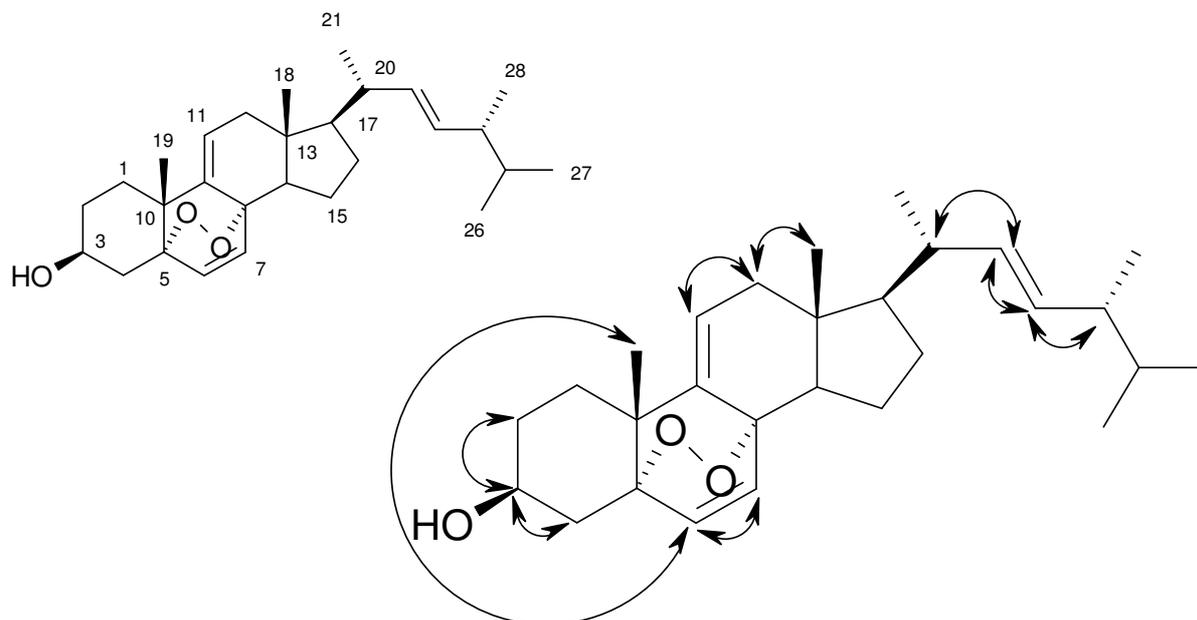
- Die NMR-Daten der Seitenkette (C-20 bis C-28) sowie von Teilen des Ringes D (C-13 und C-15 bis C-18) zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmung.
- Für den Ring A gibt es eine partielle Übereinstimmung.
- Starke Unterschiede dagegen waren im Bereich der Ringe B und C (C-5 bis C-11) nachweisbar.

Die gefundenen HMBC-Korrelationen bestätigten die strukturellen Übereinstimmungen im Bereich von Ring D und der Seitenkette.

Im Bereich der Ringe B und C konnten, die in den folgenden Skizzen gezeigten, HMBC-Kopplungen nachgewiesen werden (aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die HMBC-Kopplungen auf drei Formelzeichnungen verteilt worden):



Auch die Auswertungen der HH-COSY-Kopplungen belegen eine enge strukturelle Verwandtschaft mit Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (isolierte Komponente **P-1**):



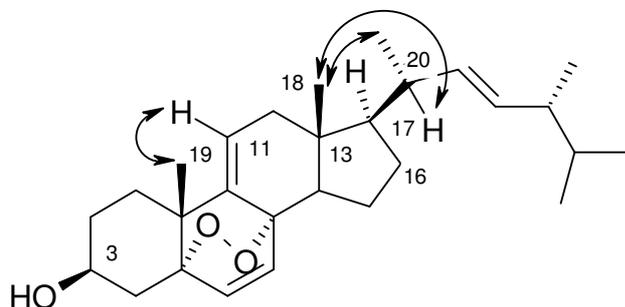
Nach Auswertung der HMBC- und HH-COSY-Daten mußte eine Doppelbindung im Ring B zwischen den Positionen 6 und 7 liegen. Die zwei noch zur Verfügung stehenden Sauerstoffatome waren zwangsläufig als Brücke zwischen den C-Atomen 5 und 8 anzuordnen. Ein wesentliches Indiz dafür sind die Tieffeldverschiebungen der  $^{13}\text{C}$ -Signale dieser Kohlenstoffatome (vgl. Tab. 6).

Aufgrund der Anzahl der Doppelbindungsäquivalente dieser Verbindung (acht) mußte durch die Einführung zweier O-Atome noch ein zusätzlicher Ring etabliert werden, sodas letztlich als Strukturinkrement nur eine Peroxidgruppe möglich war. Damit konnte diese aus dem Dichlormethanextrakt von *Phellinus robustus* isolierte Verbindung als 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (**P-2**) identifiziert werden.

Eine Recherche in der CAS-Datenbank ergab, dass es sich dabei um einen bereits bekannten Naturstoff handelt. Ein Vergleich der massen- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopischen Daten mit Literaturangaben bestätigte die Identität dieser Verbindung.

Bei der Literaturswertung stellt sich heraus, dass von vier Publikationen zwei die Protonen- bzw. Kohlenstoff-Signalzuordnung bei den Methyl-Gruppen C-21 und C-28 vertauscht haben <sup>102, 103</sup>. Diese Signal-Verwechslung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die entsprechenden Kopplungen im HMBC nachgewiesen werden. Zwei andere Publikationen bestätigen die hier aufgeführten Signalzuordnungen <sup>104, 105</sup>.

Die NOESY-Daten zur Klärung der Stereochemie sind in folgender Abbildung wiedergegeben:

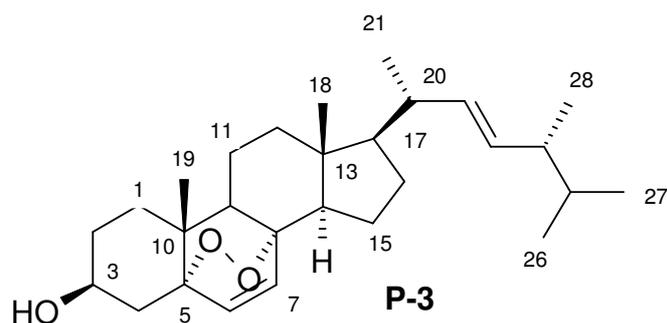


Die relative Konfiguration dieser Verbindung konnte über die NOE-Wechselwirkungen nur bedingt geklärt werden. Die Konfiguration an C-13/C-17 war nicht determinierbar, weil die Protonen der Methylgruppe 18 mit einem Signal bei  $\delta$  1.34 ppm in Wechselwirkung treten, welches aber sowohl von H-16 und H-17 stammen kann, sodass hier keine konkrete Aussage möglich ist. Die relative Konfiguration an C-10 ist dadurch festgelegt, dass die Protonen der Methylgruppen 19 im NOESY-Experiment das Proton H-11 sehen. Das Proton der OH-Gruppe an C-3 ist im Spektrum nicht sichtbar. Im Molekülmodell zeigt sich jedoch, dass bei einer *trans*-Konfiguration von der OH-Gruppe zur Methylgruppe 19 ( $\alpha$ -Stellung) das Proton H-3 den Methylprotonen soweit genähert ist, dass ein entsprechender positiver NOE zu erwarten wäre. Dieser war nicht zu beobachten. Mit gewissen Vorbehalten ist deshalb zu vermuten, dass die OH-Gruppe an C-3 an diesem Molekül zur Methylgruppe an C-10  $\beta$ -ständig ist.

Dieser Sachverhalt wird auch durch ein Vergleich mit den NMR-Daten aus der Literatur <sup>104</sup> bestätigt, die auch eine vollständige Zuordnung der relativen Konfiguration dieser Verbindung **P-2** erlaubten.

Isoliert wurde diese Verbindung vormals von Lobo et al. aus dem Pilz *Pisolithus tinctorius* var. *crassipes* <sup>106</sup>. Cateni et al. gewannen diese Verbindung aus dem Pilz *Stereum hirsutum* und konnte bei diesem Steroid eine Wirkung gegenüber dem Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* (Erreger der Tuberkulose) nachweisen <sup>107</sup>.

Aus dem Pilz *Phellinus robustus* konnten diese Verbindung hier zum ersten mal isoliert werden.

**Ergosterolperoxid / (-)-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxyergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (P-3)**

Das EI-Massenspektrum dieser Verbindung läßt einen Molekülpeak bei  $m/z$  428 (5%) vermuten. Die beobachtete Abspaltung von 18 Masseneinheiten ( $-H_2O$ ) indiziert Sauerstoff. Das HR-MS-Spektrum liefert für das Molekülion  $M^+ = 428$  eine Summenformel von  $C_{28}H_{44}O_3$  (Abweichung -0,2 mmu). Dies stand in Einklang mit der in den NMR-Spektren registrierten Anzahl von  $^{13}C$ -Signalen und Protonen. Das Massenspektrum wird dominiert durch den Basispeak  $m/z$  396 mit der Elementarzusammensetzung  $C_{28}H_{44}O$  (Abweichung im HR-MS: 9.4 mmu), der aus dem Molekülion durch Abspaltung von  $O_2$  entstanden sein muß. Eine derartige Eliminierung von Sauerstoff wird in der Literatur beim Vorliegen von zyklischen Peroxiden beschrieben; sie wurde von uns auch bei der Komponente 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (**P-2**) beobachtet.

Für das Molekülion ( $C_{28}H_{44}O_3$ ) läßt sich eine Anzahl von sieben Doppelbindungsäquivalenten ableiten. Da sich aus den NMR-spektroskopischen Befunden eine Anzahl von zwei Doppelbindungen ergibt, muß dieses Molekül zusätzlich fünf Ringe enthalten. Die Ergebnisse des  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Spektrums werden in Tab. 7 präsentiert. Aus dieser Tabelle ergibt sich auch die Verteilung der olefinischen Protonen an den Doppelbindungen: Jedes dieser C-Atome trägt nur ein Proton.

Abb. 15 zeigt das  $^1H$ -NMR-Spektrum der isolierten Verbindung **P-3**. Hier sind im olefinischen Bereich von 5.1 bis 6.5 ppm vier Protonensignale sichtbar ( $\delta$  5.15, 1H, dd; 5.2, 1H, dd; 6.24, 1H, d; 6.5, 1H, d). Im mittleren  $\delta$ -Bereich bei 3.96 ppm ist das Multiplett eines Protons erkennbar. Im Bereich von  $\delta$  1.17 bis 2.13 ppm sind eine Reihe komplexer Multipletts sichtbar, die sich teilweise stark überlagern ( $\delta$  1.39/1.6 ppm, 2H; 1.2/1.5, 2H; 1.33/1.75, 2H; 1.51/1.82, 2H; 1.44, 1H; 1.68/1.93, 2H; 1.9/2.11, 2H; 1.22/1.94, 2H; 2.0, 1H; 1.83, 1H; 1.47, 1H; 1.55, 1H; 1.21, 1H). Bei hohem Feld sind zwischen  $\delta$  0.8 und 1.01 ppm die Signale von sechs Methylgruppen sichtbar ( $\delta$  0.81, 3H, s; 0.81, 3H, d; 0.83, 3H, d; 0.88, 3H, s; 0.91, 3H, d; 1.0, 3H, d).

Nr.	<sup>13</sup> C-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) in ppm bei 100.13 MHz	C-Atom	Strukturelement	<sup>1</sup> H-NMR-Daten (CDCl <sub>3</sub> ) in ppm bei 400.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	13.27 q	18	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.81 s	-
2	17.94 q	28	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.91 d	<sup>3</sup> J <sub>H-28, H-24</sub> = 6.8
3	18.56 q	19	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.88 s	-
4	20.02 q	26	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.81 d	<sup>3</sup> J <sub>H-26, H-25</sub> = 8.0
5	20.33 q	27	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.83 d	<sup>3</sup> J <sub>H-27, H-25</sub> = 8.0
6	21.03 t	15	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.39 + 1.6 m	-
7	21.27 q	21	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.0 d	<sup>3</sup> J <sub>H-21, H-20</sub> = 6.6
8	23.8 t	11	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.2 + 1.5 m	-
9	29.03 t	16	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.33 + 1.75 m	-
10	30.08 t	2	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.51 + 1.82 m	-
11	33.46 d	25	-CH<	1H, 1.44 m	-
12	35.1 t	1	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.68 + 1.93 m	-
13	37.35 t	4	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.9 + 2.11 m	-
14	37.41 s	10	>C<	-	-
15	39.75 t	12	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.22 + 1.94 m	-
16	40.09 d	20	-CH<	1H, 2.0 m	-
17	43.17 d	24	-CH<	1H, 1.83 m	-
18	44.96 s	13	>C<	-	-
19	51.51 d	9	-CH<	1H, 1.47 m	-
20	52.09 d	14	-CH<	1H, 1.55 m	-
21	56.61 d	17	-CH<	1H, 1.21 m	-
22	66.87 d	3	-CH<	1H, 3.96 m	-
23	79.97 s	8	>C<	-	-
24	82.53 s	5	>C<	-	-
25	131.15 d	7	-CH=	1H, 6.5 d	<sup>3</sup> J <sub>H-7, H-6</sub> = 8.5
26	132.72 d	23	-CH=	1H, 5.2 dd	<sup>3</sup> J <sub>H-23, H-24</sub> = 7.5 <sup>3</sup> J <sub>H-23, H-22</sub> = 15.2
27	135.59 d	22	-CH=	1H, 5.15 dd	<sup>3</sup> J <sub>H-22, H-20</sub> = 8.3 <sup>3</sup> J <sub>H-22, H-23</sub> = 15.2
28	135.8 d	6	-CH=	1H, 6.24 d	<sup>3</sup> J <sub>H-6, H-7</sub> = 8.5

Tab. 7: Zuordnung der NMR-Signale von Ergosterolperoxid (P-3).

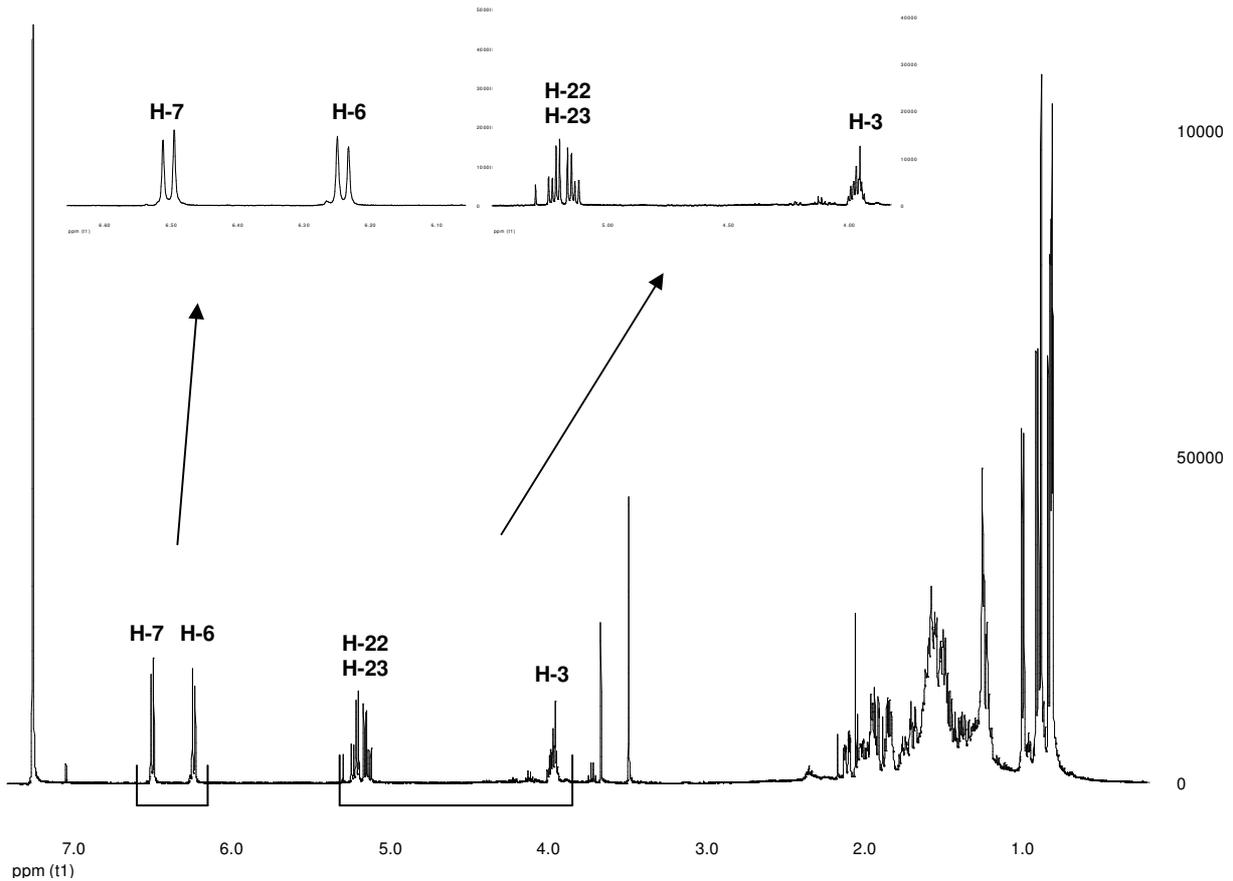
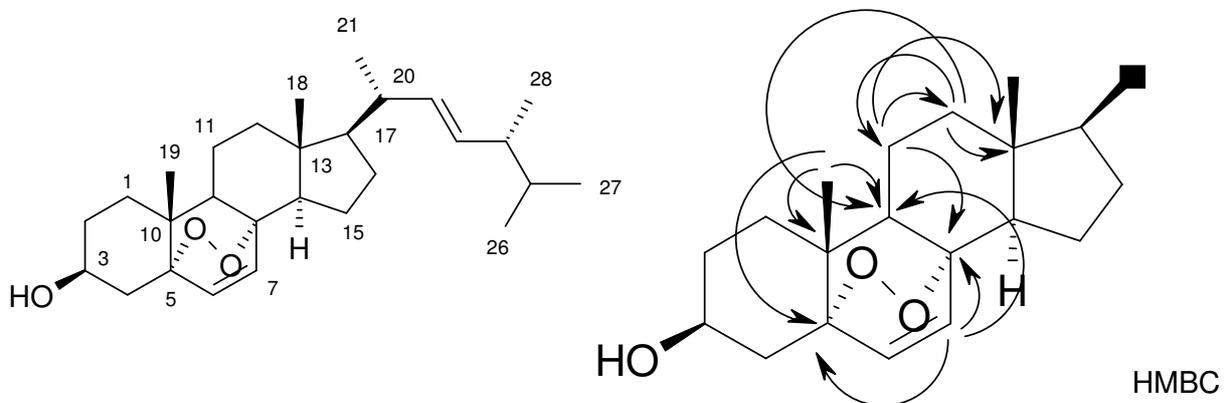
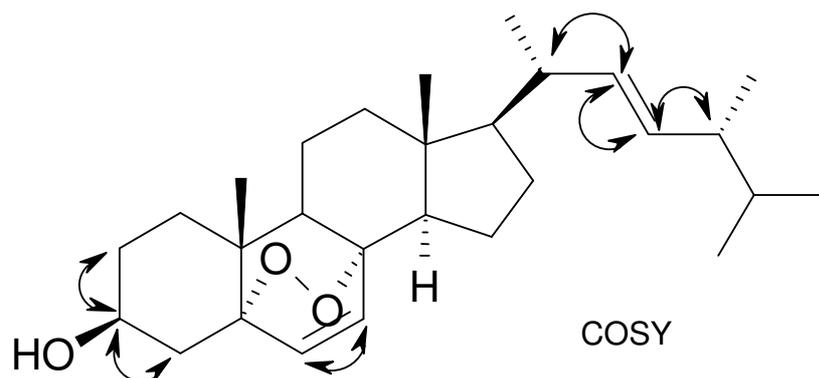


Abb. 15:  $^1\text{H-NMR}$  von Ergosterolperoxid (P-3) (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Beim Vergleich der  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten der Komponenten **P-2** und **P-3** fällt die große Übereinstimmung in den Daten zahlreicher C-Atome auf. Gravierende Unterschiede lassen sich nur im Bereich der C-Signale 9 und 11 erkennen, die bei der Komponente **P-3** in den aliphatischen Bereich verschoben worden sind.

Die Ergebnisse der HMBC- und HH-COSY-Analyse dieses Molekülbereichs werden durch folgende Skizzen dargestellt:





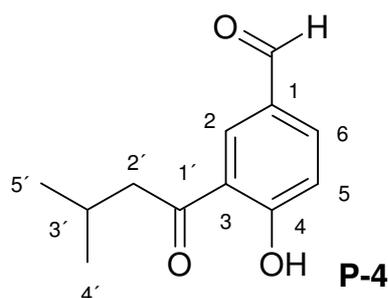
Als Ergebnis der NMR-spektroskopischen Analyse der Verbindung **P-3** ergibt sich, dass sich diese Komponente lediglich durch das Fehlen der Doppelbindung zwischen C-9 und C-11 von der zuvor diskutierten Verbindung **P-2** unterscheidet. **P-3** ist daher Ergosterolperoxid bzw. 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxyergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol.

Ein Vergleich der NMR-spektroskopischen Daten mit entsprechenden Literaturangaben<sup>104</sup> bestätigte die Identität dieser Verbindung.

Ihre relative Konfiguration konnte über die NOE-Wechselwirkungen nicht zuverlässig geklärt werden (vgl. die entsprechende Diskussion bei **P-2**). Die hohe Übereinstimmung der Lage der <sup>13</sup>C-Signale mit Literaturwerten macht aber die angegebene Konfiguration wahrscheinlich.

Bei dieser Verbindung handelt es sich um einen bekannten Naturstoff, der aus *Daedalea quercina* L. (Fr.) isoliert wurde<sup>108</sup>. Wie die Verbindung **P-2** wurde auch diese Substanz von Cetani et al. aus *Stereum hirsutum* isoliert und mit einer positiven Wirkung auf *Mycobacterium tuberculosis* getestet<sup>107</sup>. In dem Pilz *Phellinus robustus* wurde diese Verbindung hier zum ersten mal nachgewiesen und beschrieben.

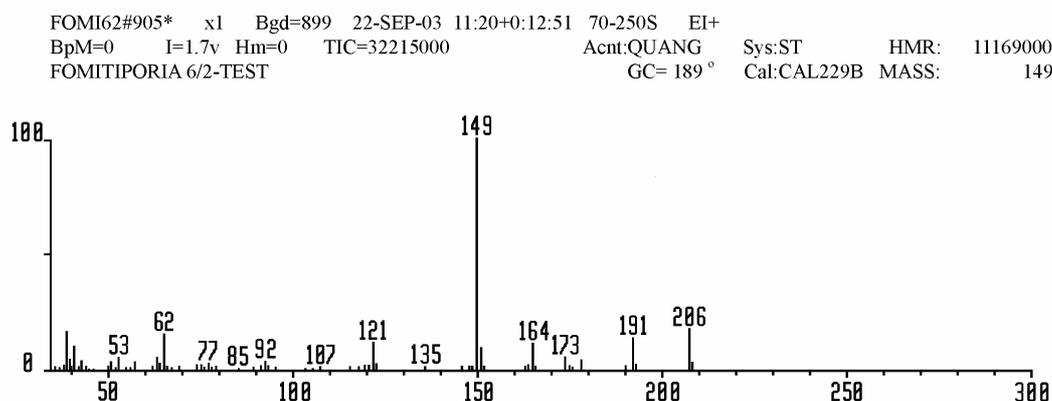
#### 4-Hydroxy-3-(3-methyl-1-oxobutyl)benzaldehyd (**P-4**)



Der Dichlormethan-Extrakt wurde, wie oben beschrieben, an Sephadex LH-20 fraktioniert. Die aus dieser Trennung resultierende Fraktion 6, wurde an Kieselgel säulenchromatographisch aufgetrennt (n-Hexan : Ethylacetat 4:1). Bei dieser Auftrennung wurden fünf Fraktionen erhalten. Die aus dieser Trennung resultierende Fraktion Nr. 2 enthielt die reine hier beschriebene Verbindung.

Die HR-MS-Aufnahme liefert für das vermutete Molekülion  $M^+ = 206$  eine Summenformel von  $C_{12}H_{14}O_3$  (Abweichung  $-0,5$  mmu). Dieses entspricht der in den NMR-Spektren registrierten Anzahl von  $^{13}C$ -Signalen und Protonen.

Basispeak ist das Ion  $m/z$  149 (HR-MS:  $C_8H_5O_3$ ). Als weitere charakteristische Fragmente sind zu nennen:  $m/z$  191 ( $C_{11}H_{11}O_3$ :  $M^+ -15, -CH_3$  ; Int. 15%),  $m/z$  164 ( $C_9H_8O_3$ :  $M^+ -42, -C_3H_6$ ; 12%).



**Abb. 16: EI-MS von 4-Hydroxy-3-(3-methyl-1-oxobutyl)benzaldehyd (P-4).**

Aus der Summenformel  $C_{12}H_{14}O_3$  läßt sich eine Anzahl von sechs Doppelbindungsäquivalenten ableiten. Da aus den NMR-spektroskopischen Daten die Existenz von fünf Doppelbindungen ersichtlich ist (vgl. Tab. 8), muß dieses Molekül einen Ring enthalten.

Das  $^{13}C$ -NMR zeigt überraschenderweise nur zehn Signale (vgl. Abb. 69 und Abb. 70 im Spektrenanhang). Davon sind sechs im olefinischen Bereich positioniert. Die Auswertung des HMQC-Spektrums ergab, dass zwei  $^{13}C$ -Peaks jeweils mit einem weiteren Signal überlagert waren, sodass schließlich – im Einklang mit der Summenformel - insgesamt 12 C-Atome nachgewiesen werden konnten. Die  $\delta$ -Werte der einzelnen C-Signale, ihre Multiplizität, sowie die entsprechenden  $^1H$ -NMR-Daten sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Nr.	$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) in ppm bei 100.13 MHz	C-Atom	Strukturelement	$^1\text{H-NMR-Daten}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) in ppm bei 400.13 MHz	HH-Kopplungs- konstanten in Hz
1	23.09 q	4' + 5'	2x $\text{CH}_3$	6H, 1.04 d	$^3J_{\text{H-4'}/\text{H-5'}, \text{H-3'}} = 6.6 \text{ Hz}$
2	25.72 d	3'	>CH-	1H, 2.33 m	
3	47.44 t	2'	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.95 d	$^3J_{\text{H-2'}, \text{H-3'}} = 6.8 \text{ Hz}$
4	120.03 d	5	=CH-	1H, 7.11 d	$^3J_{\text{H-5}, \text{H-6}} = 8.6 \text{ Hz}$ (ortho)
5	128.42 s	1 + 3	>C=		
6	133.37 d	2	=CH-	1H, 8.32 d	$^4J_{\text{H-2}, \text{H-6}} = 2 \text{ Hz}$ (meta)
7	137.19 d	6	=CH-	1H, 7.99 dd	$^4J_{\text{H-6}, \text{H-2}} = 2 \text{ Hz}$ (meta) $^3J_{\text{H-6}, \text{H-5}} = 8.6 \text{ Hz}$ (ortho)
8	167.76 d	4	=C-OH	1H, 13.05 s	
9	190.23 d	1 <sub>CHO</sub>	-CH=O	1H, 9.91 s	
10	207.03 s	1'	>C=O		

**Tab. 8: Zuordnung der NMR-Signale von 4-Hydroxy-3-(3-methyl-1-oxobutyl)benzaldehyd (P-4).**

Die beiden  $^{13}\text{C}$ -Signale bei der höchsten Frequenz sind zwei Carbonylfunktionen zuzuordnen: einer Ketogruppe (C-1' bei 207.03 ppm) und einer Aldehydgruppe (C-1<sub>CHO</sub> bei 190.23 ppm). Somit enthält das Molekül nur drei C=C-Doppelbindungen. Eines dieser olefinischen C-Atome fällt durch eine deutliche Tieffeldshift auf (C-4,  $\delta = 167.76 \text{ ppm}$ ), hier ist zu vermuten, dass dieses C-Atom ein Sauerstoffsubstituenten trägt.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum dieser Verbindung (Abb. 17) zeigt ein phenolisches Proton (H-4,  $\delta = 13.05 \text{ ppm}$ , s) (starker Tieffeldshift durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung zur Carbonylgruppe C-1' <sup>109</sup>). Desweiteren beobachtet man ein Aldehydproton (H-1<sub>CHO</sub>,  $\delta = 9.91 \text{ ppm}$ , s) und im olefinischen Bereich drei Protonensignale: H-2,  $\delta = 8.32$ , d; H-6,  $\delta = 7.99$ , dd; H-5,  $\delta = 7.11$ , d. Im Bereich zwischen 2 und 3 ppm erkennt man das Signal zweier Protonen (H-2',  $\delta = 2.95$ , d) und einer Methingruppe (H-3',  $\delta = 2.33$ , m). Im vorderen Spektralbereich läßt sich ein Signaldublett erkennen, welches sechs Protonen entspricht. Es handelt sich dabei um die Methylgruppen 4' und 5' (3H-4' und 3H-5',  $\delta = 1.04$ , d).

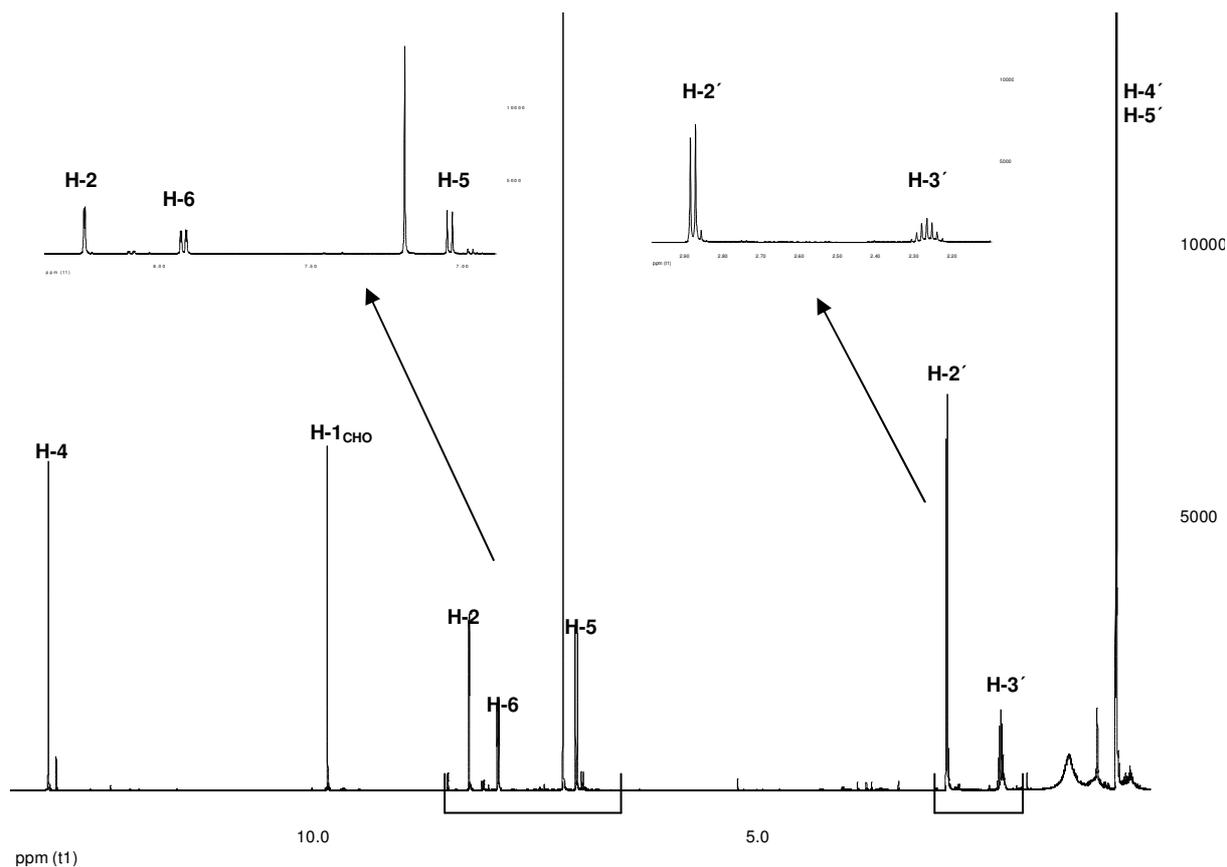


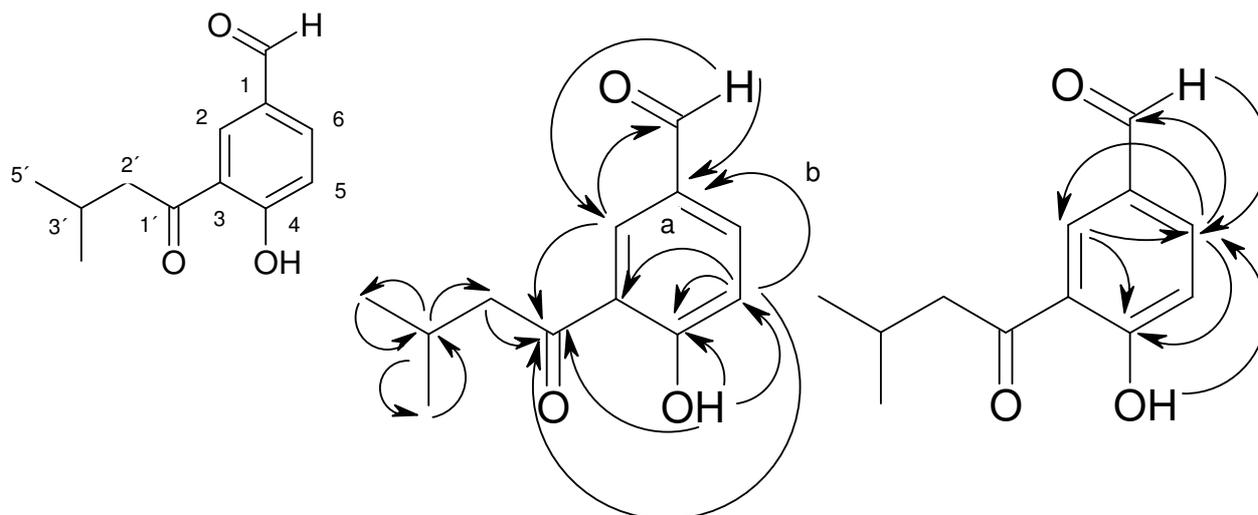
Abb. 17:  $^1\text{H-NMR}$  von 4-Hydroxy-3-(3-methyl-1-oxobutyl)benzaldehyd (P-4) (500.13 MHz  $\text{CDCl}_3$ ).

Insgesamt ergänzen die beobachteten Protonensignale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dieser Verbindung die aus der  $^{13}\text{C-NMR}$ -Analyse erhaltenen Daten.

Die MS-Daten deuten auf das Vorliegen eines aromatischen Systems hin (typische ungesättigte Kohlenwasserstofffragmente  $m/z$  39, 51-53, 63-65, 77, 91). Die Auswertung des  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrums läßt nur drei aromatische Protonen erkennen, d.h. das System ist trisubstituiert. Da nur zwei Signale durch eine große Kopplung  $^3J$  (ortho-Kopplung) aufgespalten sind, können nur zwei vicinale Protonen existieren.

Zur detaillierteren Strukturaufklärung wurden die HMQC-, HMBC-, HH-COSY- und NOESY-Spektren ausgewertet.

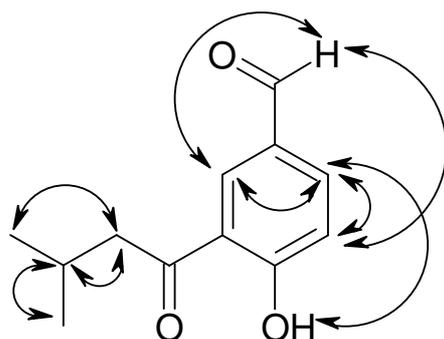
Die im Molekül beobachteten HMBC-Kopplungen sind in der folgenden Skizze abgebildet:



Die Kopplung des Aldehydprotons im HMBC-Spektrum mit den beiden aromatischen Kohlenstoffen C-2 und C-6 zeigt an, dass keines dieser C-Atome eine sauerstoffhaltigen Substituenten tragen kann (die chemische Verschiebung dieser beiden C-Atome liegt in vergleichbarer Größe: C-2  $\delta = 133.37$  ppm und C-6  $\delta = 137.19$  ppm).

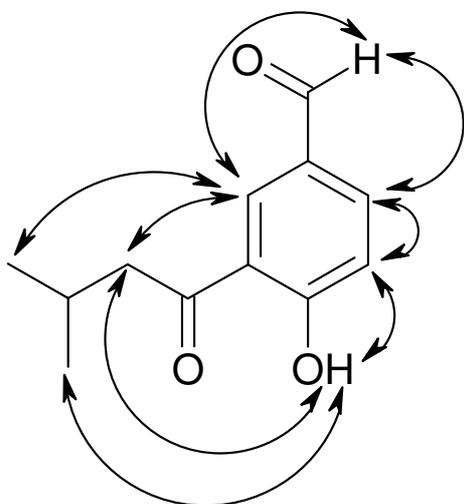
Anmerkung: Da sich die  $^{13}\text{C}$ -Signale von C-1 und C-3 überlagern, ist nicht sicher zu entscheiden, mit welchem dieser Signale das Proton H-5 im HMBC-Spektrum koppelt. Es ist auch eine Kopplung mit beiden C-Atomen möglich (Pfeil a und b).

Die folgende Skizze zeigt die nachgewiesenen COSY-Kopplungen im Molekül:



Man erkennt, dass das Aldehydproton mit H-2 koppelt, welches im  $^1\text{H}$ -NMR lediglich eine kleine Kopplung von  $J = 2$  Hz (meta-Kopplung) aufweist. Dies belegt ebenfalls die Substituenten in den Positionen 1 und 3. Da die Signale des Metakopplungspartner (H-6) zudem noch durch eine große Kopplung (ortho-Kopplung  $J = 8.6$  Hz) aufgespalten ist, muß die Position 5 ein Proton tragen. Daraus folgt zwangsläufig eine Substitution mit einer OH-Gruppe in Position 4.

Die Verteilung der drei Substituenten am aromatischen Ring wurde durch Auswertung der NOE-Wechselwirkungen abgesichert:



Diese Struktur steht auch im Einklang mit dem im EI-Massenspektrum zu beobachteten Signalen: Der das Spektrum beherrschende Basispeak  $m/z$  149 erklärt sich durch die energetisch sehr günstige Benzoylsplaltung (Oniumspaltung). Das gradzahlige Schlüsselion  $m/z$  164 („even electron ion“) deutet auf eine Umlagerung hin und muß hier als McLafferty-Produkt interpretiert werden: H-Abstraktion von einem Proton an 4' an den Carbonylsauerstoff und Spaltung der Bindung 3'/2'.

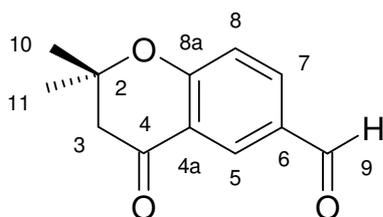
Zusammenfassend ist zu den beobachteten Kopplungen zu sagen:

- Die Trisubstitution am aromatischen Ringsystem konnte durch die HMBC-, HH-COSY- und NOESY-Kopplungen bestätigt und die genaue Anordnung der Substituenten bestimmt werden.
- Der im  $^1\text{H-NMR}$  beobachtete starke Tieffeldshift des Protons der OH-Gruppe H-4 ist durch eine Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoff der Carbonylfunktion C-1' erklärbar.
- Alle gefundenen Kopplungen bestätigen die oben gezeigte Struktur und weisen diese Verbindung als 4-Hydroxy-3-(3-methyl-1-oxobutyl)benzaldehyd (**P-4**) aus.

Die CAS-Recherche ergab, dass 4-Hydroxy-3-(3-methyl-1-oxobutyl)benzaldehyd (**P-4**) bis zum jetzigen Zeitpunkt nur in Zusammenhängen mit Synthesen beschrieben

wird, wie z.B. bei Merlini et al <sup>110</sup>. In dem Baumpilz *Phellinus robustus* konnte diese Verbindung erstmals als Naturstoff beschrieben und identifiziert werden.

#### Strukturaufklärung der Komponente P-5 (2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd) aus dem Dichlormethanextrakt

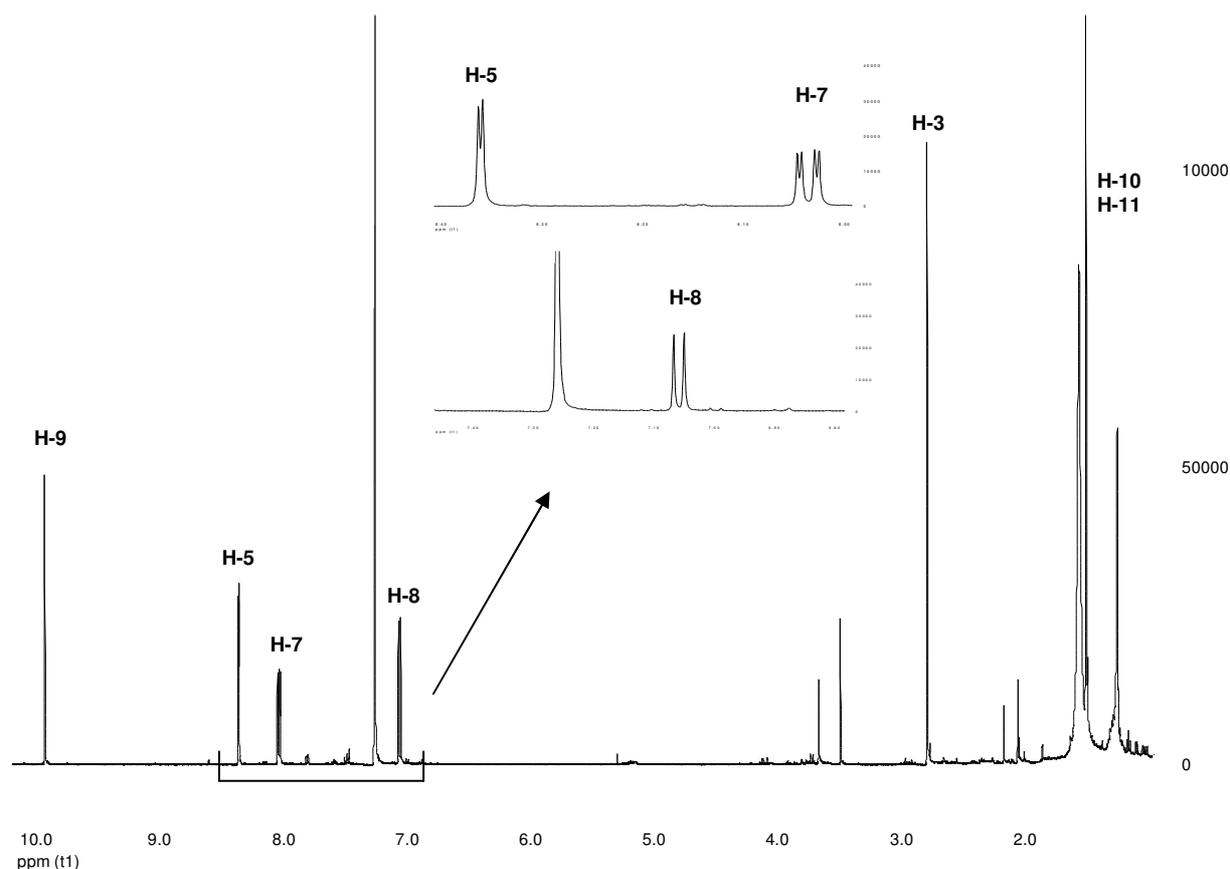


**P-5**

Aus der oben erwähnten säulenchromatographischen Trennung der Fraktion 6 der Sephadex LH-20 Fraktionierung wurde noch eine weitere Verbindung isoliert.

Das Massenspektrum der hochauflösenden MS belegt einen Molekülpeak bei  $m/z$  204. Dieser Molekülpeak ( $m/z$  204 (47 %)) besitzt die Summenformel  $C_{12}H_{12}O_3$ , d.h. das Molekül weist sieben Doppelbindungsäquivalente auf. Diese Summenformel konnte durch Auswertung der NMR-Spektren bestätigt werden. Weitere charakteristische Fragmente des Massenspektrums sind  $m/z$  189 (100%) mit der Summenformel  $C_{11}H_9O_3$ ,  $m/z$  149 ( $C_8H_5O_3$ , Int. 70%),  $m/z$  148 ( $C_8H_4O_3$ , Int. 70%), sowie  $m/z$  119 ( $C_7H_3O_2$ , Int. 24 %).

Das  $^1H$ -NMR-Spektrum dieser Verbindung zeigt ein Signal eines Aldehydprotons ( $\delta$  9.93 ppm [s]), drei Protonen im olefinisch/aromatischen Bereich ( $\delta$  7.06 [d], 8.03 [dd], 8.36 [d]), sowie ein Singulett von zwei Protonen im aliphatischen Bereich ( $\delta$  2.79 [s]) und ein unaufgespaltenes Signal von sechs Protonen bei  $\delta$  1.5 ppm [s].



**Abb. 18:**  $^1\text{H}$ -NMR von 2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd (P-5) (500.13 MHz  $\text{CDCl}_3$ ).

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum lassen sich nur elf Kohlenstoffsignale erkennen (vgl. Abb. 71 und Abb. 72 im Spektrenanhang). Ein Signal bei  $\delta$  27.3 ppm [q] wird von zwei überlagerten Methylgruppen (C-10, C-11) gebildet. Die Lage und Multiplizität der einzelnen C-Atome ergibt sich aus Tab. 9.

Insgesamt erkennt man vier quartäre, olefinische C-Atome, von denen eines an ein Heteroatom gebunden ist (C-6 bei 130.3 ppm, C-8a bei 164.9, C-4a bei 120.3 und C-4 bei 191.5 (Carbonylgruppe)). Sodann kann ein C-Atom einer Aldehydgruppe zugeordnet werden (C-9 bei 190.5 ppm). Daneben treten noch drei olefinische Methingruppen (C-8 bei 119.3 ppm, C-5 bei 131.4 und C-7 bei 134.9) auf. Demnach verteilen sich die massenspektrometrisch abgeleiteten sieben Doppelbindungsäquivalente auf fünf Doppelbindungen und zwei Ringe.

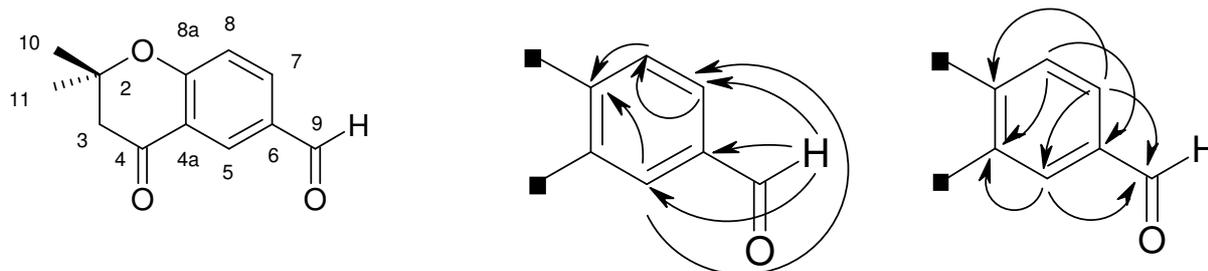
Nr.	$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) in ppm bei 100.13 MHz	C-Atom	Strukturelement	$^1\text{H-NMR}$ -Daten ( $\text{CDCl}_3$ ) in ppm bei 400.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	27.3 q	10 + 11	2x $\text{CH}_3$	6H, 1.5 s	
2	48.2 t	3	$-\text{CH}_2-$	2H, 2.79 s	
3	80.9 s	2	$>\text{C}<$		
4	119.3 d	8	$=\text{CH}-$	1H, 7.06 d	$^3J_{\text{H-8, H-7}} = 8.6 \text{ Hz}$
5	131.4 d	5	$=\text{CH}-$	1H, 8.36 d	$^4J_{\text{H-5, H-7}} = 2.1 \text{ Hz}$
6	134.9 d	7	$=\text{CH}-$	1H, 8.03 dd	$^4J_{\text{H-7, H-5}} = 2.1 \text{ Hz}$ (meta) $^3J_{\text{H-7, H-8}} = 8.6 \text{ Hz}$ (ortho)
7	130.3 s	6	$>\text{C}=\text{}$		
8	164.9 s	8a	$>\text{C}=\text{}$		
9	190.5 d	9	$-\text{CH}=\text{O}$	1H, 9.93 s	
10	120.3 s	4a	$>\text{C}=\text{}$		
11	191.5 s	4	$>\text{C}=\text{O}$		

Tab. 9: Zuordnung der NMR-Signale von 2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd (P-5)

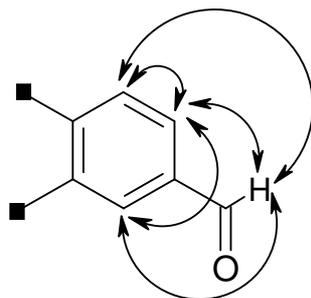
Die weitere Strukturaufklärung erfolgte anhand von HMQC-, HMBC-, HH-COSY-, sowie NOESY-Spektren.

Für das Strukturinkrement C-4a bis C-9 werden die Kopplungsverhältnisse im HMBC-Spektrum durch die folgenden Skizzen verdeutlicht; aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die HMBC-Kopplungen auf zwei Formeln verteilt worden.

Die aus dem HMQC-Spektrum ersichtlichen CH-Korrelationen sind aus Tab. 9 entnehmbar.



Die HH-COSY-Kopplungen dieser Partialstruktur sind in folgender Übersicht dargestellt:



Auch die Aufspaltungsmuster der einzelnen Protonen (vgl.

Abb. 18) stehen mit dieser Partialstruktur in Einklang:

H-5 ( $\delta$  8.36 ppm): Dublett;  $^4J_{\text{H-5, H-7}} = 2.1$  Hz (meta-Kopplung)

H-7 ( $\delta$  8.03 ppm): Doppeldublett;  $^4J_{\text{H-5, H-7}} = 2.1$  Hz und  $^3J_{\text{H-7, H-8}} = 8.6$  Hz (ortho-Kopplung)

H-8 ( $\delta$  7.06 ppm): Dublett;  $^3J_{\text{H-7, H-8}} = 8.6$  Hz (ortho-Kopplung)

H-9 ( $\delta$  9.93 ppm): Singulett

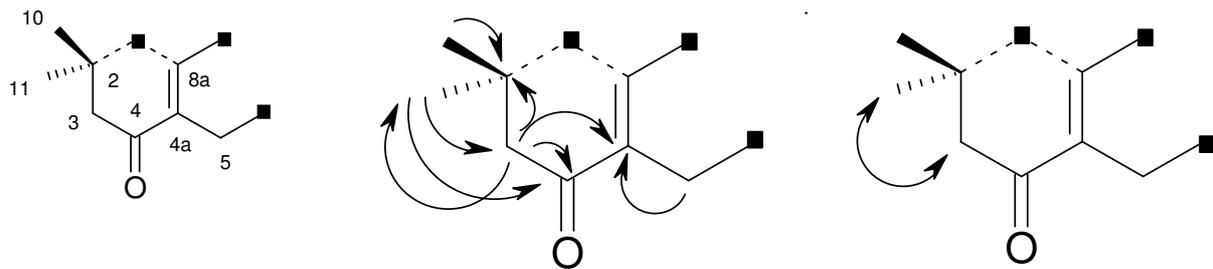
Das HMBC-Spektrum zeigt für das Kohlenstoffatom 8a keine Kopplung von Protonen aus dem linken Teil des Moleküls (z.B. den Methylprotonen H-10 und H-11 oder den Methylenprotonen H-3). Allerdings fällt die sehr starke chemische Verschiebung dieses aromatischen C-Atoms zu tiefem Feld hin auf ( $\delta$  164.9 ppm). Dieses deutet auf ein benachbartes Heteroatom hin.

Auch das C-Atom 4a läßt keine sichere Aussage über eine weitere Nachbarschaft zu, da lediglich eine HMBC-Kopplung zu den Protonen an C-3 erkennbar ist.

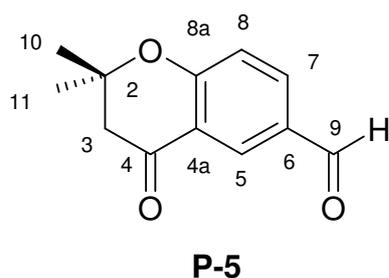
Deshalb wird, beginnend von den beiden Methylgruppen C-10 und C-11 eine zweite Partialstruktur abgeleitet. Die HMQC- und HMBC-Spektren zeigen, dass beide Methylgruppen an einem gemeinsamen C-Atom (C-2) positioniert sind. Da beide Methylgruppen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein gemeinsames, nicht aufgespaltenes Signal zeigen (Singulett bei  $\delta$  1.5 ppm), muß C-2 ein quartäres C-Atom sein.

Seine auffällige Tieffeldverschiebung im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum ( $\delta$  80.9 ppm) läßt ein benachbartes Heteroatom vermuten.

Die weitere Ergänzung dieser Partialstruktur ergibt sich aus den HMQC-, HMBC- und HH-COSY-Spektren in folgender Weise:



Der hohe Wert der chemischen Verschiebung von C-4 deutet auf eine Carbonylfunktion hin. Bei Berücksichtigung der Summenformel  $C_{12}H_{12}O_3$  und Anzahl der Doppelbindungsäquivalente für dieses Molekül müssen die C-Atome 2 und 8a über eine Sauerstoffbrücke miteinander verbunden sein, was auch ihre Tieffeldverschiebung im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum bestätigt (C-2:  $\delta$  80.9 ppm; C-8a:  $\delta$  164.9 ppm). Insgesamt ergibt sich damit folgende Strukturformel für die Verbindung **P-5**.



Durch die Auswertung des NOE-Spektrums (vgl. Abb. 19) konnten Teile der abgeleiteten Struktur bestätigt werden; die Verhältnisse werden durch Betrachten der räumlichen Darstellung verdeutlicht (Abb. 20).

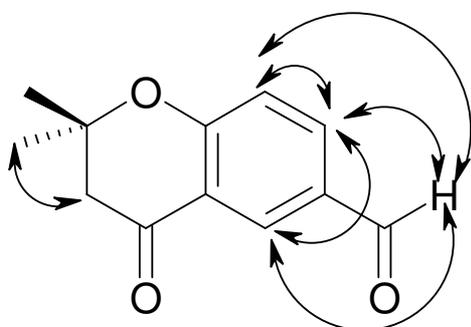
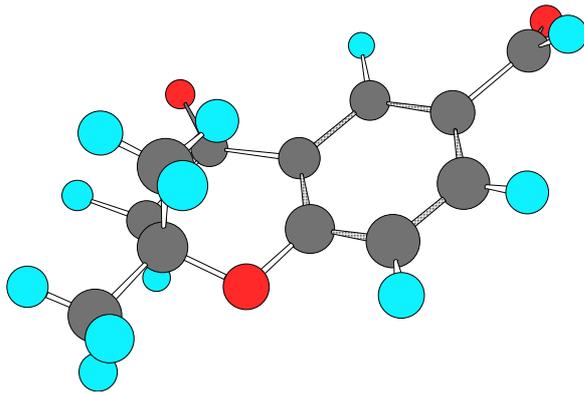


Abb. 19: NOE-Wechselwirkungen bei 2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd (P-5).



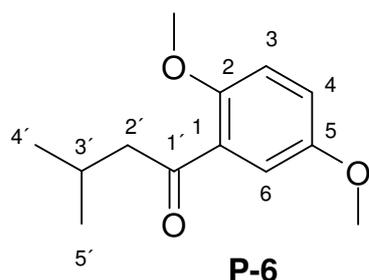
**Abb. 20:** Räumliche Struktur von 2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd (**P-5**).

2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd (**P-5**) wurde erstmals von Ayer et al. aus der Kulturlösung von *Lactarius deliciosus* isoliert und beschrieben <sup>111</sup>. Der Vergleich mit den für diese Verbindung beschriebenen NMR-Daten bestätigte die Identität mit der von uns aus *Phellinus robustus*-Fruchtkörpern isolierten Komponente **P-5**.

*Tabacchi* et al. isolierte 2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd ebenfalls lediglich aus der Kulturlösung eines Pilzes (*Phellinus punctatus* Karst. Pilát, Synonyme: *Phellinus friesianus* (Bres.); Bourdot & Galzin und *Fomitiporia punctata*(Karst.) Murrill). Biotests eines ebenfalls isolierten aromatischen Aldehydes (p-Hydroxybenzaldehyd) mit Protoplasten von *Vitis vinifera* cv. zeigten eine schädigende Wirkung auf Pflanzenzellen <sup>112</sup>, die evtl. auch für die Komponente **P-5** erwartet werden kann.

In dieser Arbeit konnte die Verbindung 2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd (**P-5**) erstmalig direkt aus dem Fruchtkörper eines wildwachsenden Pilzes isoliert werden. Damit konnte bewiesen werden, dass dieser Metabolit nicht nur unter künstlichen Kulturbedingungen von einem Pilz erzeugt wird, sondern auch in natürlich wachsenden Fruchtkörpern vorkommt. Man darf analog zu den Wirkungen von p-Hydroxybenzaldehyd vermuten, dass **P-5** an der schädigenden Wirkung des Baumpilzes *Phellinus robustus* beteiligt ist.

## 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (P-6)



Auch die Komponente **P-6** wurde aus einem Dichlormethanextrakt von *P. robustus* gewonnen, der an Sephadex LH-20 aufgetrennt wurde (bezüglich der Einzelheiten vgl. Übersichtschema Abb. 13).

Das EI-Massenspektrum dieser Verbindung läßt einen Molekülpeak bei  $m/z$  222 (20 %) vermuten. Diese Annahme wird unterstützt durch die Fragmente  $m/z$  207 ( $M^+ - 15$ ,  $-CH_3$ ),  $m/z$  191 ( $M^+ - 31$ , O-Indikation),  $m/z$  180 ( $M^+ - 42$ ).

Als Basispeak tritt ein Ion der Masse  $m/z$  165 auf ( $M^+ - 57$ ). Alle anderen Fragmente mit Ausnahme des Molekülpeaks weisen eine Intensität von weniger als 15% auf.

Die Ionensequenz 52, 63, 77 deutet auf das Vorliegen eines aromatischen Ringes hin.

Der Habitus dieses Massenspektrums weist eine große Ähnlichkeit mit dem entsprechenden Spektrum der Komponente **P-4** auf, weniger, was einzelne Nominalmassen betrifft, aber hinsichtlich der Intensitätsverteilung und bestimmter Schlüsselbruchstücke wie  $M^+ - 42$ . Es wäre deshalb denkbar, dass die in Rede stehende Verbindung eine ähnliche Grundstruktur wie die Komponente **P-4** aufweist, d.h. ein mehrfachsubstituiertes benzoides System vorliegt, mit einer Seitenkette, die zur McLafferty-Umlagerung befähigt ist.

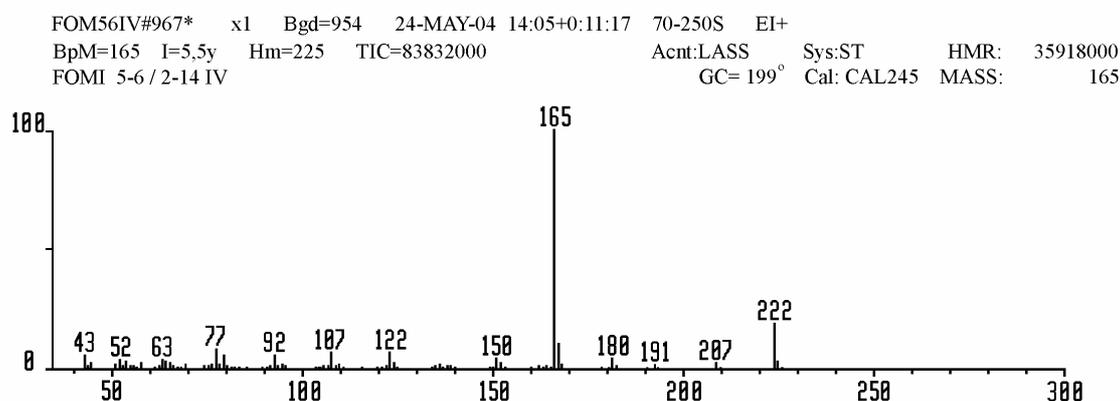


Abb. 21: EI-MS von 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (P-6).

Die Auswertung des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums ergibt zwölf C-Signale (zur Zusammenfassung der NMR-Auswertung vgl. Tab. 10 und Abb. 73 und Abb. 74 im Spektrenanhang). Ein Vergleich mit den HMQC- und  $^1\text{H}$ -NMR-Daten bewies jedoch, dass das C-Signal bei 23.09 ppm zwei Methylgruppen zuzuordnen ist, d.h. die Verbindung besitzt 13 C-Atome. Davon sind sieben im olefinischen Bereich positioniert, mit einem  $\delta$ -Wert größer 110 ppm. Eines dieser Signale weist eine sehr hohe Tieffeldverschiebung auf (202.7 ppm, s) und läßt deshalb die Existenz einer Carbonylfunktion vermuten.

Daraus folgt, dass das Molekül **P-6** drei olefinische Doppelbindungen enthält; drei dieser ungesättigten C-Atome sind quartär, die drei anderen stellen Methingruppen dar.

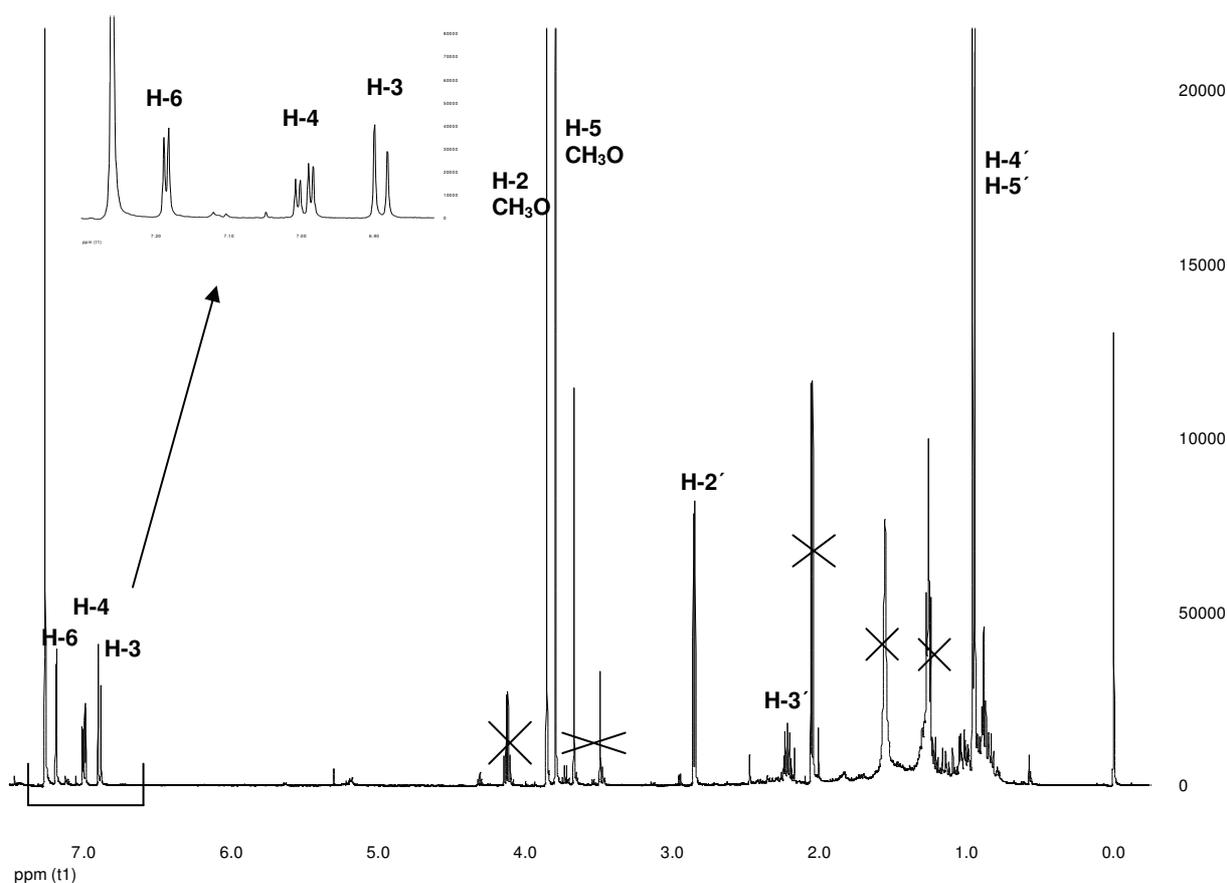
Aus den NMR-spektroskopischen Daten läßt sich demnach die Summenformel  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}$  (=190 Da) ableiten. Die Differenz zum massenspektrometrischen Molekülpeak ( $M^+=222$ ) beträgt 32 Da, d.h. es müssen noch zwei weitere O-Funktionen im Molekül vorliegen, die beide keinen Wasserstoff tragen können.

Nr.	$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) in ppm bei 125.77 MHz	C-Atom	Strukturelement	$^1\text{H}$ -NMR-Daten ( $\text{CDCl}_3$ ) in ppm bei 500.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	23.0 q	4' + 5'	2x $\text{CH}_3$	6H, 0.95 d	$^3J_{\text{H-4'}/\text{H-5'}, \text{H-3'}} = 6.6 \text{ Hz}$
2	25.6 d	3'	>CH-	1H, 2.21 m	$^3J_{\text{H-3'}, \text{H-4'}/\text{H-5'}} = 6.6 \text{ Hz}$
3	52.9 t	2'	- $\text{CH}_2$ -	2H, 2.85 d	$^3J_{\text{H-2'}, \text{H-3'}} = 6.8 \text{ Hz}$
4	55.9 q	2 <sub>MetO</sub>	- $\text{OCH}_3$	3H, 3.79 s	
5	56.4 q	1 <sub>MetO</sub>	- $\text{OCH}_3$	3H, 3.85 s	
6	113.6 d	3	=CH-	1H, 6.89 d	$^3J_{\text{H-3}, \text{H-4}} = 8.9 \text{ Hz}$
7	114.5 d	6	=CH-	1H, 7.18 d	$^4J_{\text{H-6}, \text{H-4}} = 3.2 \text{ Hz}$
8	119.7 d	4	=CH-	1H, 6.99 dd	$^4J_{\text{H-4}, \text{H-6}} = 3.2 \text{ Hz}$ (meta) $^3J_{\text{H-4}, \text{H-3}} = 8.9 \text{ Hz}$ (ortho)
9	152.9 s	2	>C=		
10	153.2 s	1	>C=		
11	153.7 s	5	>C=		
12	202.7 s	1'	>C=O		

**Tab. 10: Zuordnung der NMR-Signale von 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (P-6).**

Die Summenformel der Verbindung **P-6** lautet deshalb  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$ . Daraus läßt sich eine Anzahl von fünf Doppelbindungsäquivalenten ableiten. Bei der nachgewiesenen Existenz von vier Doppelbindungen (3x  $\text{C}=\text{C}$ , 1x  $\text{C}=\text{O}$ ) muß das Molekül folglich ein weiteres Doppelbindungsäquivalent in Form eines Ringsystems enthalten.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dieser Verbindung (Abb. 22, vgl. hierzu auch die Angaben in Tab. 10) zeigt im aromatischen Bereich zwischen  $\delta = 6.8$  und  $7.2$  ppm drei Protonensignale: H-6,  $\delta = 7.18$  ppm, d; H-4,  $6.99$  ppm, dd; H-3,  $6.89$  ppm, d. Bei  $\delta = 3.79$  und  $3.85$  ppm lassen sich zwei scharfe Singulets erkennen, die jeweils drei Protonen zuzuordnen sind und zwei Methoxygruppen entsprechen. Das Dublett bei  $2.85$  ppm repräsentiert eine Methylengruppe, während das Multipllett bei  $2.21$  ppm einer Methingruppe zuzuordnen ist. Das Dublett bei  $0.95$  ppm entspricht sechs Protonen.



**Abb. 22:**  $^1\text{H-NMR}$  von 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (**P-6**) (500.13 MHz  $\text{CDCl}_3$ ).  
Signale von Verunreinigungen sind durchgekreuzt.

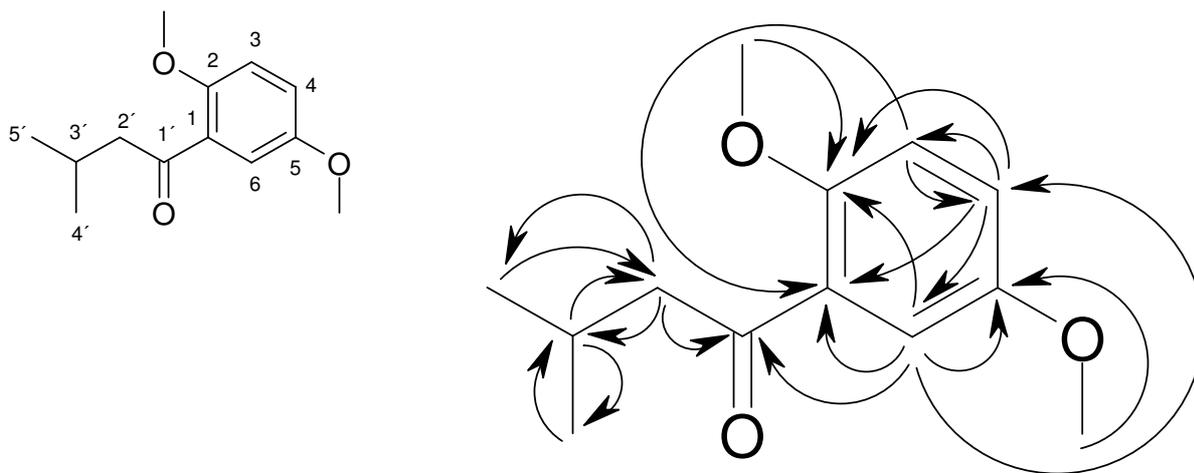
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **P-6** beobachteten Protonensignale mit den aus der  $^{13}\text{C-NMR}$ -Analyse erhaltenden Informationen kompatibel sind.

Da die MS-Daten auf das Vorliegen eines aromatischen Systems hindeuten (typische ungesättigte Kohlenwasserstofffragmente  $m/z$  51-53, 63-65, 77), müssen die drei im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum beobachteten Tieffeldprotonen aromatischer Natur sein. Daraus

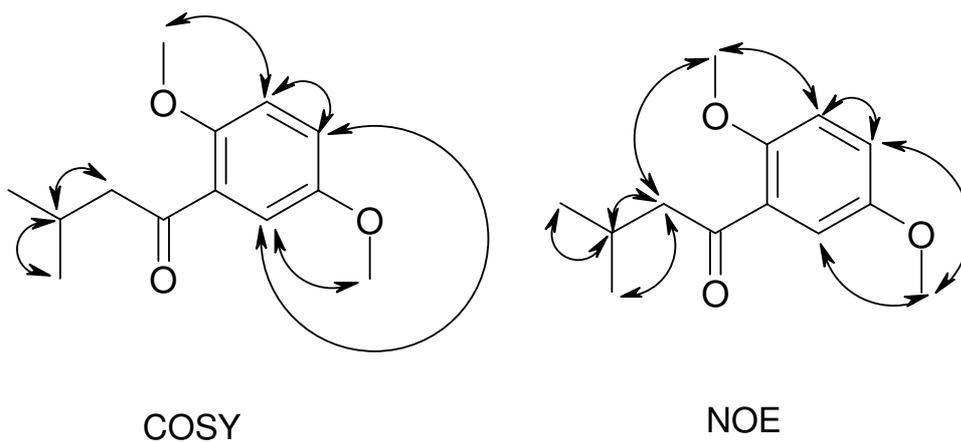
ergibt sich zwangsläufig, dass das benzoide System trisubstituiert ist. Aus dem Vorliegen von nur einer großen Kopplung  $^3J$  (ortho-Kopplung) muß geschlossen werden, dass dabei nur zwei vicinale Protonen existieren.

Zur detaillierten Strukturaufklärung wurden HMQC-, HMBC-, HH-COSY- und NOESY-Spektren ausgewertet.

Die im Molekül beobachteten HMBC-Kopplungen sind in der folgenden Skizze abgebildet:



Die HH-COSY-Kopplungen und NOE-Wechselwirkungen dieses Moleküls veranschaulichen die folgenden Skizzen:



Zu den beobachteten Kopplungen ist folgendes anzumerken:

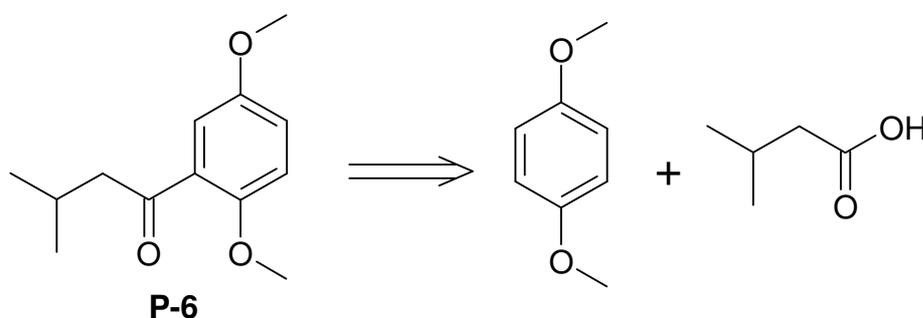
- Die durch das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gezeigte Trisubstitution am aromatischen Ring, sowie die Reihenfolge der Substituenten konnte durch die HMBC-, HH-COSY- und NOESY-Spektren belegt werden.

- Die postulierte Ähnlichkeit zur Verbindung **P-4** wurde durch die im aromatischen Ring und in der Endkette beobachteten Kopplungen weiter unterstützt.

Letztendlich wurde die abgeleitete Struktur von **P-6** durch eine Synthese bestätigt (vgl. 4.1.4.1). Der IUPAC-Name dieser Verbindung lautet 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (**P-6**). Die Literaturrecherche ergab, dass es sich bei dieser Verbindung um einen neuen Naturstoff handelt, der bisher nur als Synthesebaustein, z.B. für die Darstellung von Statinen bekannt war <sup>113</sup>. Eine CAS-Recherche nach Stellungs-isomeren am aromatischen Ring ergab eine Reihe von Ergebnissen. Da alle gefundenen Verbindungen nur als Edukte bei organischen Synthesen aufgeführt werden, wurde auf eine eingehendere Beschreibung hier verzichtet.

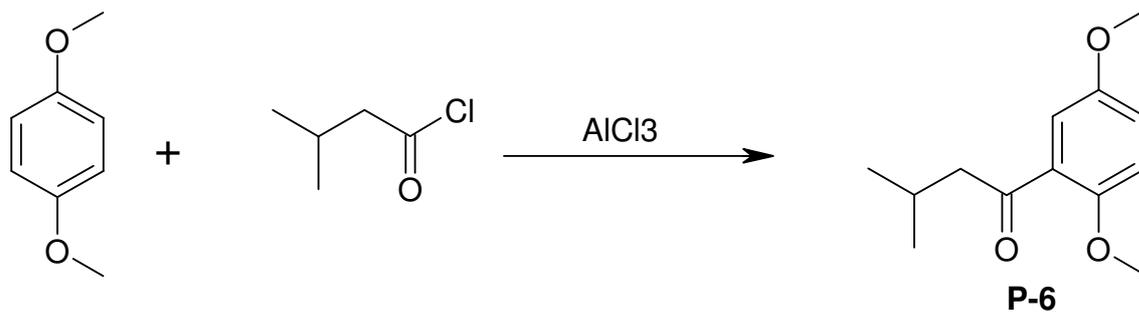
#### 4.1.4.1 Syntheseplanung für 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (**P-6**)

In der Struktur von 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on sind zwei Bereiche erkennbar. Der aromatische Teil leitet sich vom 1,4-Dimethoxybenzol und der 3-Methylbutan-1-on-Rest von der Isovaleriansäure ab.



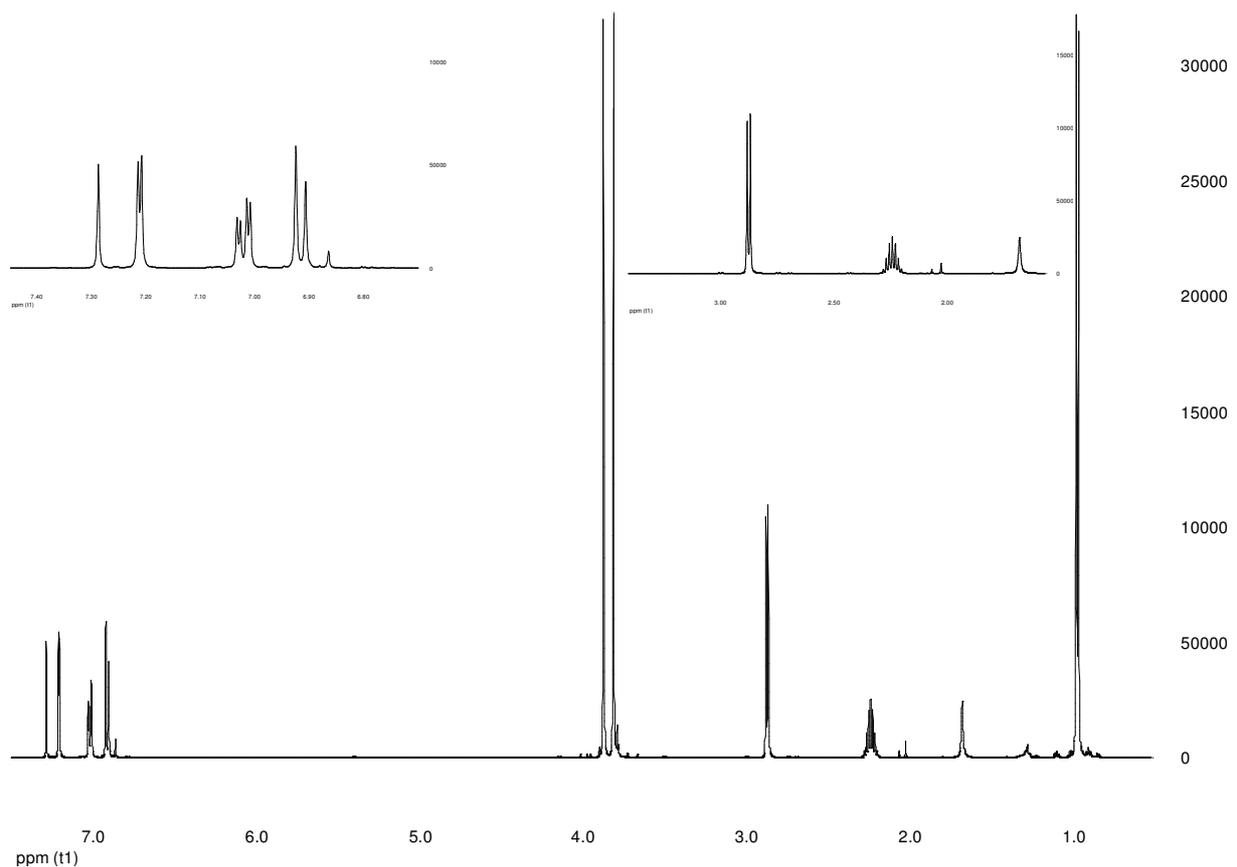
**Abb. 23: Retrosynthese von 1-(2,5-Dimethoxy-phenyl)-3-methylbutan-1-on (**P-6**).**

Als mögliche Synthese bietet sich die Friedel-Crafts-Acylierung <sup>114</sup> an, die von Bartram (1963) <sup>115</sup> für 2,5-Dimethoxyacetophenon beschrieben wird. Im vorliegenden Fall wird 1,4-Dimethoxybenzol mit Isovaleriansäurechlorid und Aluminiumchlorid umgesetzt. Somit resultiert für 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (**P-6**) das folgende Schema:



**Abb. 24: Synthese von 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (P-6).**

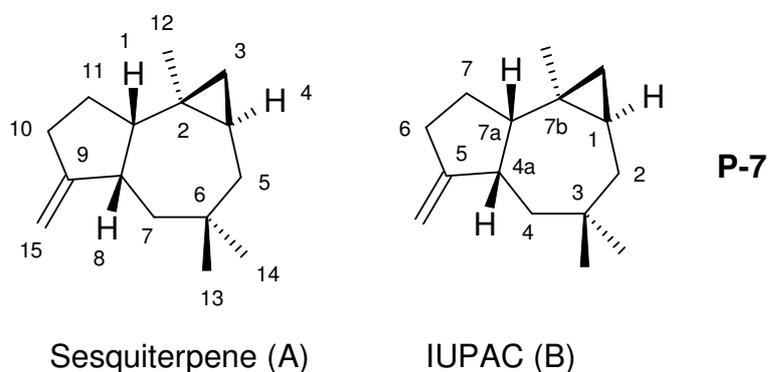
Die Durchführung dieser Synthese wird ausführlich in Kap. 7.2.2.4 beschrieben. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 25) und das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der synthetisierten Verbindung belegten die Identität dieser Substanz mit dem Naturstoff (P-6) (vgl. Abb. 25 und Abb. 22).



**Abb. 25:  $^1\text{H-NMR}$  von synthetischem 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (P-6) (500.13 MHz  $\text{CDCl}_3$ ).**

Mittels präparativer Gaschromatographie konnten flüchtige Verbindungen (Sesquiterpene) aus dem Dichlormethanextrakt des Baumpilzes *Phellinus robustus* isoliert werden.

**(1*R*\*, 4*aS*\*, 7*aS*\*, 7*bR*\*)-3,3,7*b*-Trimethyl-5-methylen-decahydrocyclopropa[*e*]azulen  
(*cis*-1,8-*epi*-9(15)-Africanen) (P-7)**



Wie aus der Abbildung (oben) und dem Namen hervorgeht, werden für Sesquiterpene zwei unterschiedliche Nummerierungssysteme<sup>117</sup> verwendet (A = Sesquiterpennomenklatur, B = IUPAC-Nomenklatur). In dieser Arbeit wird für die Atomzuordnung bei der Strukturaufklärungsbeschreibung ausschließlich die Nummerierung für Sesquiterpene (A) verwendet (auch bei weiteren isolierten Sesquiterpenen).

Die Komponente **P-7** wurde aus dem Dichlormethanextrakt des Eichenfeuerschwammes entsprechend dem in Abb. 13 dargestellten Trennungsgang isoliert (Sephadex LH-20 Fraktion 5 + 6).

Das chromatographische Verhalten dieser Verbindung deutet auf einen Kohlenwasserstoff hin. Das EI-Massenspektrum (vgl. Abb. 75 im Spektrenanhang) zeigt die typischen Fragmente eines Sesquiterpenkohlenwasserstoffes mit der Nominalmasse  $m/z$  204. Demnach kann eine Summenformel von  $C_{15}H_{24}$  vermutet werden, was durch die Auswertung der  $^{13}C$ -NMR-Pendant- und HMQC-Spektren bestätigt wird: es waren fünfzehn  $^{13}C$ -Signale und 24 Protonen nachweisbar. Die  $\delta$ -Werte der einzelnen C-Signale, ihre Multiplizität, sowie die entsprechenden  $^1H$ -NMR-Daten sind in Tab. 11 zusammengefaßt.

Nr.	<sup>13</sup> C-NMR (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) in ppm (vgl. Abb. 76) bei 100.13 MHz	C-Atom	Strukturelement	<sup>1</sup> H-NMR-Daten (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) in ppm bei 400.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	19.03 s	2	>C<	-	-
2	21.43 d	4	>CH-	1H, 0.52 m	-
3	21.97 t	3	-CH <sub>2</sub> -	2H, -0.05 t + 0.34 dd	<sup>2</sup> J <sub>H-3a/b</sub> = 4.13 <sup>3</sup> J <sub>H3b, H-5a</sub> = 8.16 <sup>2</sup> J <sub>H-3b/a</sub> = 4.43
4	22.81 q	12	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.86 s	-
5	26.78 t	11	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.67 + 1.84 m	-
6	29.68 q	13	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.88 s	-
7	31.63 q	14	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.99 s	-
8	33.48 t	10	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.38 m	-
9	34.00 s	6	>C<	-	-
10	42.37 t	5	-CH <sub>2</sub> -	2H, 0.81 d + 1.69 m	<sup>2</sup> J <sub>H-5b/a</sub> = 14.0
11	42.67 t	7	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.53-1.54 dd	<sup>3</sup> J <sub>H-7</sub> = 3.8 <sup>2</sup> J <sub>H-7, H-8</sub> = 13.6
12	43.5 d	8	>CH-	1H, 2.4-2.45 m	-
13	45.93 d	1	>CH-	1H, 1.66-1.71 m	-
14	103.87 t	15	=CH <sub>2</sub>	2H, 4.91 d + 4.98 d	<sup>2</sup> J <sub>15a,b</sub> = 1.69
15	158.59 s	9	>C=	-	-

**Tab. 11: Zuordnung der NMR-Signale von (1*R*\*, 4*aS*\*, 7*aS*\*, 7*bR*\*)-3,3,7*b*-Trimethyl-5-methylen-decahydrocyclopropa[e]azulen (Δ9(15)-Africanen) (P-7).**

Aus der Summenformel C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> folgt, dass das vorliegende Molekül vier Doppelbindungsäquivalente aufweisen muß. Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum läßt nur zwei olefinische C-Atome, nämlich C-15 (δ= 103.87 ppm, =CH<sub>2</sub>) und C-9 (158.59 ppm, >C=) erkennen, d.h. die Verbindung **P-7** besitzt nur eine Doppelbindung und damit drei Ringe.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 26) zeigt im olefinischen Bereich lediglich zwei Protonen (H-15a, δ= 4.98 ppm, d; H-15b, 4.91 ppm, d). Das isolierte Signal zwischen 2.38 und 2.45 ppm hat eine Multipllettstruktur und entspricht drei Protonen (H-8 und H-10). Den Bereich zwischen 1.52 und 1.87 ppm teilen sich sechs Protonen, die sich in zwei Multipletts und ein Doppeldublett aufspalten (H-1, H-5a, H-7, H-11). Zum höheren Feld hin folgen dann die drei Methylgruppen: H-14 (0.99 ppm, s); H-13 (0.88 ppm, s) und H-12 (0.86 ppm, s).

Im Bereich unter 0.6 ppm treten drei Signale auf: bei 0.52 ppm (H-4, m), bei 0.34 ppm (H-3a, q) und bei -0.05 ppm (H-3b, t). Diese bei niedriger Frequenz auftretenden Signale lassen eine Cyclopropanstruktur im Molekül vermuten.

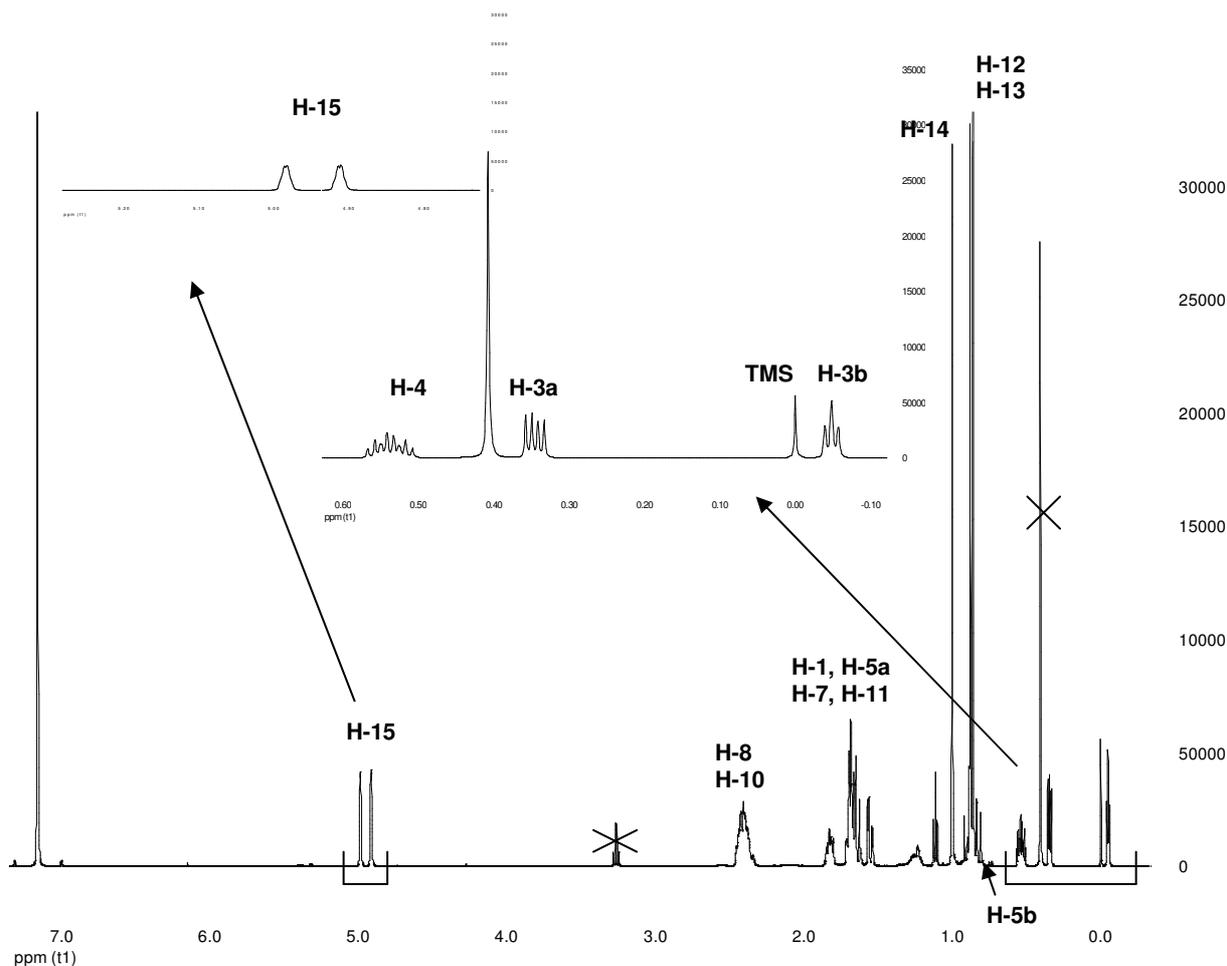
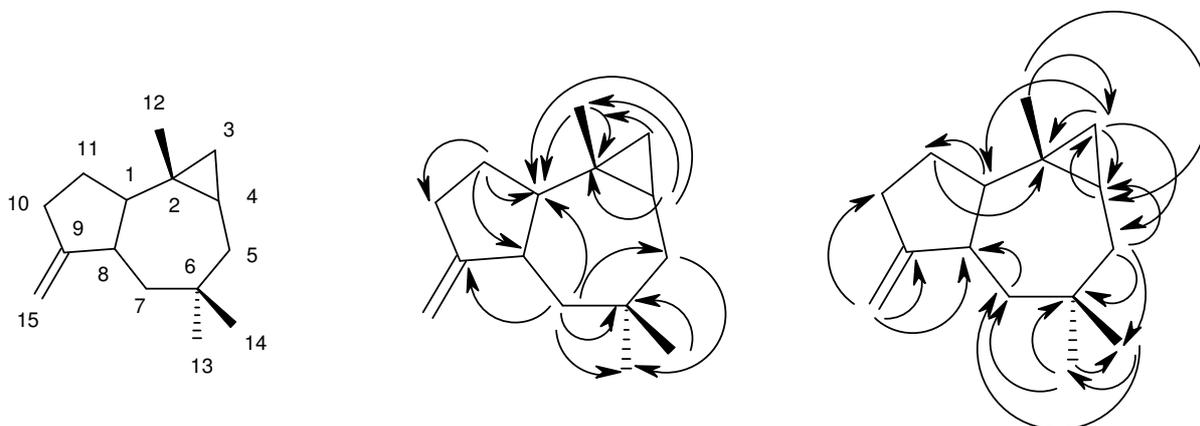


Abb. 26:  $^1\text{H-NMR}$  von  $(1R^*, 4aS^*, 7aS^*, 7bR^*)$ -3,3,7b-Trimethyl-5-methyldecahydrocyclopropa[e]azulen (500.13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

Eine detailliertere Strukturaufklärung erfolgte anhand von HMQC-, HMBC-, HH-COSY- und NOESY-Spektren.

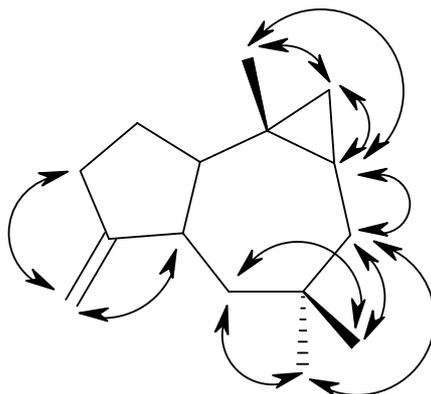
Die im Molekül zu registrierenden HMBC-Kopplungen sind im folgenden abgebildet; zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Kopplungspfeile auf zwei Skizzen verteilt:



Zum HMBC-Spektrum ist folgendes anzumerken:

- Die Kopplungen des Methinprotons H-1 sind nicht genau zuzuordnen, da dieses mit den Protonen der Methylengruppe H-11 überlagert. Aus diesem Grunde wurden in der Skizze diese Kopplungen teilweise nicht eingezeichnet.
- Gleiches gilt für das Proton der Methingruppe H-8 und die Protonen der Methylengruppe H-10; da auch diese sich im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum überlagern, lassen sich die von ihnen ausgehenden HMBC-Kopplungen nicht sicher zuordnen.
- Die Anwesenheit der schon nach den niedrigen  $\delta$ -Werten (-0.05 bis 0.52 ppm) im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum postulierten Cyclopropanstruktur konnte im HMBC-Spektrum bestätigt werden.

Im HH-COSY-Spektrum konnten die in der folgenden Formelübersicht gezeigten Kopplungen eindeutig etabliert werden:



Anmerkungen zum HH-COSY-Spektrum:

- Im Gegensatz zum HMBC-Spektrum konnten die Kopplungen von den Protonen der Methylengruppe H-15 eindeutig dem Bereich der Methingruppe H-8 und der Methylengruppe H-10 zugeordnet werden, da der beobachtete Crosspeak den gesamten Protonenbereich ( $\delta = 2.35$  bis  $2.47$  ppm) abdeckt.
- Auch im HH-COSY-Spektrum ließ sich die Existenz eines Cyclopropanrings untermauern. Das Aufspaltungsmuster des Dreispinsystems H-3<sub>a,b</sub>/H-4 kann angenähert als AMX-System interpretiert werden (vgl. Abb. 26):

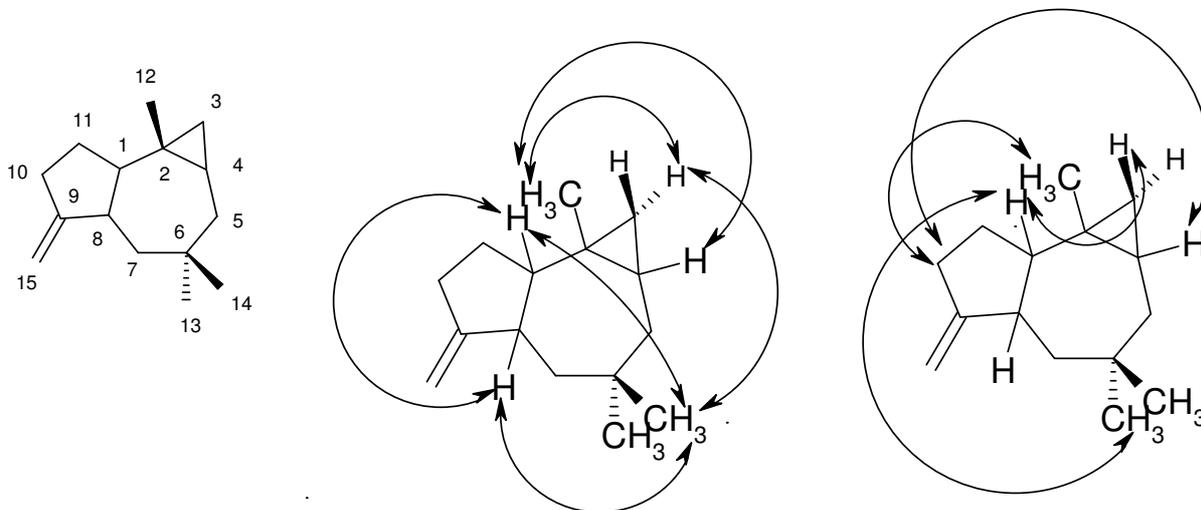
Das Protonensignal H-3a (0.34 ppm) ist zu einem Doppeldublett aufgespalten ( $^2J_{\text{H-3a,H-3b}} = 4.13$  Hz,  $^3J_{\text{H-3a,H-4}} = 8.16$  Hz). Das geminale Proton H-3b (-0.05 ppm) erscheint dagegen als Triplett, da die winkelabhängige vicinale Kopplung  $^3J_{\text{H-3b,H-4}}$  nur 4.43 Hz beträgt, sodass zwei Linien des Doppeldubletts zusammenfallen. Die sehr kleine geminale Kopplungskonstante von 4.13 Hz

(die nach Literaturangaben negativ ist) zwischen den Protonen H-3a und H-3b indiziert einen Cyclopropanring. Das Proton H-4 ist zu einem Multipllett aufgespalten (Kopplung mit H-3a, H-3b und H-5).

Literaturrecherchen ergaben, dass das Grundgerüst der Verbindung **P-7** unter dem Namen  $\Delta^9(15)$ -Africanen bekannt war. Dieses Sesquiterpen wurde bereits von *Kashman* et al. in dem maritimen Schwamm *Sinularia erecta* nachgewiesen<sup>116</sup>. Die von diesen Autoren angegebenen NMR-spektroskopischen Daten zeigten eine hohe Übereinstimmung mit denen der isolierten Verbindung **P-7**; auch das publizierte EI-Massenspektrum war mit denen von **P-7** identisch<sup>117</sup>.

Da bei Verbindung **P-7** Abweichungen in der chemischen Verschiebung einiger <sup>13</sup>C-NMR-Signale (C-1, C-7, C-8, C-13 und C-14, vgl. Tab. 11) im Vergleich zur zitierten Literatur registriert wurden, lag der Verdacht auf eine unterschiedliche Konfiguration im Bereich der Anellierung des Fünf- und Siebenrings nahe.

Zur Klärung der relativen Konfiguration wurde ein NOESY-Spektrum angefertigt. Die beobachteten NOE-Wechselwirkungen sind in der folgenden Sisse abgebildet:



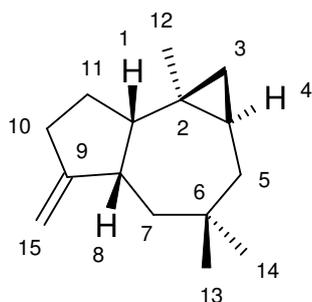
Zusammenfassend kann zu den beobachteten NOE-Wechselwirkungen folgendes angemerkt werden:

- Vom Methinproton H-8 konnte eine Wechselwirkung in den Protonenbereich des Protons H-1 nachgewiesen werden. Diese Wechselwirkung belegt die *cis*-Konfiguration der beiden Methinprotonen und damit eine *cis*-Verknüpfung des Fünf- und Siebenrings.

Es sei angemerkt, dass das Proton H-1 und die Protonen der Methylengruppe H-11 im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eine partielle Überlagerung zeigen, so dass in diesem Bereich die Zuordnungen nicht immer sicher getroffen werden können.

- Die relative Konfiguration am Cyclopropanring lässt sich aus der NOE-Wechselwirkung des H-3b-Protons mit H-1 ableiten, die eine *cis*-Stellung dieses Ringes zu H-1 belegt. Erwartungsgemäß zeigen entsprechend die Methylprotonen H-12 eine NOE-Korrelation mit den Methylenprotonen H-11, dem Methinproton H-4, sowie dem Methylenproton H-3a, nicht aber mit dem angulären Proton H-1.

Damit ist nachgewiesen, dass die aus den Fruchtkörpern des Baumpilzes *P. robustus* isolierte Verbindung **P-7** folgende relative Konfiguration aufweist:



Diese Verbindung trägt nach IUPAC die Bezeichnung  $1aR^*$ ,  $4aS^*$ ,  $7aS^*$ ,  $7bR^*$ -3,3,7b-Trimethyl-5-methyldecahydrocyclopropa[e]azulen. Der isolierte Sesquiterpenkohlenwasserstoff **P-7** stellt einen neuen Naturstoff dar.

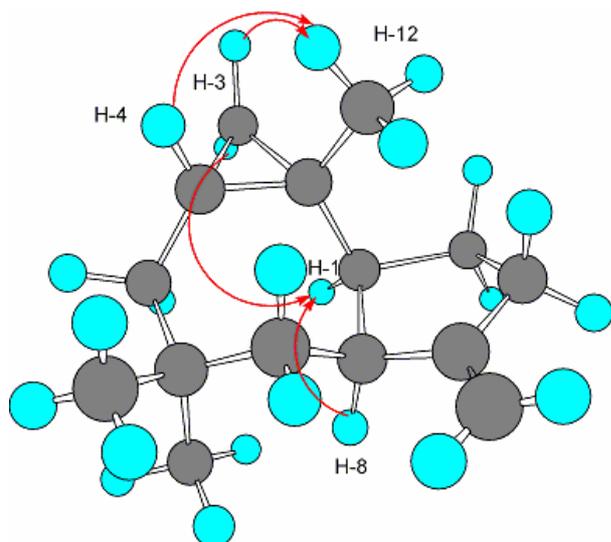
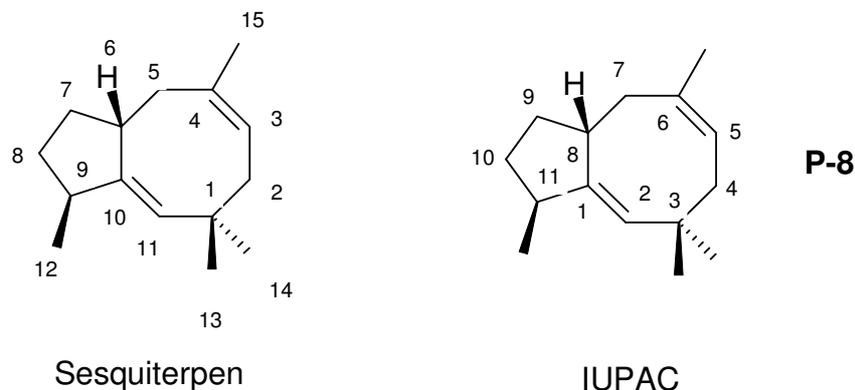


Abb. 27: Neues Isomer des Africanens (rote Pfeile zeigen wichtige NOE-Wechselwirkungen).

**3,3,6,11-Tetramethylbicyclo[6.3.0]undeca-1,5-dien  
(*cis*-*epi*-Precapnelladien) (P-8)**



Die Verbindung **P-8** wurde entsprechend des in Abb. 13 gezeigten Trennungsgangs aus dem Dichlormethanextrakt des Baumpilzes *Phellinus robustus* isoliert (Sephadex LH-20 Fraktion 5 + 6). Das chromatographische Laufverhalten dieser Substanz deutete auf das Vorliegen eines Kohlenwasserstoffes hin.

Das EI-Massenspektrum (vgl. Abb. 77 im Spektrenanhang) läßt einen Molekülpeak von  $m/z$  204 vermuten und weist eine ganze Reihe typischer Sesquiterpenkohlenwasserstoffionen auf, sodass eine Summenformel  $C_{15}H_{24}$  postuliert werden kann.

Die molekulare Zusammensetzung wird durch die Auswertung des  $^{13}C$ -NMR-Pendant- (vgl. Abb. 78 im Spektrenanhang) und des HMQC-Spektrums bestätigt: Es waren fünfzehn Kohlenstoffsignale und die dazugehörige Anzahl von 24 Protonen

nachweisbar. Die  $\delta$ -Werte der einzelnen C-Signale, ihre Multiplizität und die entsprechenden  $^1\text{H-NMR}$ -Daten sind in Tab. 12 aufgeführt.

Aus der Summenformel  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$  leitet sich für die vorliegende Verbindung **P-8** eine Anzahl von vier Doppelbindungsäquivalenten ab. Das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum läßt vier olefinische C-Atome ( $\delta = 122.5, \text{d}; 131.0, \text{d}; 135.8, \text{s}; 145.9, \text{s}$ ) erkennen und belegt damit das Vorliegen von zwei Doppelbindungen und daraus folgend zwei Ringen.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 28) zeigt im olefinischen Bereich zwei Protonen (H-3, 5.44, t; H-11,  $\delta = 5.16$  ppm, d). Im mittleren  $\delta$ -Abschnitt von 2.21 bis 3.5 ppm sind die Signale von vier Protonen sichtbar (H-6,  $\delta = 3.47$  ppm, m; H-2a, 2.97, dd; H-9, 2.43, m; H-5a, 2.25, dd). Zwischen  $\delta = 1.13$  und 1.74 ppm ist eine Reihe von Multipletts und ein Singulett erkennbar, die einer Anzahl von 9 Protonen entsprechen (H-2b, H-5b, H-7, H-8 und H-15 (H-15,  $\delta = 1.64$ , s,  $-\text{CH}_3$ ). Zum höheren Feld folgen dann drei Methylgruppen: H-13, H-14 (1.06 ppm, s) und H-12 (1.1 ppm, d).

Nr.	$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) in ppm bei 100.13 MHz	C-Atom	Strukturelement	$^1\text{H-NMR}$ -Daten ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) in ppm bei 500.12 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	22.6 q	12	$-\text{CH}_3$	3H, 1.1 d	$^3J_{\text{H-12,H-9}} = 6.8$ Hz
2	27.2 q	15	$-\text{CH}_3$	3H, 1.64 s	
3	30.3 q	13 + 14	2x $\text{CH}_3$	6H, 1.06 s	
4	31.9 t	7	$-\text{CH}_2-$	2H, 1.18 m 1.67 m	
5	34.2 t	8	$-\text{CH}_2-$	2H, 1.3 m 1.6 m	
6	39.2 s	1	$>\text{C}<$		
7	39.3 t	2	$-\text{CH}_2-$	H-2b, 1.62 überlagert H-2a, 2.97 dd	$^2J_{\text{H-2a,b}} = 13.6$ Hz + $^3J_{\text{H-2a,H-3}} = 9.4$ Hz
8	39.5 d	6	$>\text{CH}-$	1H, 3.47 m	
9	41.1 d	9	$>\text{CH}-$	1H, 2.43 m	
10	42.9 t	5	$-\text{CH}_2-$	H-5b, 1.72 überlagert H-5a, 2.25 dd	$^2J_{\text{H-5a,5b}} = 17.7$ Hz $^3J_{\text{H-5,H-6}} = 4.6$ Hz
11	122.5 d	3	$=\text{CH}-$	1H, 5.44 t	$^3J_{\text{H-3,H-2a}} = 9.4$ Hz, $^3J_{\text{H-3,H-2b}} = 7.2$ Hz
12	131.0 d	11	$=\text{CH}-$	1H, 5.16 d	
13	135.8 s	4	$>\text{C}=\text{C}$		
14	145.9 s	10	$>\text{C}=\text{C}$		

Tab. 12: Zuordnung der NMR-Signale von Precapnelladien (P-8).

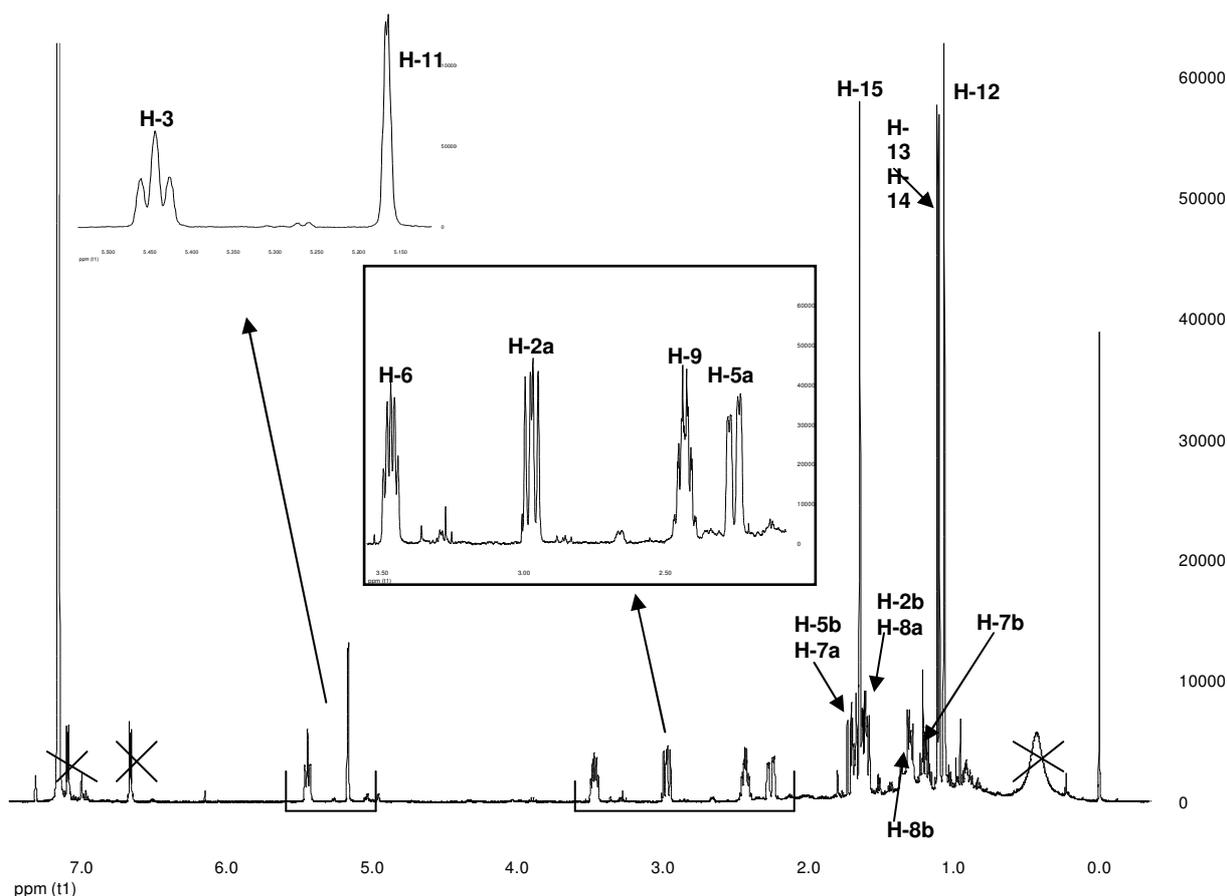


Abb. 28:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Precapnelladien (P-8) (500.13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

Anmerkungen zum  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum:

- H-2: Hierbei handelt es sich um zwei nicht-äquivalente Protonen, H-2a ( $\delta = 2.97$  ppm) und H-2b (1.62 ppm). Das Proton H-2a ist zu einem Doppeldublett aufgespalten, bedingt durch eine große geminale Kopplung  $^2J_{\text{H-2a/b}} = 13.6$  Hz und eine vicinale Kopplung  $^3J_{\text{H-2a/b}} = 9.4$  Hz. Diese Verhältnisse sind beim Proton H-2b nicht so gut zu erkennen, da hier eine Überlagerung mit dem Proton H-8a vorliegt.

Der relativ große Wert der geminalen Kopplung erklärt sich durch die Nachbarschaft einer Doppelbindung zu H-2a,b und die Tatsache, dass im Molekülmodell eine der C-H-Bindungen parallel zu den  $\pi$ -Orbitalen steht.

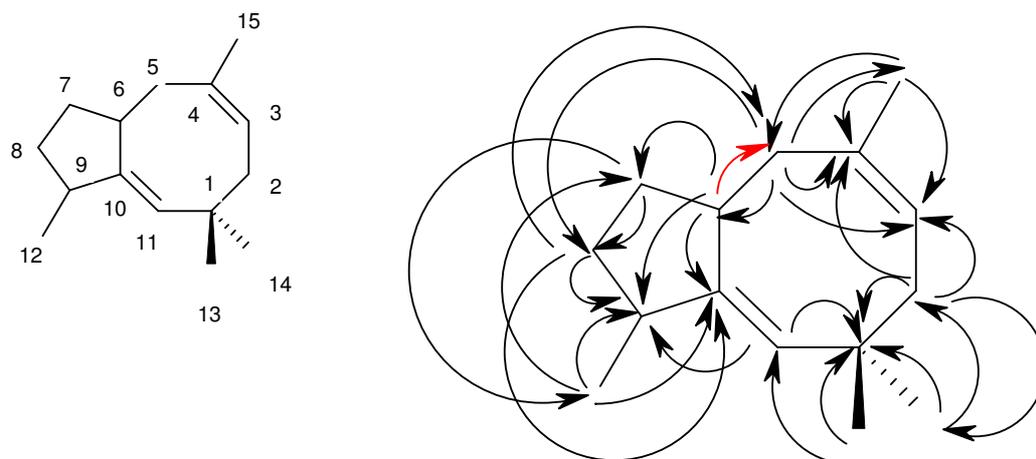
- H-3: Diese olefinische Proton ist scheinbar zu einem Triplet aufgespalten; in Wirklichkeit handelt es sich jedoch um ein Doppeldublett, da das Dreispinsystem H-2<sub>a,b</sub>/H-3 angenähert einem AMX-System entspricht, bei dem es zu einer Überlagerung der mittleren Linien kommt. H-3 koppelt mit H-2a

( $^3J_{H-3, H-2a} = 9.4 \text{ Hz}$ ) und H2b ( $^3J_{H-3, H-2b} = 7.2 \text{ Hz}$ ); die Winkelabhängigkeit der vicinalen Kopplung führt zu unterschiedlich großen Kopplungskonstanten.

- H-5: Auch die beiden Protonen dieser Methylengruppe sind nicht äquivalent (H-5a, 2.25 ppm; H-5b, 1.72 ppm). Das isoliert liegende Proton H-5a ist zu einem Doppeldublett aufgespalten:  $^2J_{H-5a,5b} = 17.7 \text{ Hz}$  und  $^3J_{H-5a, H-6} = 4.6 \text{ Hz}$ , während das Signal von Proton H-5b (1.72 ppm) partiell durch das Methylenproton H-7a überlagert wird.
- Die Aufspaltung des H-11-Signales (olefinisches Proton) ist vermutlich auf eine allylische Kopplung (H-6/H-9) zurückzuführen; entsprechende Korrelationen sind im HH-COSY (vgl. Skizze) nachweisbar.

Eine detaillierte Strukturaufklärung erfolgte anhand von HMQC-, HMBC-, HH-COSY und NOESY-Spektren.

Die im Molekül zu registrierenden HMBC-Kopplungen sind in der folgenden Skizze abgebildet:

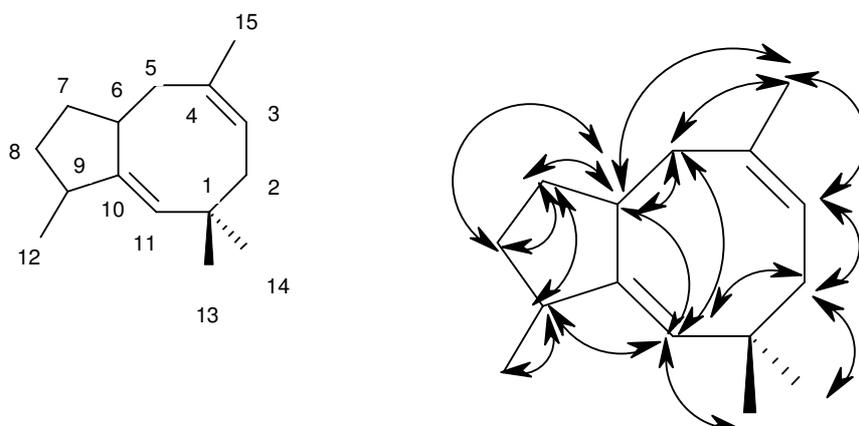


Bei der Auswertung des HMBC-Spektrums konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

- Der quartäre olefinische Kohlenstoff C-10 koppelt nicht mit den Methinprotonen H-6 und H-11.
- Die rot gekennzeichnete Kopplung zwischen dem Methinproton H-6 und dem Kohlenstoff C-5 ist nur sehr schwach ausgeprägt und damit nicht sicher belegbar.
- Die Protonen H-3 und H-9 zeigen im HMBC-Spektrum keine verwertbaren Signale.

- Die Protonen der Methylgruppen H-13/H14 zeigen im HMBC einen Crosspeak im Bereich der Kohlenstoffe C-1 und C-2. Die genaue Zuordnung ist nicht möglich, da die betreffenden Kohlenstoffe sehr dicht zusammen liegen; vermutlich werden jedoch beide C-Atome gesehen.
- Die Methylenprotonen H-7a,b wiesen keine Kopplungen zum benachbarten tertiären Kohlenstoff C-6 auf.

Im HH-COSY-Spektrum konnten die in der folgenden Übersicht dargestellten Kopplungen nachgewiesen werden:

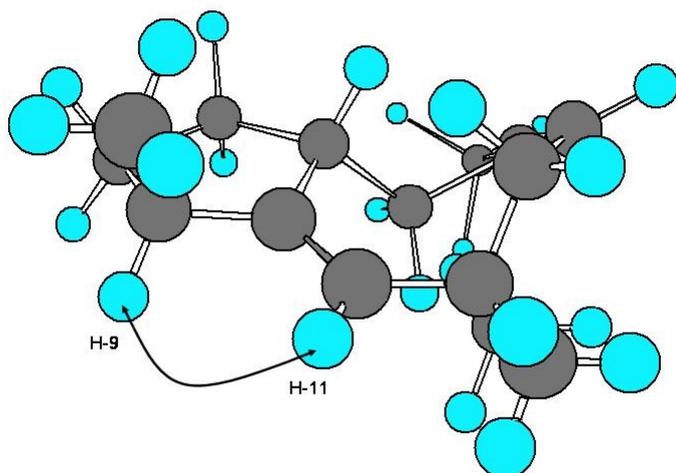


Die beobachteten Kopplungen im HH-COSY-Spektrum unterstützten die bisher abgeleitete Struktur der Komponente **P-8**.

Eine Literaturrecherche über diese aus dem Pilz *P. robustus* isolierten Substanz ergab, dass es sich dabei um das bekannte Sesquiterpen Precapnelladien handelt, welches aus der Korallenart *Capnella imbricata* isoliert worden ist. Als Inhaltsstoff in Pilzen wurde der Stoff hier zum ersten Mal nachgewiesen.

Ein Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopischen Daten mit Literaturwerten <sup>118</sup> ergab ein hohes Maß an Übereinstimmung und legt somit die Identität von **P-8** mit diesem Sesquiterpenkohlenwasserstoff nahe.

Dies gilt zum Teil auch für die Stereochemie dieses Moleküls; insbesondere die Tatsache, dass H-11 lediglich mit dem Proton H-9, nicht aber mit den Methylprotonen H-12 in Dipol-Dipol-Wechselwirkung tritt (vgl. Skizze), unterstützt die in der Literatur für Epiprecapnelladien angegebenen Konfiguration am C-9. Auch die hohe Übereinstimmung in der chemischen Verschiebung dieser entsprechenden C-Atome belegt diesen Sachverhalt.

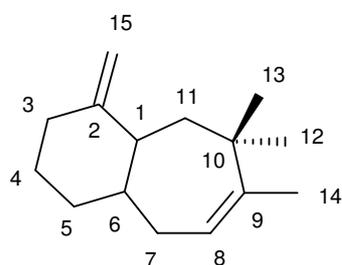


**Abb. 29:** Veranschaulichung der NOE-Wechselwirkung zwischen H-9 und H-11, die die Stereochemie der Ringverknüpfung bei Epiprecapnelladien belegt.

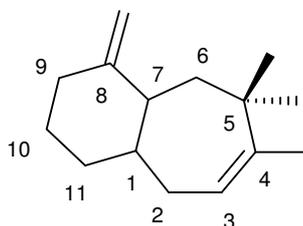
Die relative Konfiguration am C-Atom 6 läßt sich dagegen aus dem NOESY-Spektrum nicht ableiten. Der fast identische  $\delta$ -Wert fürs C-Atom mit Literaturangaben<sup>118</sup> (39.5 ppm/39.6 ppm) legt jedoch hier die gleiche Konfiguration wie beim Epiprecapnelladien nahe.

Auch die NMR-spektroskopischen Daten dieser Verbindung aus zwei weiteren Literaturquellen<sup>119, 120</sup> belegen eine gute Übereinstimmung mit den Messwerten der Verbindung **P-8**; einige Abweichungen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Verwendung eines anderen deuterierten Lösungsmittels ( $\text{CDCl}_3$ ) zurückzuführen.

#### 4,5,5-Trimethyl-8-methylenbicyclo[5.4.0]undec-3-en (**P-9**)



Sesquiterpen-Nomenklatur



IUPAC

**P-9**

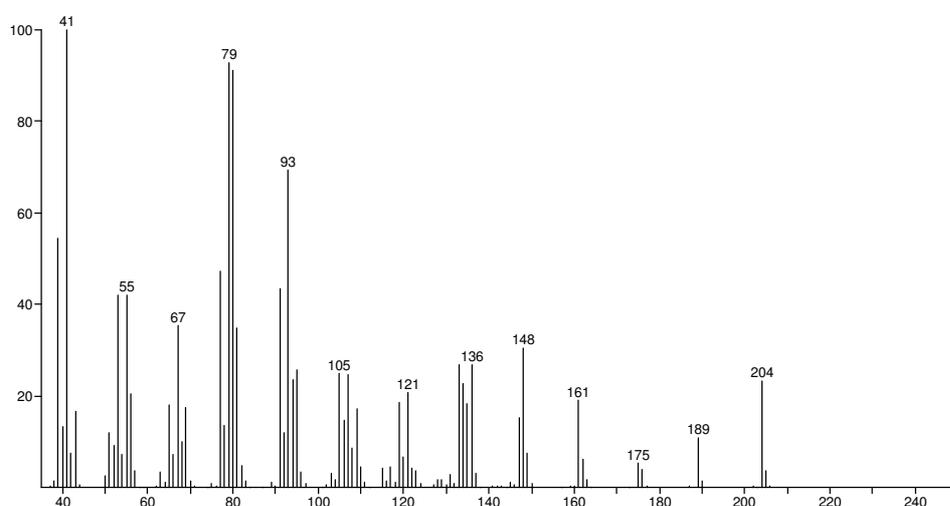
Die hier beschriebene Verbindung **P-9** wurde, wie die beiden vorherigen Substanzen **P-7** und **P-8**, mittels präparativer Gaschromatographie aus derselben

Dichlormethanextrakt-Fraktion des Baumpilzes *Phellinus robustus* isoliert (Sephadex LH-20 Fraktion 5+6, Kieselgel mit n-Hexan Fraktion 1, vgl. Schema Abb. 13).

Das bei dieser Trennung beobachtete chromatographische Verhalten der Verbindung **P-9** deutet auf einen Kohlenwasserstoff hin.

Sein EI-Massenspektrum (Abb. 30) weist hinsichtlich der Fragmentmassen den typischen Habitus eines Sesquiterpens auf. Zu vermuten ist deshalb, dass es sich hierbei um einen Sesquiterpenkohlenwasserstoff mit der Molmasse  $m/z$  204 handelt. Die entsprechende Summenformel  $C_{15}H_{24}$  konnte durch HR-MS-Messung bestätigt werden (Abweichung 0,7 mmu). Damit sind dieser Verbindung vier Doppelbindungsäquivalente zuzuordnen.

Die Auswertung des  $^{13}C$ -Pendant- (vgl. Abb. 79 im Spektrenanhang) und HMQC-Spektrums ergab eine Anzahl von vierzehn Kohlenstoffsignalen und 23 Protonen. Aus diesen NMR-spektroskopischen Daten resultiert eine Differenz von einem Kohlenstoffatom und einem Proton zur postulierten Summenformel von  $C_{15}H_{24}$ . Die  $\delta$ -Werte der einzelnen C-Signale, ihre Multiplizität, sowie die entsprechenden  $^1H$ -NMR-Daten sind Tab. 13 aufgeführt.



**Abb. 30:** EI-Massenspektrum von 4,5,5-Trimethyl-8-methylenbicyclo[5.4.0]undec-3-en (P-9).

Nr.	<sup>13</sup> C-NMR (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) in ppm bei 100.13 MHz	C-Atom	Strukturelement	<sup>1</sup> H-NMR-Daten (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) in ppm bei 400.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	25.1 q	14	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.65 s	-
2	27.3 q	13	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.96 s	-
3	31.24 t	5	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.33 + 1.54 m	-
4	30.85 t	3	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.23 m	-
5	31.27 t	4	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.33 br m	-
6	33 t	11	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.19 d+ 1.71 m	<sup>2</sup> J <sub>H-11b, H-11a</sub> = 14.3
7	33.8 q	12	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.9 s	-
8	36.5 s	10	>C<	-	-
9	40.17 t	7	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.91 br m	-
10	43.8 d	1	>CH-	1H, 2.56 t	<sup>3</sup> J <sub>H-1, H-11</sub> = 8.3
11	104.9 t	15	=CH <sub>2</sub>	H-15a, 4.94, br s H-15b, 4.92, br s	<sup>2</sup> J <sub>H-15a,b</sub> ≈ 2.2
12	121.9 d	8	=CH-	1H, 5.36 t	<sup>3</sup> J <sub>H-8, H-7a,b</sub> = 8.0
13	138.8 s	9	=C<	-	-
14	159.57 s	2	=C<	-	-

**Tab. 13: Zuordnung der NMR-Signale von 4,5,5-Trimethyl-8-methylenbicyclo[5.4.0]undec-3-en (P-9).**

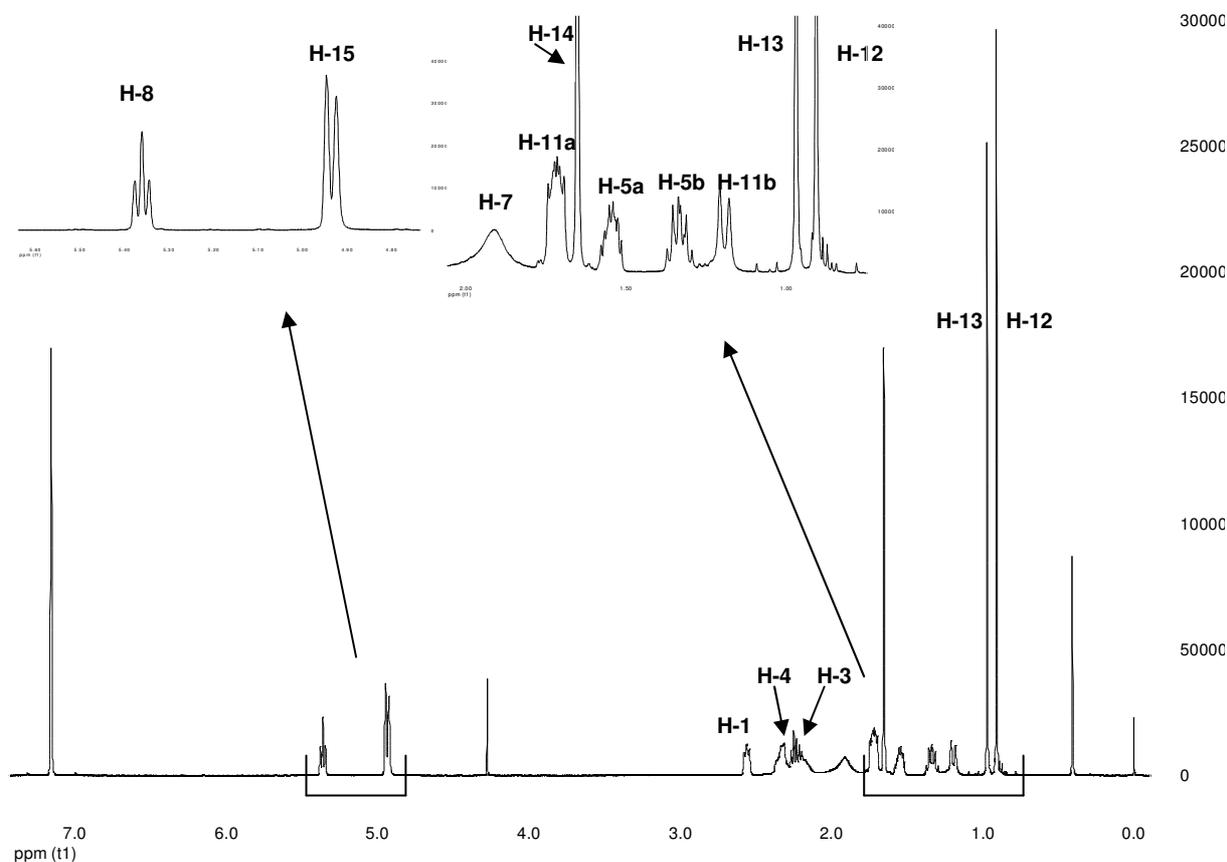
Legt man die aus der HR-MS erhaltene Summenformel von C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> zugrunde, muß das vorliegende Molekül vier Doppelbindungsäquivalente besitzen. Da das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum im olefinischen δ-Bereich vier Kohlenstoffe (δ= 104.9 ppm, t, =CH<sub>2</sub>, C-15; 121.9, d, C-8; 138.8, s, C-9; 159.57, s, C-2) aufweist, muß das Molekül zwei Doppelbindungen und zwei Ringe enthalten.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 31) zeigt im olefinischen Bereich drei Protonen (H-8, H-15a,b). Das Proton H-8 (δ=5.36, t) kann als Teil eines Dreispinsystems vom Typ AK<sub>2</sub> (Δ<sub>VH-8/H-7</sub>=40.6 Hz ≈ 5J<sub>H-8,H-7</sub>; <sup>3</sup>J<sub>H-8,H-7</sub> = 8.0 Hz) interpretiert werden. Dabei sind die beiden mittleren Linien des eigentlichen Quartetts zusammengefallen. Die beiden Protonen H-7 (1.91 ppm; entsprechen dem K<sub>2</sub>-Teil) weisen ein breites, unaufgelöstes Singulett auf und lassen keinerlei Kopplungskonstante erkennen.

Die beiden Protonen der exocyclischen Methylengruppe (H-15a,b, δ = 4.94 bzw. 4.92 ppm) treten mit jeweils einem breiten Singulettsignal auf, in welchem sich eine geminale Kopplung (<sup>2</sup>J<sub>H-15a,b</sub>) von etwa 2.2 Hz verbirgt.

Bei δ = 2.56 ppm erscheint ein breites, triplettartiges Signal des Protons H-1, das sowohl mit den beiden vicinalen Protonen H-11b und evtl. auch H-11a bzw. H-6 (vgl. Diskussion des NOESY-Spektrums) koppelt, als auch mit den entfernter liegenden Kernen H-3 und H-15. Die zum höheren Feld hin anschließenden beiden Signale

der Methylengruppen H-4 (2.33 ppm, br m) und H-3 (2.23 ppm, m) sind wenig aussagefähig.



**Abb. 31:**  $^1\text{H-NMR}$  von 4,5,5-Trimethyl-8-methylenbicyclo[5.4.0]undec-3-en (P-9) (500.13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

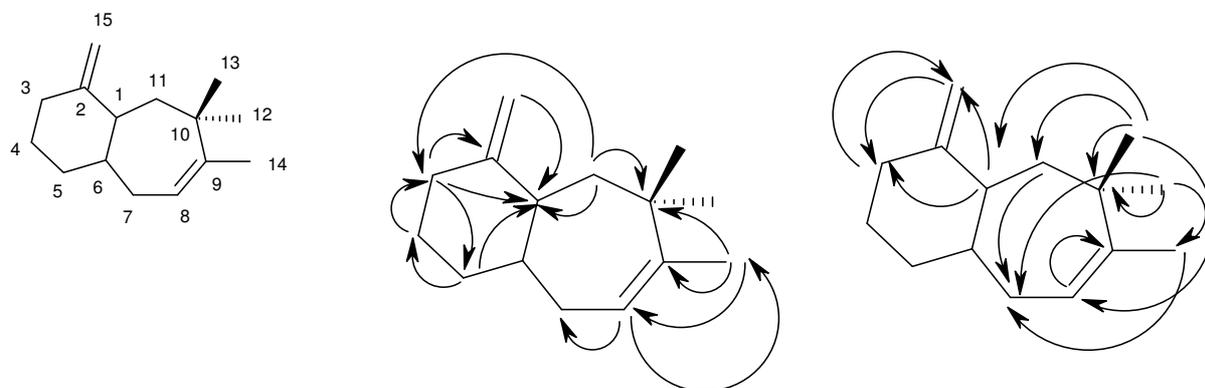
Vermutlich bedingt durch den Anisotropie-Effekt der Doppelbindung C-2/C-15 sind die beiden Protonen H-11a und H-11b bei deutlich unterschiedlichen  $\delta$ -Werten lokalisiert (1.71 und 1.19 ppm). H-11a erscheint als Multiplett (Kopplung mit H-11b (gem), H-1 (vic) und H-3 (long range)) und ist zudem von einem Proton unterlagert, welches sich keinem C-Signal sicher zuordnen lässt (H-6). Das geminale H-11b-Proton manifestiert sich dagegen als Dublett ( $2J_{\text{H-11a,b}} = 14.3$  Hz).

Auch die beiden Protonen H-5a und H-5b sind nicht äquivalent und erscheinen bei verschiedenen chemischen Verschiebungen (1.54 und 1.33 ppm) als Multipletts.

Letztendlich fallen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dieser Verbindung noch die scharfen Singulettssignale von drei, an quartären C-Atomen positionierten, Methylgruppen auf: H-14 ( $\delta = 1.65$  ppm), H-13 (0.96 ppm) und H-12 (0.9 ppm).

Eine detaillierte Strukturaufklärung erfolgte anhand von HMQC-, HMBC-, HH-COSY- und NOESY-Spektren.

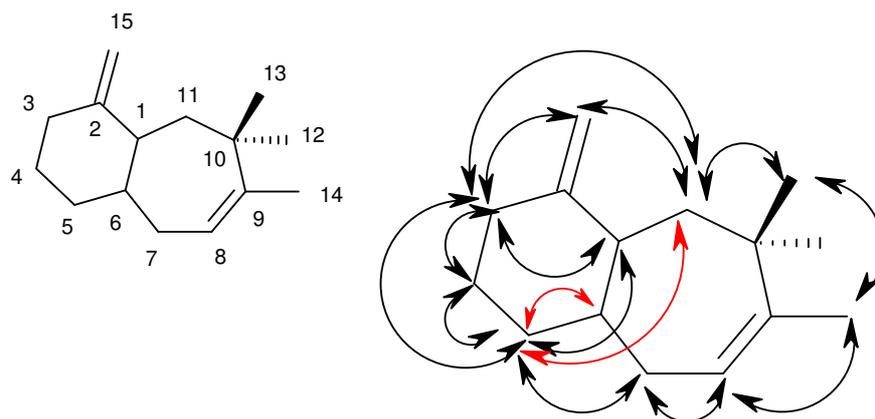
Die bei dieser Verbindung **P-9** registrierten HMBC-Kopplungen sind in den folgenden Skizzen abgebildet:



Zum HMBC-Spektrum ist folgendes anzumerken:

- Die olefinischen Methylenprotonen H-15 koppeln nicht mit dem quartären olefinischen Kohlenstoff C-2.
- Die Protonen der Methylengruppe H-7 zeigen im HMBC-Spektrum keine verwertbaren Kopplungen.
- Das Methinproton H-1 weist keine Kopplungen zu den Nachbarkohlenstoffen C-2 und C-11 auf.
- Die Protonen der Methylengruppe H-4 weisen nur eine Koppelung zum Kohlenstoffatom C-3 auf.
- Die Signalposition des Methinkohlenstoffs C-6 konnte im HMBC nicht belegt werden, da kein fünfzehntes C-Signal im Spektrum detektierbar war und keine H-Kopplungen auftraten, die auf die Existenz eines weiteren C-Atoms hindeuteten. Als Nachweis für eine Ringanellierung über die Methingruppe C-6 kann die Kopplung von H-5 zu C-1 angesehen werden und evtl. auch die Kopplung von H-11 zu C-7.

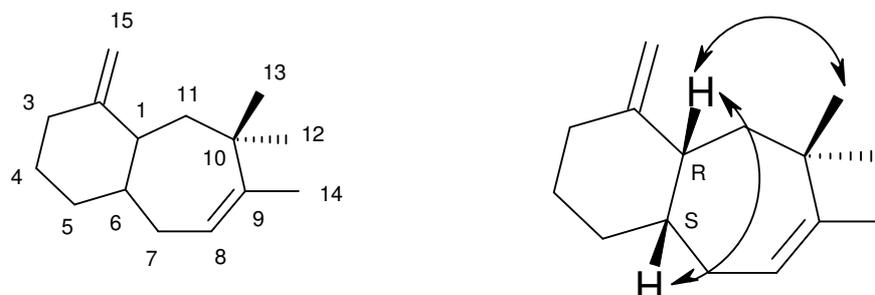
Im HH-COSY-Spektrum wurden die in der folgenden Formelübersicht gezeigten Spin, Spin-Kopplungen nachgewiesen:



Die beobachteten HH-Kopplungen unterstützen den postulierten Strukturvorschlag für die Verbindung (**P-9**). Dazu sind folgende Anmerkungen zumachen:

- Die Ringanellierung über die nicht sicher nachweisbare Methingruppe –C/H-6 ließ sich im HH-COSY über die Kopplung H-5/H-7 weiter erhärten. Diese wird auch unterstützt durch das Vorliegen einer Kopplung H-5/H-6 bzw. H-11a. Diese beiden Kopplungen sind in der Zeichnung als Möglichkeiten durch rote Pfeile dargestellt, da sich die Protonen H-11a und H-6 überlagern und so nicht sicher zu entscheiden ist, mit wem H-5 koppelt. Auch die nachgewiesene Longrange-Kopplung H-5/H-1 untermauert diese Ringverknüpfung.
- Der sichere Nachweis irgendeiner Kopplung mit dem Proton H-6 bzw. die Identifizierung von Kopplungspartnern dieses Protons läßt sich auch aus dem COSY-Spektrum nicht ableiten.

Zur Überprüfung der abgeleiteten Struktur und Determinierung der Stereochemie wurden die NOE-Experimente ausgewertet. Die wichtigsten Wechselwirkungen sind in folgender Skizze veranschaulicht:



Für die Abklärung der Stereochemie ist entscheidend, dass das Proton H-1 im NOE-Experiment eine Wechselwirkung mit den Methylprotonen am C-13 erkennen lässt. Dieses ist im Molekülmodell nur so darstellbar, dass H-1 dann mit den beiden H-11-Methylenprotonen nicht in Wechselwirkung treten kann. Damit ist festgelegt, dass der beobachtete NOE-Effekt von H-1 in den Bereich der Protonen H-11a/H-6 ( $\delta = 1.71$  ppm) das Proton H-6 betrifft.

Dies hat zur Konsequenz, dass die Protonen H-1 und H-6 *cis*-ständig stehen, d.h. eine *cis*-Konfiguration vorliegt. Somit lässt sich die relative Konfiguration an den beiden chiralen C-Atomen C-1 und C-6 bestimmen.

Die Literaturrecherche ergab, dass es sich bei dieser aus dem Dichlormethanextrakt von *P. robustus* isolierten Verbindung 4,5,5-Trimethyl-8-methylenbicyclo[5.4.0]undec-3-en [ $1S^*$ ,  $7R^*$ ] (**P-9**) um einen neuen Naturstoff handelt, für den hier der Trivialname Phellinogen A vorgeschlagen wird.

## 4.2 Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Heterobasidion annosum*

Das Wasserdampfdestillat des Baumpilzes *Heterobasidion annosum* wurde von Sievers<sup>141</sup> mittels GC und GC-MS untersucht. Bei der Betrachtung der im Destillat nachgewiesenen Verbindungen, zeigte sich, dass eine Reihe dieser Komponenten nicht über Datenbankrecherchen zu identifizieren waren. Hier lag deshalb der Verdacht nahe, dass es sich um neue Naturstoffe handeln könnte. Um die Identitäten dieser Komponenten zu klären, sollten diese isoliert und mittels NMR-spektroskopischer Verfahren in ihrer Struktur aufgeklärt werden.

### 4.2.1 Aufarbeitung von *Heterobasidion annosum*

Die aufgetauten Fruchtkörper von *Heterobasidion annosum* wurden mechanisch vorzerkleinert und anschließend in flüssigen Stickstoff zu Pulver zerstoßen. Das so zerkleinerte Probenmaterial wurde 3,5 h lang einer Wasserdampfdestillation mit n-Pentan als Vorlage unterzogen.

## 4.2.2 Auftrennung des Wasserdampfdestillates

Gaschromatographische und GC-MS- Untersuchungen dieser flüchtigen Verbindungen ließen neben bekannten terpenoiden Verbindungen, Aldehyden, Alkoholen und Ketonen auch eine Reihe von unbekanntem oxigenierten Sesquiterpenen erkennen. Um diese flüchtigen Verbindungen zu isolieren, wurde das Gemisch säulenchromatographisch an Kieselgel mit n-Pentan und n-Pentan / Diethylether-Gradienten getrennt. Aus den hierbei erhaltenen Fraktionen wurden nach Überprüfung mittels GC und GC-MS am präparativen Kapillar-GC Reinsubstanzen isoliert. Zeigten die Gaschromatogramme eine ausreichende Reinheit und Konzentration der isolierten Substanzen, wurden  $^1\text{H-NMR}$ -,  $^{13}\text{C-NMR}$ -, HH-COSY-, HMBC- und NOESY-Spektren angefertigt.

Eine Übersicht der durchgeführten Auftrennungs- und Isolationschritte ist in den folgenden Schemata wiedergegeben (vgl. Abb. 32, Abb. 33 und Kap. 7.3).

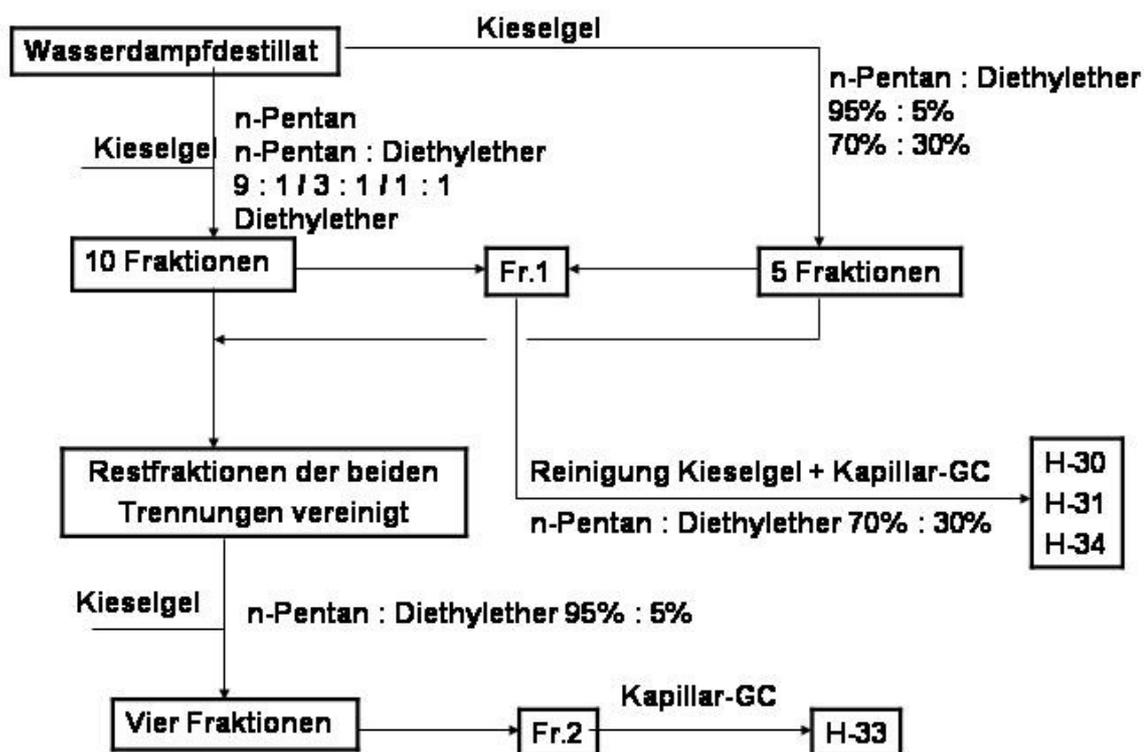


Abb. 32: Auftrennungsschema des Wasserdampfdestillates von *Heterobasidion annosum*  
1. Teil.

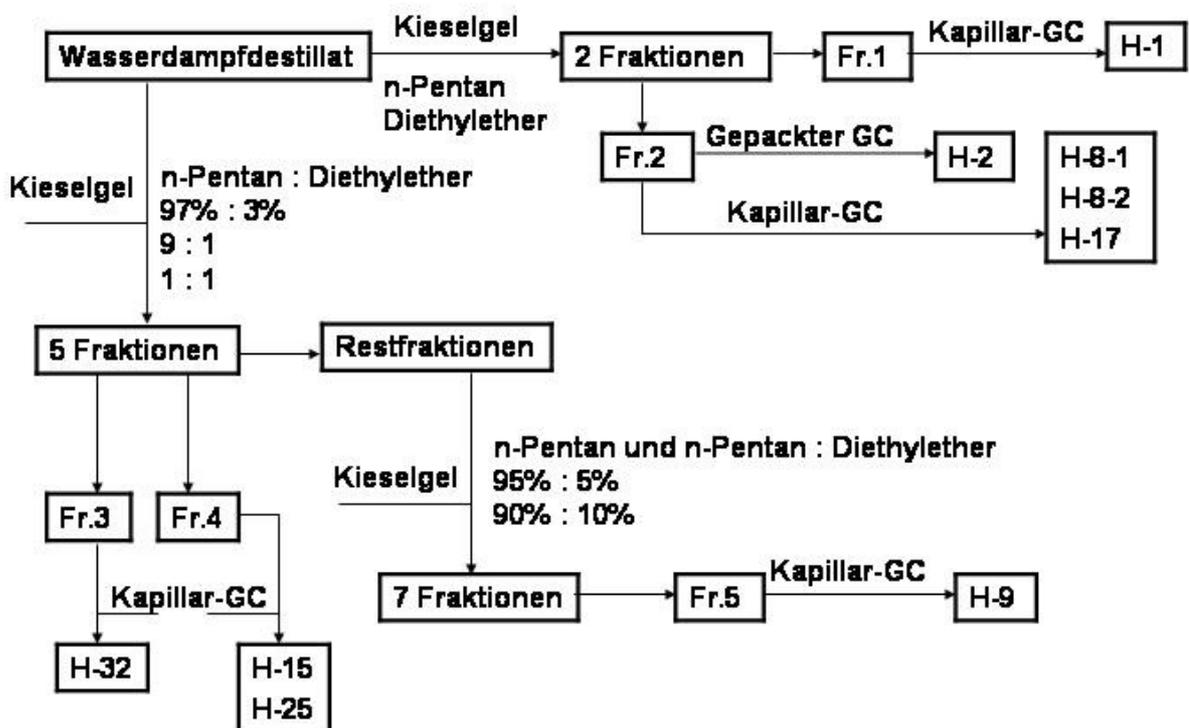


Abb. 33: Auftrennungsschema des Wasserdampfdestillates von *Heterobasidion annosum*  
2. Teil.

#### 4.2.3 Inhaltsstoffe aus dem Wasserdampfdestillat

Die Ergebnisse der Analyse der wasserdampflichen Verbindungen von *Heterobasidion annosum* sind in Abb. 34 und Tab. 14 dargestellt und lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Der Baumpilz *Heterobasidion annosum* produziert geringe Mengen (0,03% / 0,1% bezogen auf Frisch- bzw. Trockengewicht) eines komplexen Gemisches wasserdampflicher Verbindungen.

Insgesamt konnten mittels GC-MS mehr als 123 Peaks nachgewiesen werden; davon wurden 45 Verbindungen identifiziert.

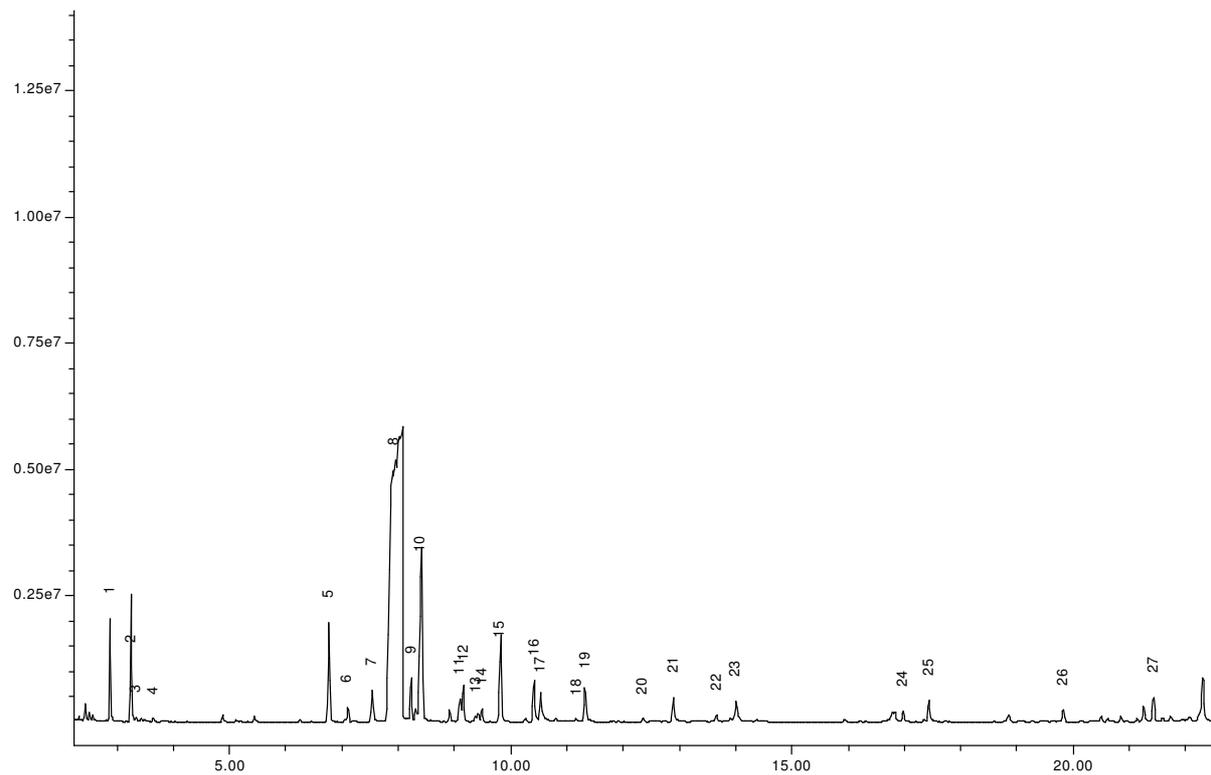


Abb. 34: TIC des Wasserdampfdestillats von *Heterobasidion annosum* 1. Teil.

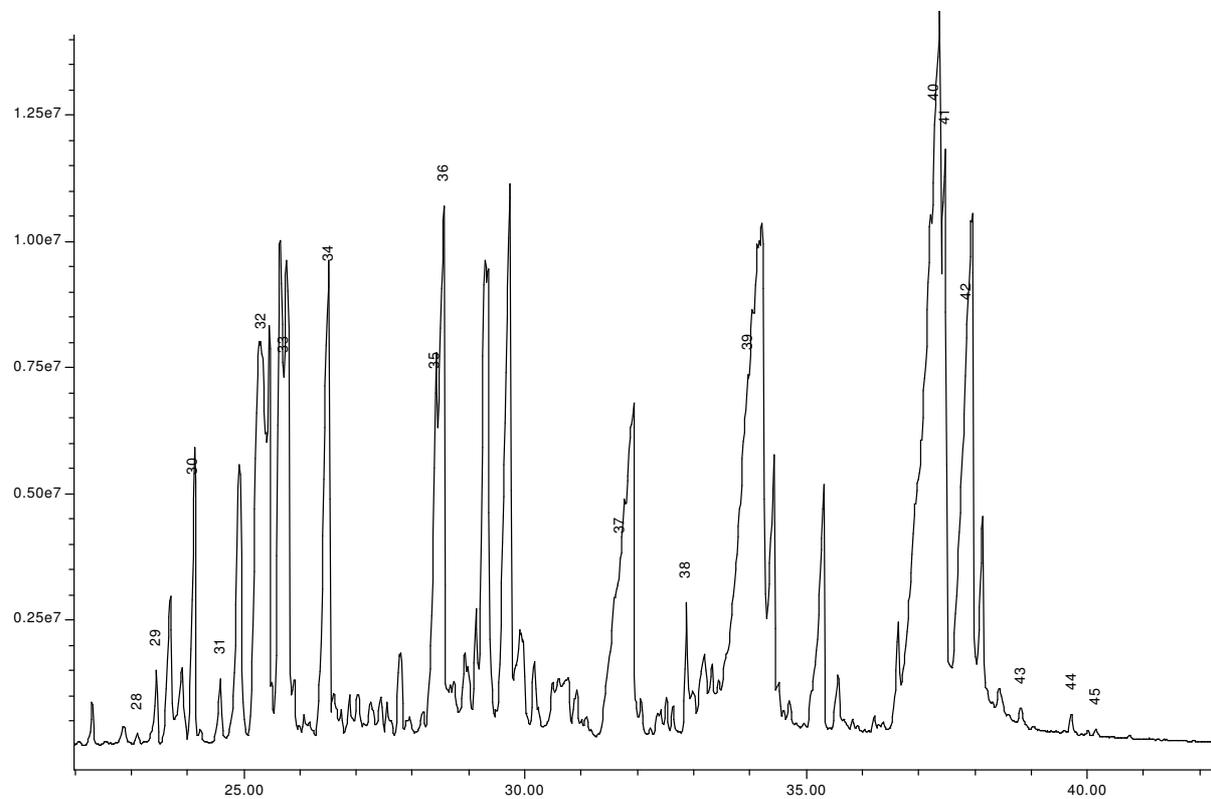


Abb. 35: TIC des Wasserdampfdestillats von *Heterobasidion annosum* 2. Teil.

Peak-Nr. *	Substanz	GC-MS			Identifizierung	GC-FID	
		RT	KI	M+ (Int %)		Rt	%
1	Toluol	2,87	-	92 (75)	1, 3	-	-
2	n-Hexanal	3,26	-	82 (19)	1, 3, 5, 6, 7, 8	-	-
3	2-Methyl-4-pentenal	3,34	788	98 (-)	1, 2	5,75	0,03
4	Octan	3,65	801	114 (-)	1	6,06	0,04
5	$\alpha$ -Pinen	6,77	929	136 (8)	1, 2	10,29	0,79
6	Camphen	7,1	941	136 (19)	1, 2	10,77	0,18
7	1-Hepten-3-on	7,54	956	110 (1)	1, 2	11,44	0,21
8-1	( <i>R,S</i> )-1-Octen-3-ol			128 (-)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	12,04-	
8-2	3-Octanon	7,93	970	128 (5)	1, 2, 3	12,56	15,63
9	2-Pentylfuran	8,23	981	138 (10)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	12,71	0,03
10	3-Octanol	8,41	987	130 (-)	1, 2	13	0,74
11	Phenylacetaldehyd	9,1	1010	120 (16)	1, 2	13,72-	0,59
12	p-Cymen	9,16	1012	134 (22)	1	13,9	
13	Limonen	9,38	1020	136 (10)	1, 2	14,28	0,17
14	p-Menth-1-ene	9,49	1023	138 (29)	1 2	14,4	0,13
15	E-2-Octenal	9,81	1034	126 (-)	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8	14,99	0,54
16	Non-1-en-3-ol	10,42	1054	142 (-)	1, 2	15,94	0,23
17	1-Octanol	10,55	1058	130 (-)	1, 2, 3	15,95	0,14
18	Terpinolen	11,18	1079	136 (22)	1, 2	16,73	0,04
19	n-Nonanal	11,33	1084	142 (-)	1, 2	17,26	0,14
20	Camphor	12,36	1118	152 (9)	1, 2	18,95	0,04
21	E-Non-2-enal	12,89	1136	140 (-)	1, 2	19,78	0,25
22	Terpinen-4-ol	13,66	1161	154 (5)	1, 2	21,02	0,08
23	$\alpha$ -Terpineol	14,01	1173	154 (-)	1, 2	21,61	0,27
24	2-Undecanon	16,98	1274	170 (1)	1, 2	26,45	0,19
25	E,E-Deca-2,4-dienal	17,44	1290	152 (4)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	27,21	0,15
26	Protoillud-6-en	19,83	1376	204 (21)	1, 2	31,16	0,11
27	$\beta$ -Barbaten	21,44	1436	204 (-)	1, 2	33,83	0,12
28	$\beta$ -Bisabolen	23,12	1500	204 (6)	1, 2	36,66	0,06
29	$\beta$ -Bazzanen	23,45	1513	204 (5)	1, 2	37,21	0,27
30	9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo-[8.3.0 <sup>2,10</sup> .0 <sup>3,7</sup> ]trideca-3,6-dien	24,11	1540	216 (93)	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8	38,37	1,02
31	11,12-Dimethylmethylen-5-oxatri-cyclo[8.3.0.0 <sup>7,3</sup> ]trideca-3,6-dien	24,58	1559	216 (68)	1, 3, 5, 6, 7	39,13	0,25

Peak-Nr. *	Substanz	GC-MS			Identifizierung	GC-FID	
		RT	KI	M+ (Int %)		Rt	%
32	Furanether A	25,32	1589	232 (56)	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8	40,24-40,55	5,55
33	Lactaral	25,72	1605	232 (11)	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8	41,41	5,45
34	9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0.0 <sup>3,7</sup> ]trideca-1,3,6,9-tetraen	26,5	1638	214 (100)	1, 3, 5, 6, 7	42,35	1,36
35	Isomer von Lactaral ?	28,41	1720	232 (8)	1	45,6	1,21
36	Isomer von Lactaral ?	28,56	1727	232 (13)	1	45,98	
37	Pentadecansäure	31,7	1869	242 (11)	1, 2	50,79-50,99	3,35
38	Cembren	32,88	1926	272 (7)	1, 2	53,11	0,54
39	n-Hexadecansäure	33,96	1979	256 (15)	1, 2	54,91	5,14
40	Linolsäure	37,28	2151	280 (6)	1, 2	60,02	7,13
41	Isomer der Linolsäure	37,47	2161	280 (2)	1	60,32	1,22
42	Octadecansäure	37,86	2182	284 (19)	1, 2	60,95	1,53
43	Dehydroabietinal	38,79	2233	284 (39)	1, 2	62,45	0,25
44	Abietal	39,72	2284	286 (35)	1, 2	63,94	0,15
45	Dehydroabietinsäure-methylester	40,15	2308	314 (6)	1, 2	64,64	0,11

Tab. 14: Zusammensetzung des Wasserdampfdestillates von *Heterobasidion annosum*.

1) EI-MS 2) GC (RI) 3) <sup>1</sup>H-NMR 4) <sup>13</sup>C-NMR 5) HH-COSY 6) HMQC 7) HMBC 8) NOESY  
9) Enantioselektive GC

\* = Fortlaufende Nummer (Im Text als **H-x** bezeichnet) **H-1** bis **H-45**

- Die prozentualen Anteile einzelner Stoffgruppen ergeben sich aus folgender Tabelle:

Verbindungs-Gruppe (identifizierte Komponenten)	Anteil in % im Gesamtöl
<i>Terpenoide Verbindungen</i>	18,74
Monoterpene	2,29
Sesquiterpene	15,4
Diterpene	1,05
<i>Nicht terpenoide Verbindungen</i>	37,28
Aldehyde	1,7
Ketone *	16,03
Alkohole *	16,74
Fettsäuren	18,37
Fettsäureester	-
* = Überlagerung Alkohol/Keton	

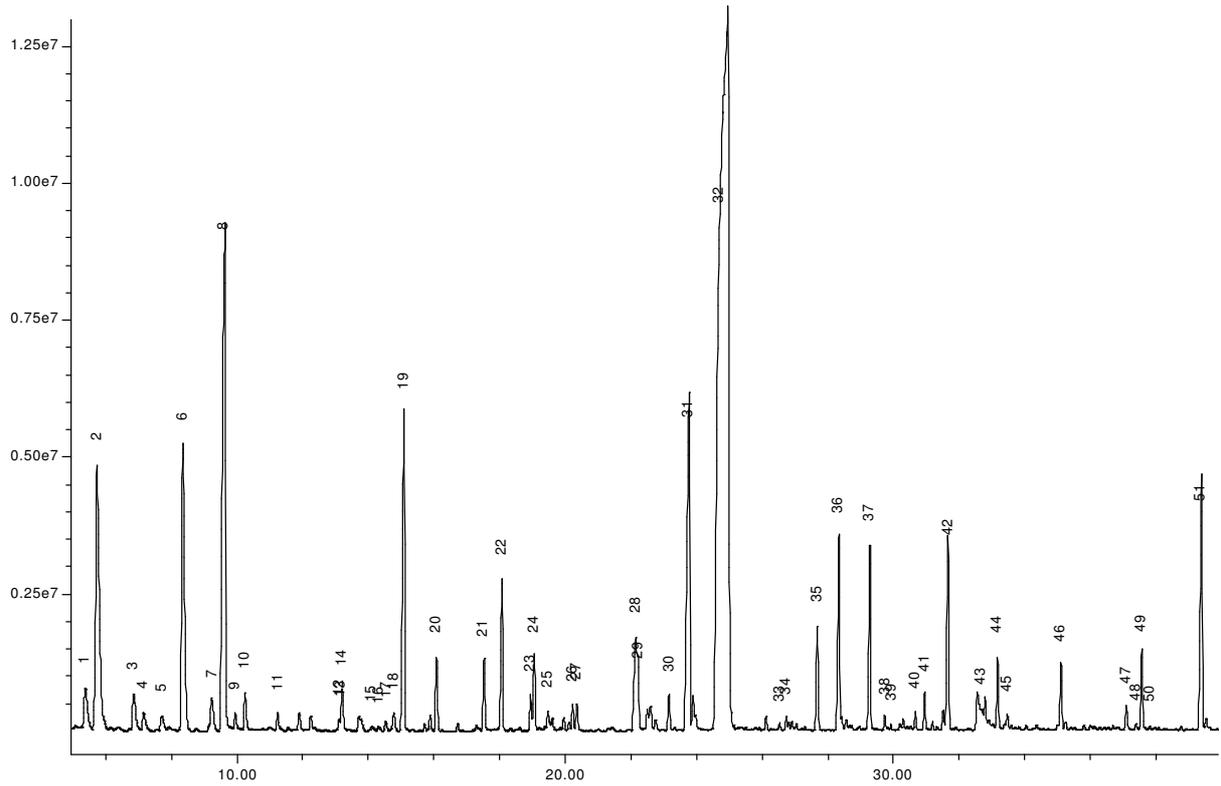


Abb. 36: TIC des Wasserdampfdestillats von *H. annosum* nach Sievers (1. Teil)

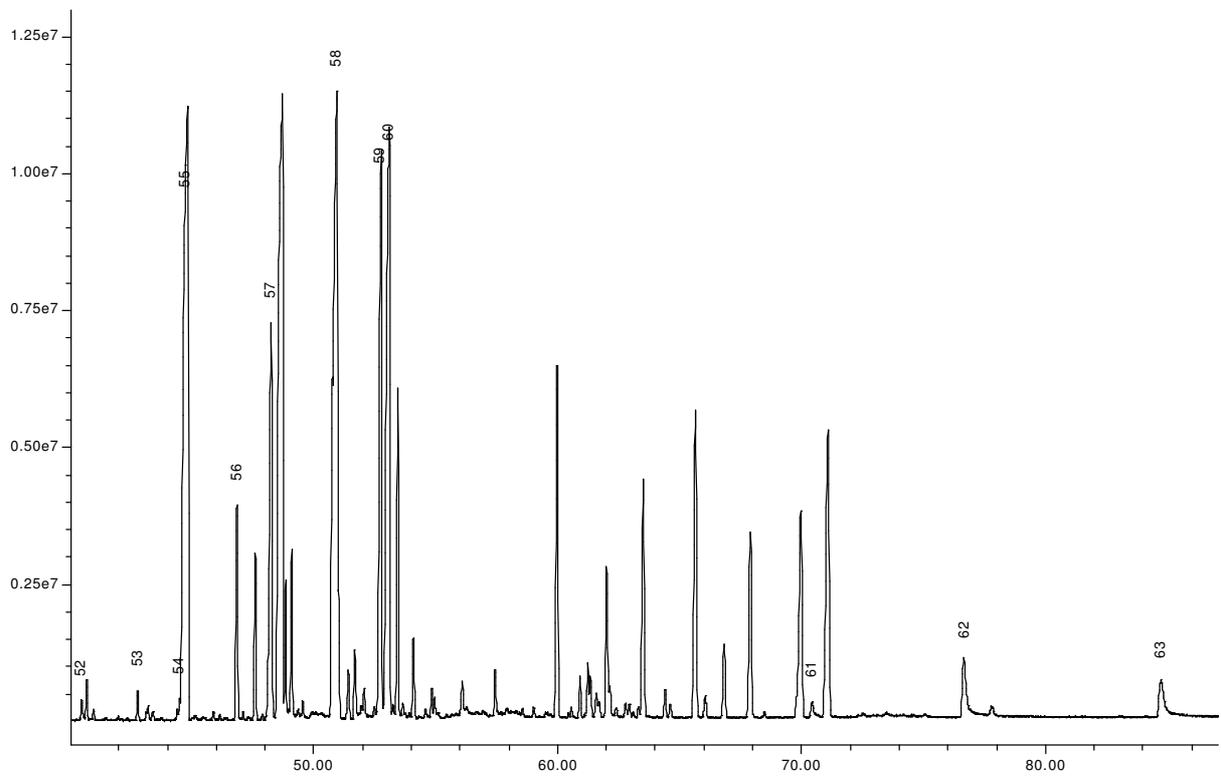


Abb. 37: TIC des Wasserdampfdestillats von *H. annosum* nach Sievers (2. Teil)

Peak-Nr.*	Zeit [Min.]	Substanzbezeichnung	RI	GC %	[M+] <sup>*</sup> (Int%)	Identifiziert durch	Subst.Nr.
1	5.377	2-Methylfuran	911	0,41	82 (100)	1	H-47
2	5.733	3-Methylbutanal	930	2,58	86 (3)	1	H-48
3	6.851	Valeraldehyd	989	0,27	86 (1)	1	H-49
4	7.164	2-Methylpentanal	1003	7,16	100 (5)	1	H-50
5	7.710	α-Pinen	1022	0,04	136 (-)	1	H-51
6	8.349	Toluol	1044	1,89	92 (58)	1	H-1
7	9.252	Phenol	1075	0,03	94 (100)	1	H-52
8	9.621	n-Hexanal	1088	3,99	100 (-)	1	H-2
9	9.953	2-Methyl-2-butenal	1100	0,07	84 (100)	1	H-53
10	10.248	3-Methylpyridazin	1106	0,14	94 (100)	1	H-54
11	11.248	2-Butylfuran	1128	0,05	124 (22)	1	H-55
12	13.114	2-Heptanon	1168	-	114 (5)	1	H-56
13	13.150	überlagert	1169	-	114 (4)	1	H-57
14	13.212	n-Heptanal	1170	0,11	114 (2)	1	H-58
15	14.102	Limonen	1189	-	136 (-)	1	H-13
16	14.317	β-Phellandren	1194	-	154 (35)	1	H-59
17	14.538	1,8-Cineol	1199	0,02	154 (-)	1	H-60
18	14.784	2-Hexenal	1204	0,06	98 (-)	1	H-61
19	15.085	2-Pentylfuran	1211	1,00	138 (16)	1	H-9
20	16.086	1-Pentanol / 3-Octanon	1235	0,26	-	1	H-62
21	17.521	n-Octanal	1269	0,16	128 (-)	1	H-63
22	18.074	1-Octen-3-on	1282	0,42	126 (-)	1	H-64
23	18.951	2,3-Octanedion	1302	-	142 (1)	1	H-65
24	19.062	2-Heptenal	1305	0,27	112 (2)	1	H-66
25	19.474	6-Methyl-5-hepten-2-on	1314	0,16	126 (-)	1	H-67
26	20.242	unbekannt	1331	-	-	1	-
27	20.353	1-Hexanol	1334	0,03	96 (1)	1	H-68
28	22.153	Nonanal	1375	0,43	142 (-)	1	H-19
29	22.236	3-Octanol	1377	0,25	130 (-)	1	H-10
30	23.170	5-Ethylcyclopent-1-encarbaldehyd	1398	0,08	124 (32)	1	H-70
31	23.752	E-2-Octenal	1411	1,80	126 (1)	1	H-15
32	24.706	R-(-)-1-Octen-3-ol	1431	20,06	99 (4)	1	H-8-1
33	26.556	2-Decanon	1472	-	156 (-)	1	H-71
34	26.740	Decanal	1476	0,02	156 (-)	1	H-72
35	27.674	Benzaldehyd	1496	0,23	106 (99)	1	H-73
36	28.330	2-Nonenal	1511	0,52	140 (-)	1	H-74
37	29.273	1-Octanol	1534	0,45	130 (-)	1	H-17
38	29.754	unbekannt	1545	0,05	82 (-)	1	H-75

Peak-Nr.*	Zeit [Min.]	Substanzbezeichnung	RI	GC %	[M+] <sup>*</sup> (Int%)	Identifiziert durch	Subst.Nr.
39	29.930	α-Barbaten	1549	0,01	204 (11)	1	H-76
40	30.660	6-Methyl-3,5-heptadien-2-on	1567	0,04	134 (3)	1	H-77
41	30.956	2-Undecanon	1574	0,05	170 (7)	1	H-24
42	31.668	2-Octen-1-ol	1591	0,46	114 (-)	1	H-79
43	32.648	Phenylacetaldehyd	1614	0,15	138 (1)	1	H-11
44	33.176	β-Barbaten	1627	0,15	204 (2)	1	H-80
45	33.472	2,4-Nonadienal	1635	0,04	138 (6)	1	H-81
46	35.090	2,4-Nonadienal + α-Terpineol	1675	0,06	-	1	H-23
47	37.086	2-Undecenal	1725	0,15	168 (-)	1	H-82
48	37.401	Cadinen-Art	1733	0,01	204 (10)	1	H-83
49	37.558	2,4-Decadienal (E,Z)	1737	0,16	152 (7)	1	H-84
50	37.808	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1744	-	204 (11)	-	H-85
51	39.360	E,E-2,4-Decadienal	1784	0,74	152 (6)	1	H-25
52	40.469	Capronsäure	1814	0,15	116 (-)	1	H-86
53	42.779	Furfurylidenaceton	1875	0,10	136 (62)	1	H-87
54	44.498	Oenanthsäure	1923	0,04	130 (-)	1	H-88
55	44.714	9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo-[8.3.0.0 <sup>2,10</sup> .0 <sup>3,7</sup> ]trideca-3,6-dien	1929	10,05	216 (100)	-	H-30
56	46.853	11,12-Dimethyl-9-methylen-5-oxatricyclo-[8.3.0.0 <sup>3,7</sup> ]trideca-3,6-dien	1991	0,61	216 (72)	1	H-31
57	48.245	Caprylsäure	2032	0,03	144 (-)	1	H-89
58	50.949	Furanether A	2111	8,66	232 (62)	-	H-32
59	52.737	Lactaral	2165	5,25	232 (13)	-	H-33
60	53.066	9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0 <sup>3,7</sup> ]trideca-1,3,6,9-tetraen	2175	5,54	214 (100)	-	H-34
61	70.427	Tetradecansäure	2685	0,70	228 (21)	1	H-90
62	76.678	Pentadecansäure	2793	0,93	242 (11)	1	H-91
63	84.754	Hexadecansäure	2900	0,89	256 (15)	1	H-92

Verbindungs-Gruppe (indentifizierte Komponenten)	Anteil in % im Gesamtöl
---	-------------------------------

Vom Gesamtöl identifiziert	77,95
----------------------------	-------

<i>Terpenoide Verbindungen</i>	30,19
Monoterpene	0,06
Sesquiterpene	30,13

<i>Nicht terpenoide Verbindungen</i>	47,58
Aldehyde	18,56
Ketone	0,99
Alkohole	21,51
Fettsäuren	2,74
Fettsäureester	-

Identifiziert durch	
EI-MS	1
<sup>1</sup> H-NMR	2
<sup>13</sup> C-NMR	3
HH-COSY	4
HMQC	5
HMBC	6
NOESY	7
Nur von uns nachgewiesen und hier ergänzt (vgl. Tab. 14)	-

Eigendlicher [M+] nicht immer genau zu identif.	*
---	---

**Tab. 15: Zusammensetzung des Wasserdampfdestillat von *Heterobasidion annosum* nach Sievers<sup>141</sup> (RI-Werte wurden von Sievers nicht berechnet. Dieses erfolgte hier nachträglich).**

Die erhaltenen Analysenergebnisse wurden verglichen mit den einzigen in der Literatur verfügbaren Daten der GC-MS-Analyse der flüchtigen Verbindungen des Wurzelschwammes. Diese stammen von Sievers<sup>141</sup>, die in ihren Untersuchungen zur gaschromatographischen Auftrennung des Destillates eine Carbowax-Phase verwendete (Abb. 36 und Abb. 37, sowie Tab. 15).

Beim Vergleich der Daten von Sievers mit Untersuchungsergebnissen die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen erzielt wurden, konnte folgendes festgestellt werden:

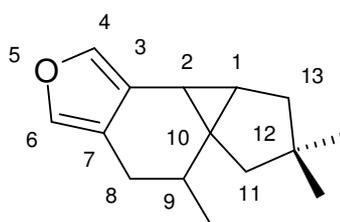
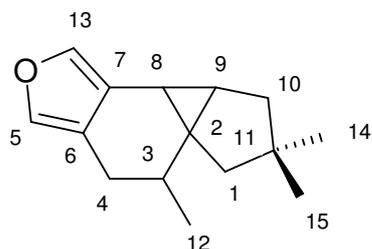
1. Im höheren Retentionszeitbereich des Gaschromatogramms konnten, gute Übereinstimmungen registriert werden. Hingegen waren im Bereich der Mono- und Sesquiterpene teilweise starke Abweichungen festzustellen.
2. Auch wurden erhebliche Abweichungen in der Zusammensetzung der flüchtigen Verbindungen, in Abhängigkeit einerseits von unterschiedlichen Erntezeitpunkten im Jahresverlauf (vom selben Sammelort) und zum anderen von verschiedenen Herkunftsorten beobachtet. Diese Unterschiede betrafen sowohl qualitative als auch quantitative Aspekte der einzelnen Inhaltsstoffe. Vergleiche von Proben mit denen aus dem Vorjahr ergaben ebenfalls Abweichungen. Einige Unterschiede können durch äußere Bedingungen (unterschiedliche Wachstumsphasen, Witterungsverhältnisse, Boden- und Substrateigenschaften) verursacht sein, zum Teil spielen wahrscheinlich auch genetische Faktoren („chemische Rassen“) eine Rolle. Die Klärung dieser Verhältnisse erfordert intensive weitere Studien.

Eine detaillierte Übersicht der Unterschiede zwischen den neuen Analyseergebnissen und den Daten von Sievers wird in Tab. 16 wiedergegeben.

3. Durch die Isolierung und Strukturaufklärung mittels massen- und NMR-spektroskopischer Methoden, konnten 9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-30) , 11,12-Dimethyl-9-methylen-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-31) , Furanether A (H-32), Lactaral (H-33) und 9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-1,3,6,9-tetraen (H-34) neu als Inhaltsstoffe des Wasserdampfdestillates dieses Baumpilzes nachgewiesen werden. Diese Verbindungen ließen sich auch den entsprechenden MS-Peaks der von Sievers durchgeführten Analysen zuordnen.
4. Von den bekannten Verbindungen ließen sich Toluol, n-Hexanal, R(-)-1-Octen-3-ol, 3-Octanon, 2-Pentylfuran, E-2-Octenal, 1-Octanol und E,E-2,4-Decadienal durch präparative GC isolieren. Durch Anwendung NMR-spektroskopischer Verfahren wurden die Identitäten bestätigt und ggf. auch die Stereochemie geklärt. Bei R(-)-1-Octen-3-ol wurde die absolute Konfiguration mittels enantioselektiver Gaschromatographie ermittelt.

A	Nummer	B	Nummer
2-Methyl-4-pentenal	H-3	2-Methylfuran	H-47
2,3-Dimethylheptan	H-4	3-Methylbutanal	H-48
Camphen	H-6	Valeraldehyd	H-49
1-Hepten-3-on	H-7	2-Methylpentanal	H-50
p-Menth-1-en	H-14	Phenol	H-52
Non-1-en-3-ol	H-16	2-Methyl-2-butenal	H-53
Terpinolen	H-18	3-Methylpyridazin	H-54
Campher	H-20	2-Butylfuran	H-55
Terpinen-4-ol	H-22	2-Heptanon	H-56
Protoillud-6-en	H-26	$\beta$ -Phellandren	H-59
$\beta$ -Bisabolen	H-28	1,8-Cineol	H-60
$\beta$ -Bazzanen	H-29	2-Hexenal	H-61
Cembren	H-38	n-Octanal	H-63
Linolsäure	H-40	1-Octen-3-on	H-64
Octadecansäure	H-42	2,3-Octandion	H-65
Dehydroabietinal	H-43	2-Heptenal	H-66
Abietal	H-44	6-Methyl-5-hepten-2-on	H-67
Dehydroabietinsäuremethylester	H-45	1-Hexanol	H-68
		5-Ethylcyclopent-1-encarbaldehyd	H-70
		2-Decanon	H-71
		Decanal	H-72
		Benzaldehyd	H-73
		$\alpha$ -Barbaten	H-76
		6-Methyl-3,5-heptadien-2-on	H-77
		2-Octen-1-ol	H-79
		2,4-Nonadienal	H-81
		2-Undecenal	H-82
		2,4-Decadienal (E,Z)	H-84
		Capronsäure	H-86
		Furfurylidenaceton	H-87
		Oenanthsäure	H-88
		Caprylsäure	H-89
		Tetradecansäure	H-90

**Tab. 16: Vergleich der Zusammensetzung der Wasserdampfdestillate der neuen (A) und der von Sievers (B) untersuchten Heterobasidion-Fruktkörper. Unter A sind nur diejenigen Verbindungen aufgeführt, die ausschließlich in den im Rahmen dieser Untersuchungen analysierten Destillaten auftraten. In Spalte B sind die Substanzen aufgelistet, die nur bei Sievers auftraten.**

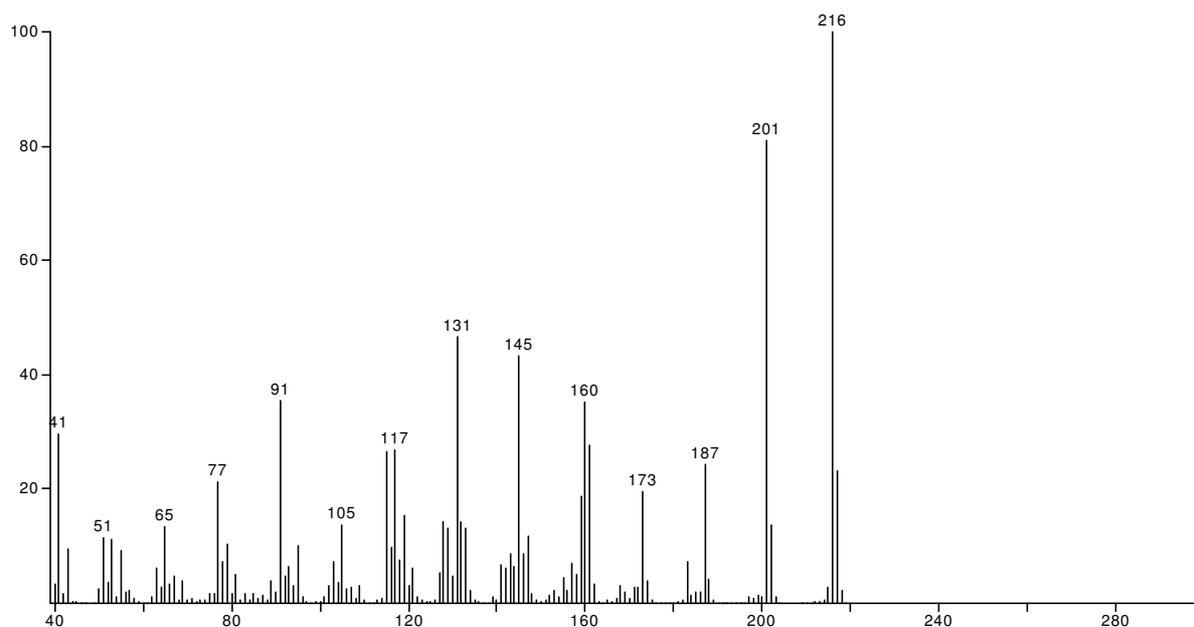
**9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-30)**
**H-30**

Sesquiterpene-Nomenklatur

IUPAC

Die hier beschriebene Verbindung **H-30** wurde aus dem Wasserdampfdestillat des Baumpilzes *Heterobasidion annosum* isoliert. Sie wurde durch Auftrennung der ersten säulenchromatographischen Pentan-Fraktion durch präparative Kapillar-GC isoliert (vgl. Auftrennungsschema Abb. 32).

Das EI-Massenspektrum (vgl. Abb. 38) läßt einen Molekülpeak von  $m/z$  216 vermuten, der, da er zugleich auch den Basispeak repräsentiert, auf ein zyklisches System hoher Stabilität hindeutet. Die HR-MS-Messung ergab für dieses Ion  $M^+ = 216$  eine Summenformel von  $C_{15}H_{20}O$ ; daraus resultiert für dieses Molekül (**H-30**) eine Anzahl von sechs Doppelbindungsäquivalenten.



**Abb. 38: EI-Massenspektrum von 9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-30).**

Diese Summenformel konnte durch Auswertung des  $^{13}\text{C}$ -Pendant- und HMQC-Spektrums bestätigt werden. Es ergab sich eine Anzahl von 15 Kohlenstoffatomen und 20 Protonen. Die  $\delta$ -Werte der einzelnen C-Signale, ihre Multiplizität, sowie die entsprechenden  $^1\text{H}$ -NMR-Daten sind in Tab. 17 aufgeführt.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt im olefinischen Bereich vier Kohlenstoffe ( $\delta = 117.83$  ppm, s, C-7; 123.66, s, C-6; 136.4, d, C-13; 138.85, d, C-5) und belegt damit eine Anzahl von zwei Doppelbindungen. Daraus ergibt sich für das vorliegende Molekül eine Anzahl von vier Ringen.

Nr.	$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) in ppm bei 125.77 MHz	C-Atom	Strukturelement	$^1\text{H}$ -NMR-Daten ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) in ppm bei 500.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	18.86 q	12	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.9 d	<sup>3</sup> J <sub>H-12,H-3</sub> = 5.67
2	25.87 t	4	-CH <sub>2</sub> -	H-4a, 2.28 ddd H-4b, 2.12 dd	<sup>2</sup> J <sub>H-4a,H-4b</sub> = 15.1 <sup>3</sup> J <sub>H-4a,H-3</sub> = 5.3 <sup>4</sup> J <sub>H-4a,H-5</sub> = 1.5 <sup>2</sup> J <sub>H-4b,H-4a</sub> = 15.1 <sup>4</sup> J <sub>H-4b,H-5</sub> = 1.5
3	26.67 d	8	>CH-	1H, 1.52 d	<sup>3</sup> J <sub>H-8,H-9</sub> = 2.52
4	30.36 q	15	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.91 s	
5	30.79 d	3	>CH-	1H, 2.06 m	
6	31.87 d	9	>CH-	1H, 1.4 m	
7	32.09 q	14	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.97 s	
8	40.34 s	2	>C<		
9	43.85 s	11	>C<		
10	45.67 t	10	-CH <sub>2</sub> -	H-10a, 1.69 ddd H-10b, 1.37 dd	<sup>2</sup> J <sub>H-10a,H-10b</sub> = 12.6 <sup>3</sup> J <sub>H-10a,H-9</sub> = 5.82 J <sub>H-10a/?</sub> (longr.) = 1.2 <sup>2</sup> J <sub>H-10b,H-10a</sub> = 12.6 J <sub>H-10b/?</sub> (longr.) = 1.2
11	49.81 t	1	-CH <sub>2</sub> -	H-1a, 1.62 dd H-1b, 1.5 d	<sup>2</sup> J <sub>H-1a,H-1b</sub> = 13.1 J <sub>H-1a/?</sub> (longr.) = 1.1 <sup>2</sup> J <sub>H-1b,H-1a</sub> = 13.1
12	117.83 s	7	>C=		
13	123.66 s	6	>C=		
14	136.4 d	13	=CH-	1H, 7.15 s (?)	
15	138.85 d	5	=CH-	1H, 6.97 br s	

**Tab. 17: Zuordnung der NMR-Signale von 9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-30).**

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abb. 39) zeigt im olefinischen Bereich zwei Protonen (H-13,  $\delta = 7.15$ , s, überlagert vom Lösungsmittelpeak; H-5, 6.79 ppm, br s mit angedeuteter Tripletstruktur). Die nichtäquivalenten Methylenprotonen H-4a,b sind bei

unterschiedlichen  $\delta$ -Werten lokalisiert und zeigen auch differente Aufspaltungsmuster: H-4a (2.28 ppm) erscheint als Teil eines Vierspinsystems (Kopplung mit H-4b und H-5 und H-3; Kopplungskonstanten vgl. Tab. 17), während Proton H-4b (2.12 ppm) lediglich als Doppeldublett erscheint (geminale Kopplung H-4a und Allylkopplung mit H-5; ungünstiger Torsionswinkel mit H-3 !).

Das chirale Proton H-3 ( $\delta$ = 2.06 ppm) läßt eine Multiplettstruktur erkennen, bedingt durch vicinale Kopplungen mit der Methylengruppe H-4 und den Protonen der Methylgruppe H-12.

Die beiden Protonen H-10a, b sind chemisch nicht äquivalent. H-10a ( $\delta$ = 1.69 ppm) ist zu einem Doppeldublett aufgespalten mit  ${}^2J_{\text{H-10a, H-10b}} = 12.6$  Hz und  ${}^3J_{\text{H-10a, H-9}} = 5.82$  Hz und zeigt zudem noch ein Feinsplitting von 1.2 Hz, hervorgerufen durch longrange-Kopplung(en). Dagegen weist Proton H-10b ( $\delta$ = 1.37 ppm) lediglich eine größere (geminale) Kopplung mit  ${}^2J_{\text{H-10b, H-10a}}$  auf. Die vicinale Kopplung zum benachbarten Proton H-9 ist nicht nachweisbar. Dieses kann anhand eines Molekülmodells veranschaulicht werden, welches eine Abschätzung der Größe des Torsionswinkels H-10b/H-9 (ca.  $100^\circ$ ) erlaubt. Nach der Karplus-Beziehung resultiert für die vicinale Kopplungskonstante in diesem Fall ein Wert von um die 0 Hz.

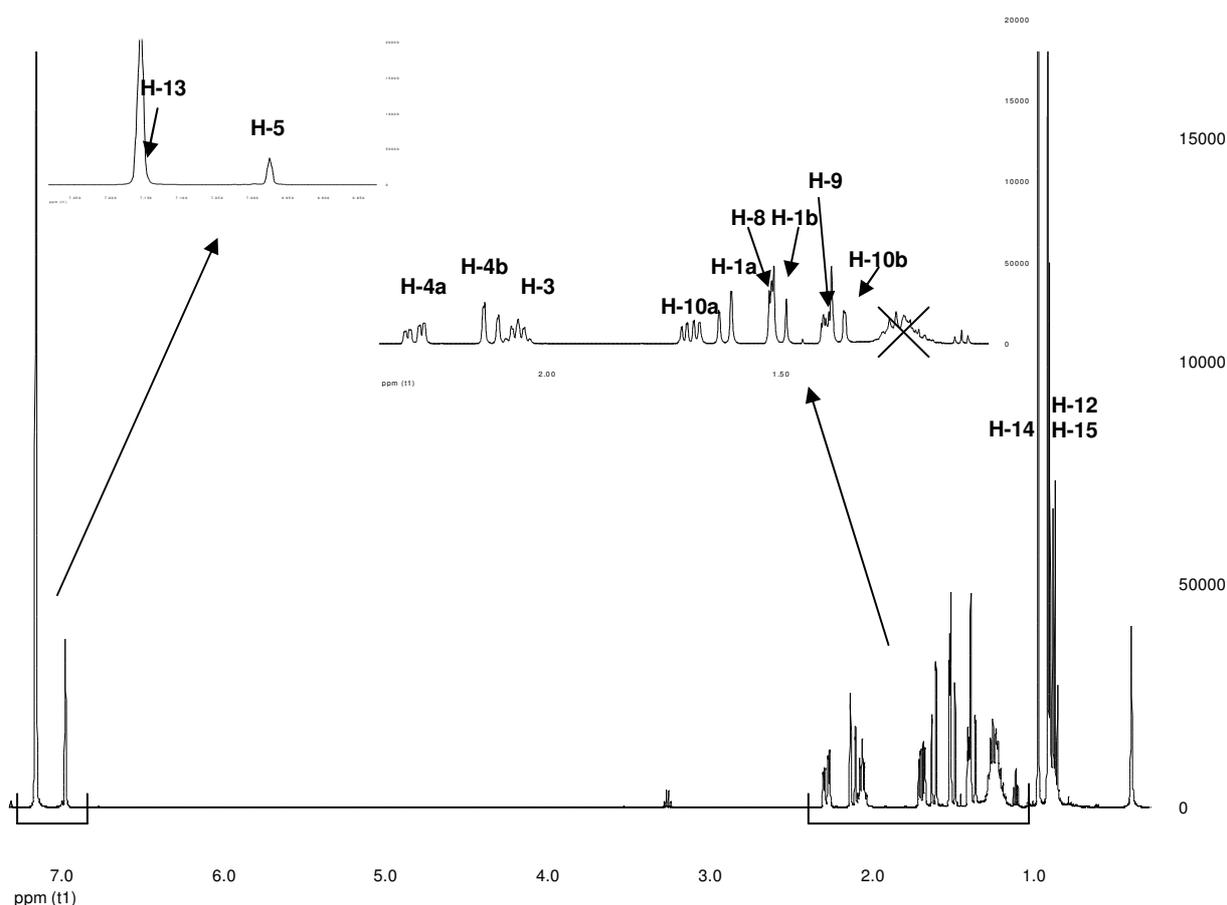
Wie bei der Methylengruppe H-10 sind auch die beiden Protonen H-1 chemisch nicht äquivalent. Proton H-1a ( $\delta$ = 1.62 ppm) repräsentiert ein Doppeldublett mit einer großen geminalen Kopplungskonstante  ${}^2J_{\text{H-1a, b}}$  von 13.1 Hz und einer long-range-Kopplung (1.1 Hz), vermutlich primär mit H-10a ( ${}^4J_{\text{H-1a, H-10a}}$ ; W-förmige Bindungsanordnung), doch besteht auch eine Spin, Spin-Wechselwirkung mit dem analogen Proton H-9 (ebenfalls W-förmige Anordnung) und den Protonen der Methylgruppe H-14.

Das cyclopropanoide Proton H-8 ( $\delta$ = 1.52 ppm) ist zu einem Dublett aufgespalten, bedingt durch den vicinalen Kopplungspartner H-9 ( ${}^3J_{\text{H-8, H-9}} = 2.52$  Hz). Da bei Cyclopropanringen die Substituenten einen sehr starken Einfluß auf die chemische Verschiebung im  ${}^{13}\text{C}$ -Spektrum, aber auch die HH-Kopplungskonstanten ausüben können, ist anhand der beobachteten Kopplungskonstante  ${}^3J_{\text{H-8, H-9}}$  nicht sicher zu beurteilen, ob H-8 und H-9 *cis*- oder *trans*-konfiguriert sind. Für einen unsubstituierten Cyclopropanring würde eine vicinale Kopplungskonstante von 2.5 Hz eine *trans*-Konfiguration indizieren.

Das Proton H-9 stellt ein nicht interpretierbares Multiplett dar (vgl. Abb. 39) und überlagert zum Teil mit dem Proton H-10b.

Die C-Atome des Cyclopropanrings dieses Moleküls weisen auffällig hohe Werte der chemischen Verschiebung auf (C-2: 40.34 ppm; C-8: 26.67; C-9: 31.87). Dieser Sachverhalt erklärt sich dadurch, dass die  $^{13}\text{C}$ - $\delta$ -Werte in Cyclopropanringen sehr stark durch die Anellierung an andere Ringsysteme beeinflusst werden. Während sich die  $^{13}\text{C}$ - $\delta$ -Werte beim Cyclopropanmolekül bei etwa -2.8 ppm liegen, findet man für die entsprechenden Kohlenstoffatome beim Tetracyclo[3,3,1,1, $^{3,7}0^{2,4}$ ]-decan Werte von 20.7 und 24.1 ppm <sup>121</sup>.

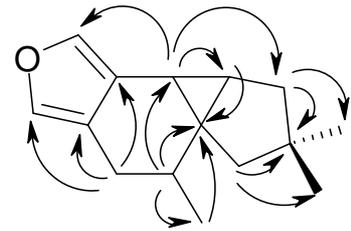
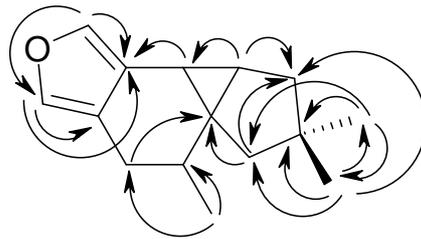
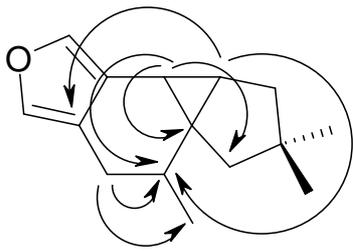
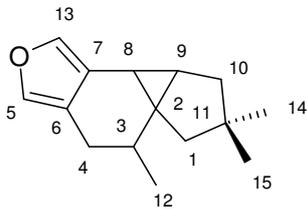
Im Tieffeldbereich des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der Komponente **H-30** lassen sich zwei Singulets für Methylgruppen (H-14,  $\delta=0.97$  ppm, s; H-15, 0.91, s) erkennen. Die dritte Methylgruppe (H-12 bei 0.9 ppm) ist zum Dublett aufgespalten ( $^3J_{\text{H-12, H-3}} = 5.67$  Hz).



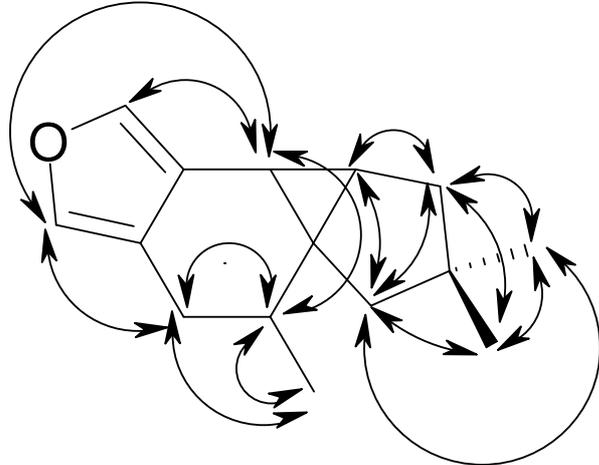
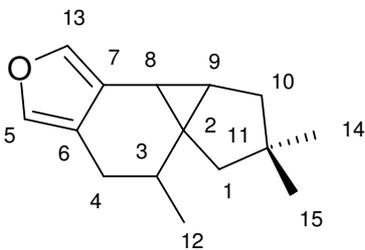
**Abb. 39:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-30) (500.13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

Eine detaillierte Strukturaufklärung erfolgte unter Einsatz verschiedener NMR-spektroskopischer Techniken (HMQC-, HMBC-, HH-COSY- und NOESY).

Die im Molekül zu registrierenden HMBC-Kopplungen sind in den folgenden drei Skizzen abgebildet:



Die registrierten HMBC-Kopplungen zeigten keine Besonderheiten und bestätigte die abgeleitete Struktur. Das gleiche gilt für die Ergebnisse der HH-COSY-Analyse, die in folgender Übersicht zusammengefaßt sind:



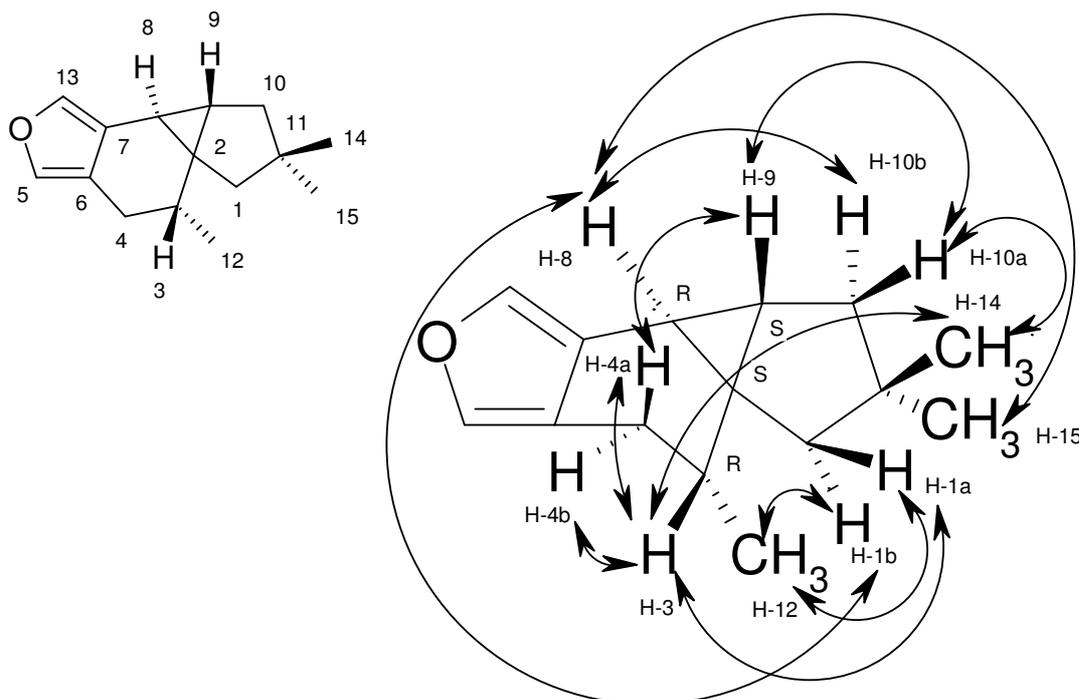
Die CAS-Recherche ergab, dass es sich bei der hier aus dem Baumpilz *Heterobasidion annosum* isolierten Verbindung 9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (**H-30**).

um einen neuen Naturstoff mit bisher unbekanntem Grundgerüst handelt.

Die Stereochemie an den chiralen C-Atomen 3, 8 und 9 sollte durch NOE-Experimente geklärt werden:

- Die Protonen H-8 und H-9 müssen *trans*-ständig zueinander stehen, da nur beim Vorliegen dieser Konfiguration das Proton H-8 mit dem Proton H-10b die beobachtete NOE-Wechselwirkung aufweisen kann. Dies wird auch dadurch belegt, dass H-8 und H-9 im NOE-Experiment nicht in Wechselwirkung treten.
- Der Sechsring muß in etwa Wannenkonfiguration zeigen und der Cyclopropanring so anelliert sein, dass die Methylengruppe H-4 und das Methinproton H-9 eine beobachtete NOE-Wechselwirkung eingehen können, d.h. sie müssen *cis*-konfiguriert sein.
- Das Methinproton H-3 weist eine NOE-Wechselwirkung mit beiden Protonen der Methylengruppe H-4 (H-4a,b) und einem Proton der Methylengruppe H-1 (H-1a) auf. Das Molekülmodell veranschaulicht, dass dies nur möglich ist, wenn H-3 in der gleichen Ringebene wie H-9 positioniert (siehe nachfolgende Skizze) ist. Die relative Konfiguration am C-3 wird auch durch die NOE-Wechselwirkungen der Methylgruppe H-12 zu den beiden Methylenprotonen H-1a/b gestützt.

Unter Berücksichtigung der Stereochemie ergibt sich für die aus dem Baumpilz *Heterobasidion annosum* isolierte Komponente **H-30** damit folgende Formel in die die wichtigsten NOE-Effekte eingezeichnet sind:



Der korrekte chemische Name (IUPAC) dieser Verbindung lautet:

[1*S*<sup>\*</sup>,2*R*<sup>\*</sup>,9*R*<sup>\*</sup>,10*S*<sup>\*</sup>]-9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-30).

Es handelt sich dabei, wie schon bezüglich der Konstitution angemerkt, um einen neuen Naturstoff, für den der Trivialname Heterofuran A vorgeschlagen wird.

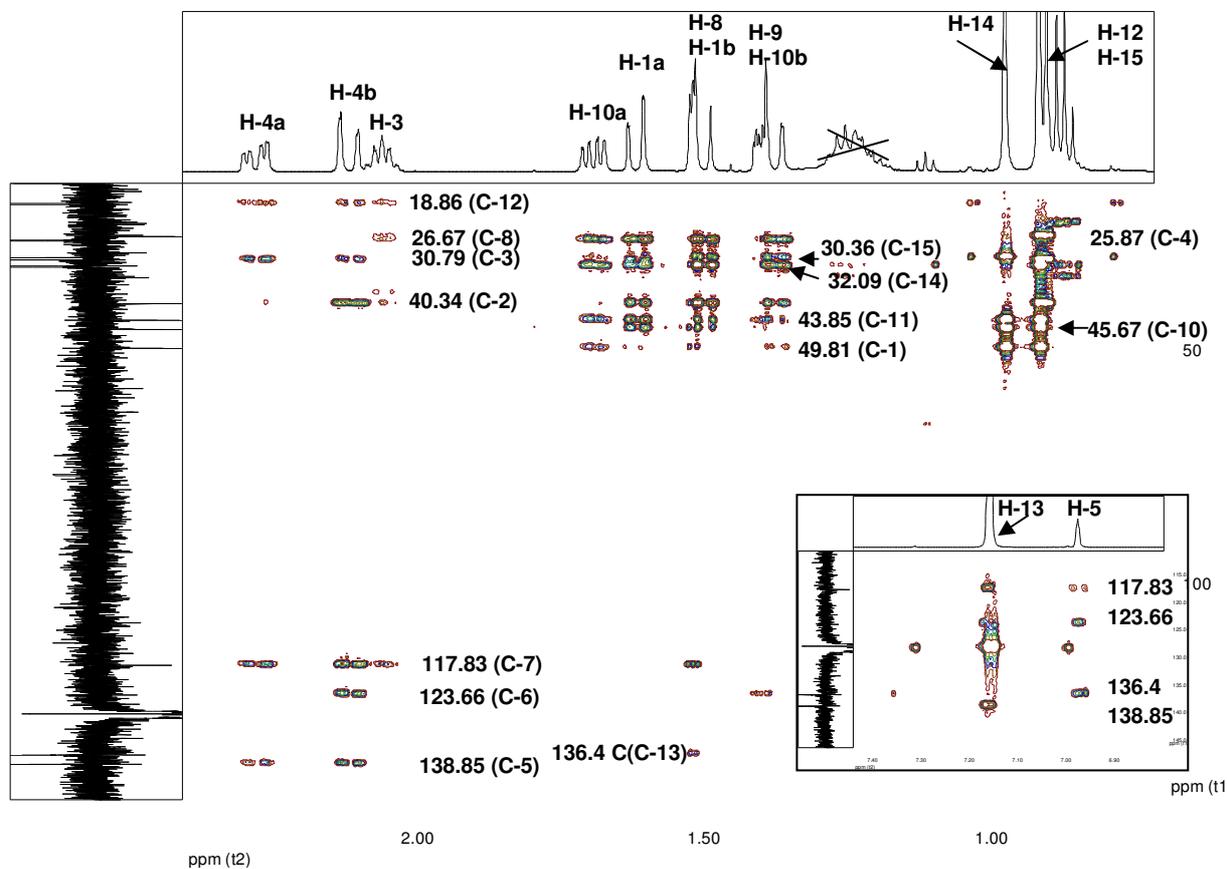
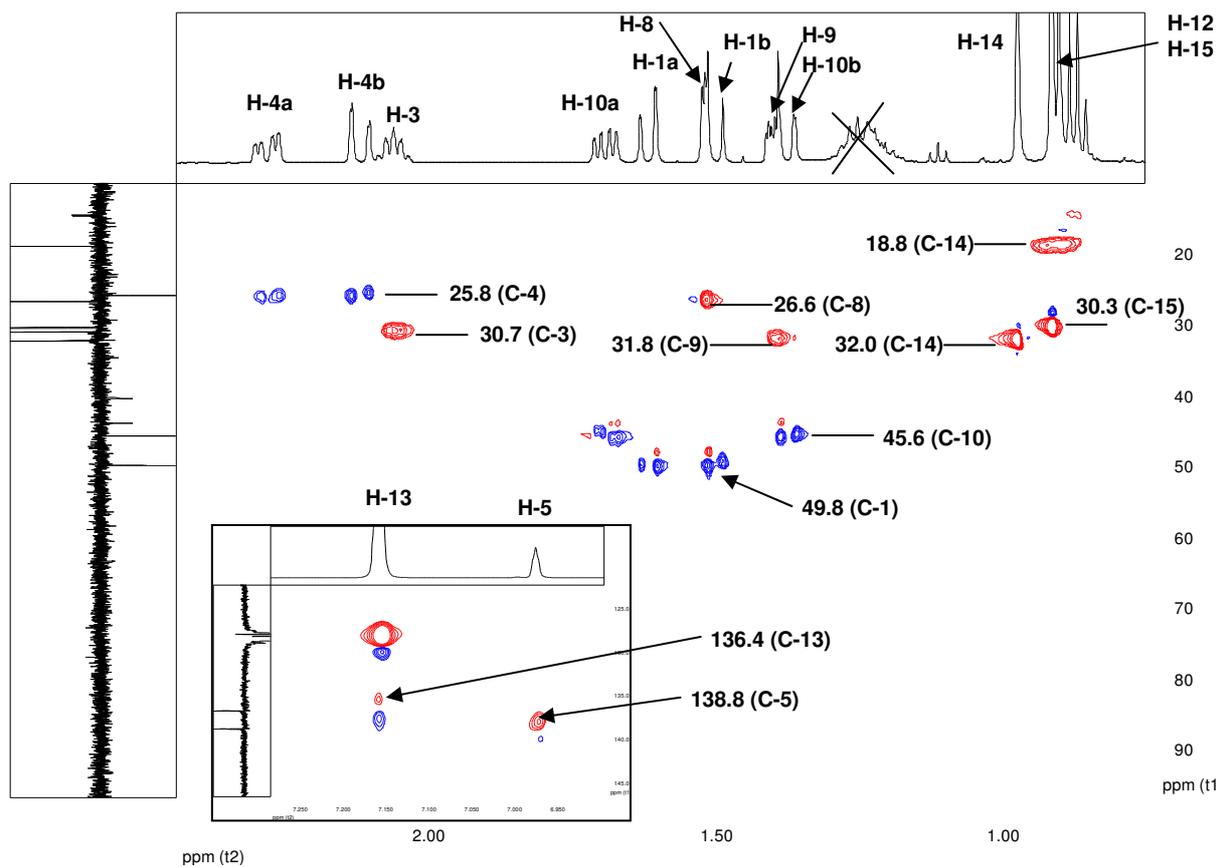
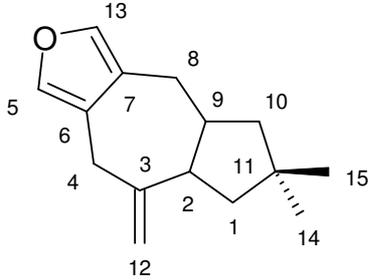
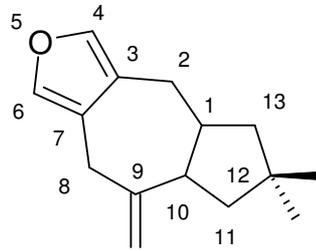


Abb. 40: HMBC- und HMBC-Spektren von 9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0.<sup>2,10</sup>.0.<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-30) (500.13 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

**11,12-Dimethyl-9-methylen-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien  
(H-31)**



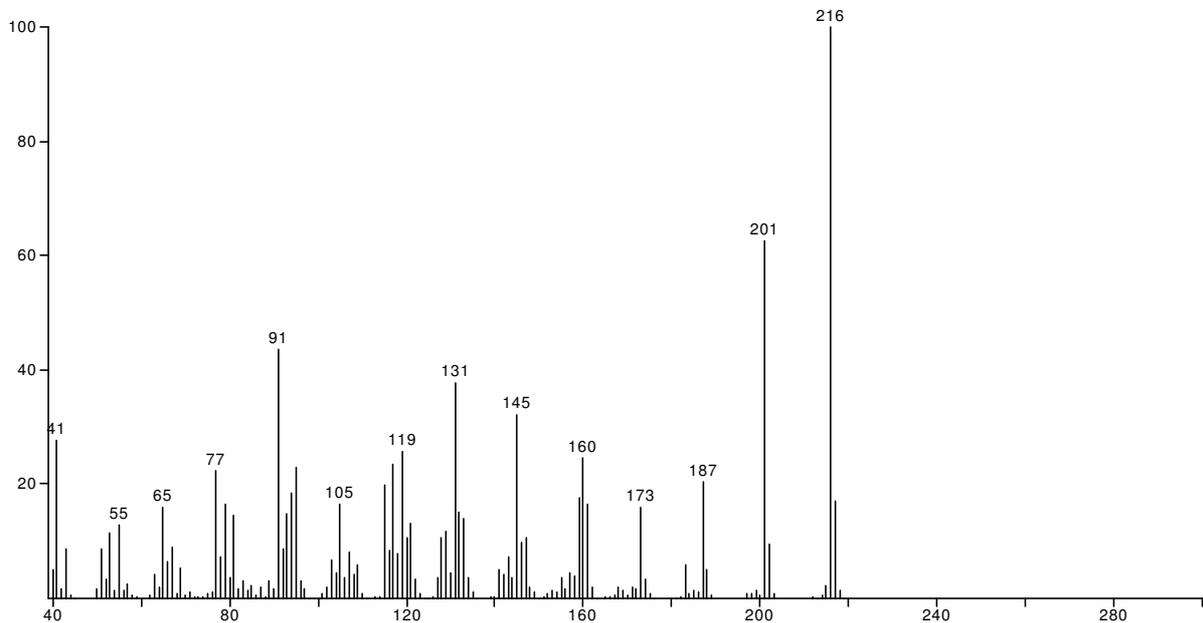
Sesquiterpen-Nomenklatur



IUPAC

**H-31**

Die Verbindung **H-31** wurde ebenfalls aus dem Wasserdampfdestillat des Baumpilzes *Heterobasidion annosum* gewonnen. Sie konnte ebenfalls aus der ersten säulenchromatographischen Pentanfraktion durch präparative GC erhalten werden (vgl. Schema Abb. 32).



**Abb. 41: EI-Massenspektrum von 11,12-Dimethyl-9-methylen-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-31).**

Das EI-Massenspektrum (vgl. Abb. 41) läßt das Vorliegen des Molekülpeaks bei m/z 216 vermuten, der wie bei der vorigen Komponente **H-30**, zugleich auch den Basispeak repräsentiert und somit auf ein cyclisches System hoher Stabilität

hindeutet. Generell fällt eine hohe qualitative Übereinstimmung zwischen den Massenspektren dieser beiden Verbindungen auf, die eine Ähnlichkeit der Grundgerüste vermuten läßt.

Die HR-MS-Messung ergab für das Ion  $M^+ = 216$  eine Summenformel von  $C_{15}H_{20}O$  (Abweichung 1,4 mmu); daraus resultiert für dieses Molekül (**H-31**) eine Anzahl von sechs Doppelbindungsäquivalenten.

Diese Summenformel konnte durch Auswertung des HMQC- und HMBC-Spektrums bestätigt werden. Es ergab sich eine Anzahl von 15 Kohlenstoffatomen und 20 Protonen. Die  $\delta$ -Werte der einzelnen C-Signale, ihre Multiplizität, sowie die entsprechenden  $^1H$ -NMR-Daten sind in Tab. 18 aufgeführt.

Nr.	$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ) in ppm bei 125.77 MHz	C-Atom	Strukturelement	$^1H$ -NMR-Daten ( $CDCl_3$ ) in ppm bei 500.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	26.9 t	8	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.28 t	
2	29.0 q	14	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.91 s	
3	30.5 q	15	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.01 s	
4	32.7 t	4	-CH <sub>2</sub> -	H-4a, 3.31 d H-4b, 3.09 d	$^2J_{H-4a,H-4b} = 15.7$ $^2J_{H-4b,H-4a} = 15.7$
5	37.7 s	11	>C<		
6	42.2 d	9	>CH-	1H, 2.32 m	
7	44.6 t	1	-CH <sub>2</sub> -	H-1a, 1.58 d H-1b, 1.42 ddd	$^2J_{H-1a,H-1b} = 12.5$ $^2J_{H-1b,H-2} = 12.5$ $^3J_{H-1b,H-2} = 7.3$ $^4J_{H-1b,H-10a} = 1.5$
8	47.7 t	10	-CH <sub>2</sub> -	H-10a, 1.5 m H-10b, 1.13 m	$^2J_{H-10a,H-10b} = 12.9$ $^3J_{H-10a,H-9} = 6.9$ $^4J_{H-10a,H-1b} = 1.5$ $^2J_{H-10b,H-10a} = 12.9$ $^3J_{H-10b,H-9} = 6.9$
9	48.7 d	2	>CH-	1H, 2.89 m	$^3J_{H-1,H-2} = 7.3$ $^3J_{H-9,H-2} = 11.18$
10	112.1 t	12	=CH <sub>2</sub>	H-12a, 4.92, s H-12b, 4.87, d	$^2J_{H-12b,H-12a} = 1.5$
11	122.2 s	6	>C=		
12	125.1 s	7	>C=		
13	138.1 d	5	=CH-	1H, 6.97 br s	
14	138.1 d	13	=CH-	1H, 6.95 s	
15	147.7 s	3	>C=		

**Tab. 18: Zuordnung der NMR-Signale von 11,12-Dimethyl-9-methylen-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (**H-31**).**

Da die isolierte Menge der Verbindung **H-31** nicht für eine  $^{13}C$ -Pendant-Messung ausreichte, mußten diese Daten aus den HMQC- und HMBC-Spektren abgelesen

werden. Diese zeigten im olefinischen Bereich eine Anzahl von sechs Kohlenstoffen ( $\delta = 112.1$  ppm, t, C-12; 122.2, s, C-6; 125.1, s, C-7; 138.1, d, C-5; 138.1, d, C-13; 147.7, s, C-3), womit die Existenz von drei Doppelbindungen belegt wird. Zwangsläufig muß das vorliegende Molekül dann drei Ringe als Strukturinkremente besitzen.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 42) zeigt im olefinischen Bereich vier Protonen: H-5 ( $\delta = 6.97$  ppm, br s mit angedeuteter Aufspaltung); H-13 ( $\delta = 6.95$ , br s); H-12a ( $\delta = 4.92$ , s); H-12b ( $\delta = 4.87$ , s mit angedeuteter Tripletstruktur).

Das olefinische Proton H-5 weist eine leichte Aufspaltung auf: das COSY-Experiment belegt zwei long-range-Kopplungen ( $^4\text{J}$  und  $^5\text{J}$ ) mit H-4 und H-8. Das analoge Proton H-13 dagegen präsentiert sich als breites Singulett.

Die beiden chemisch nicht äquivalenten H-Atome (H-12a/b) der exocyclischen Methylengruppe weisen erwartungsgemäß nur eine sehr kleine geminale Kopplungskonstante ( $^2\text{J}_{\text{H-12a, H-12b}}$  ca. 1.5 Hz) auf und zeigen zudem eine long-range-Wechselwirkung mit H-4a und H-4b.

Der aliphatische Bereich des Spektrums beginnt bei den Methylenprotonen H-4a ( $\delta = 3.31$  ppm, d) und H-4b ( $\delta = 3.09$  ppm, d), die vier Resonanzlinien erkennen lassen. Beide Protonen sind jeweils zu einem Dublett aufgespalten ( $^2\text{J}_{\text{H-4a, H-4b}} = 15.7$  Hz); das Zweispinsystem (mit Dacheffekt) könnte man am ehesten als AM-System klassifizieren ( $\Delta\nu/\text{J} = 6.9$ ).

Das Methinproton H-2 ( $\delta = 2.89$  ppm) erscheint als ein symmetrisches Multiplett mit sechs deutlichen Spitzen und wird durch Kopplungen mit einem Proton der vicinalen Methylengruppe H-1 ( $^3\text{J}_{\text{H-1, H-2}} = 7.3$  Hz), sowie dem vicinalen angulären H-9 ( $^3\text{J}_{\text{H-9, H-2}} = 11.18$  Hz) aufgespalten. Daneben sind weitere nicht analysierbare long-range-Kopplungen ( $^4\text{J}$ ) zu H-8 und H-10 nachweisbar.

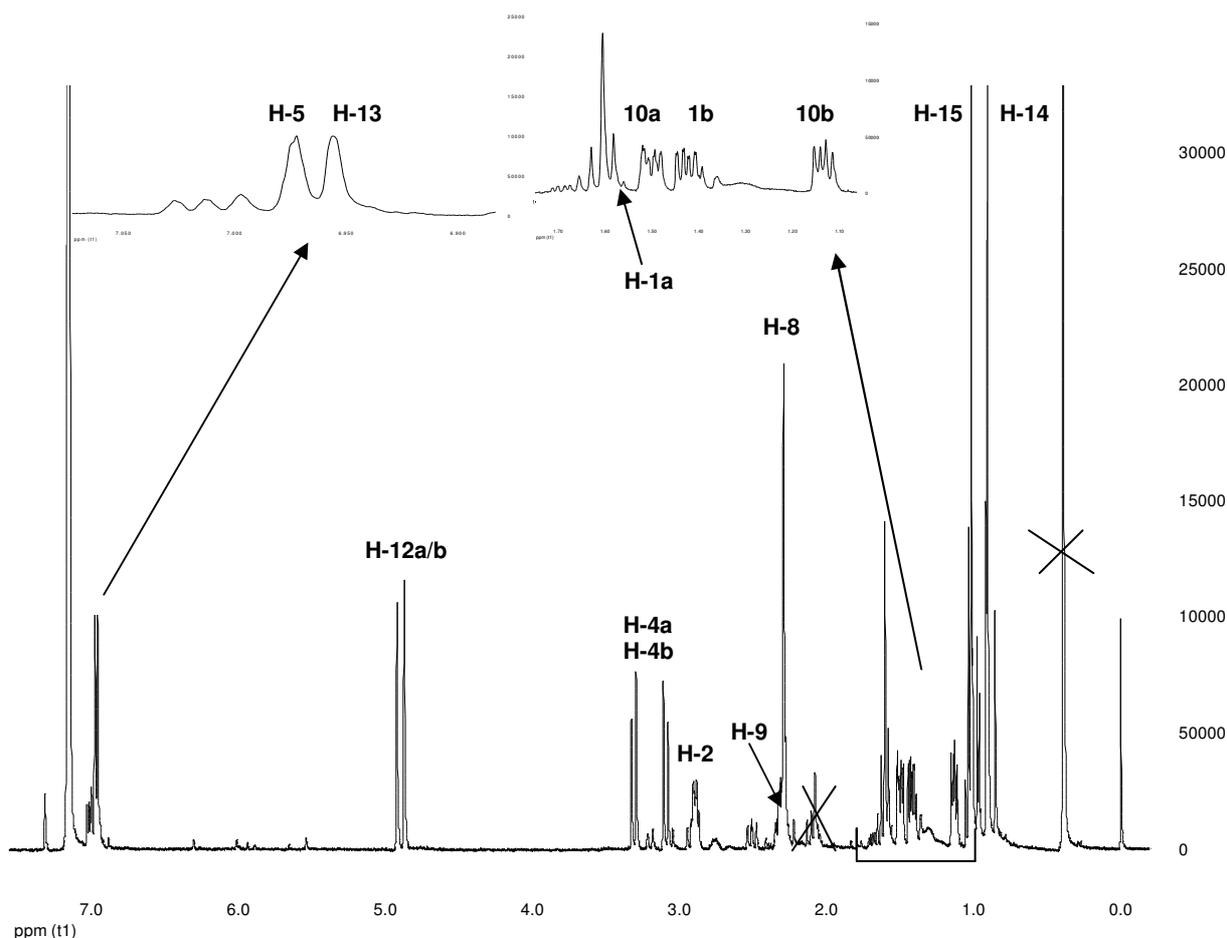
Im  $\delta$ -Bereich von 2.27 bis 2.35 ppm ist ein komplexes Multiplett erkennbar, das aus dem Proton H-9 (Schwerpunkt bei  $\delta = 2.32$  ppm) und den Protonen der Methylengruppe H-8 (Schwerpunkt bei 2.28 ppm) zusammengesetzt ist. Die Signale sind, wie das HMQC-Spektrum beweist partiell überlagert.

Die beiden Protonen H-1a, b sind chemisch nicht äquivalent. H-1a ( $\delta = 1.58$  ppm) ist zu einem Dublett aufgespalten ( $^2\text{J}_{\text{H-1a, H-1b}} = 12.5$  Hz), welches zum Teil durch eine Verunreinigung überlagert ist. Das Proton H-1b ( $\delta = 1.42$  ppm) koppelt mit drei weiteren Kernen (ddd) und läßt eine geminale Kopplung ( $^2\text{J}_{\text{H-1b, H-1a}} = 12.5$  Hz), eine

vicinale Kopplung ( $^3J_{\text{H-1b}, \text{H-2}} = 7.3 \text{ Hz}$ ) und eine long-range-Kopplung ( $^4J_{\text{H-1b}/\text{H-10a}} = 1.5 \text{ Hz}$ ) erkennen.

Auch die Protonen der Methylengruppe H-10 sind chemisch nicht äquivalent und zeigen zudem ein unterschiedliches Aufspaltungsmuster. Das Proton H-10a ( $\delta = 1.5 \text{ ppm}$ ) spaltet zum doppelten Dublett mit  $^2J_{\text{H-10a}, \text{H-10b}} = 12.9 \text{ Hz}$  und  $^3J_{\text{H-10a}, \text{H-9}} = 6.9 \text{ Hz}$  auf. Zudem tritt eine long-range-Kopplung ( $^4J_{\text{H-10a}, \text{H-1b}} = 1.5 \text{ Hz}$ , sterisch fixierte, W-förmige Bindungsanordnung) auf. Beim Proton H-10b ( $\delta = 1.13 \text{ ppm}$ ) erkennt man eine Doppeldublettaufspaltung, bedingt durch die geminale Kopplung ( $^2J_{\text{H-10b}, \text{H-10a}} = 12.9 \text{ Hz}$ ) und einer vicinalen Kopplung mit H-9 ( $^3J_{\text{H-10b}, \text{H-9}} = 6.9 \text{ Hz}$ ).

Im Hochfeld sind (neben einigen Verunreinigungen) die Signale der beiden Methylgruppen H-15 ( $\delta = 1.01 \text{ ppm}$ , s) und H-14 ( $\delta = 0.91 \text{ ppm}$ , s) als Singulett sichtbar.

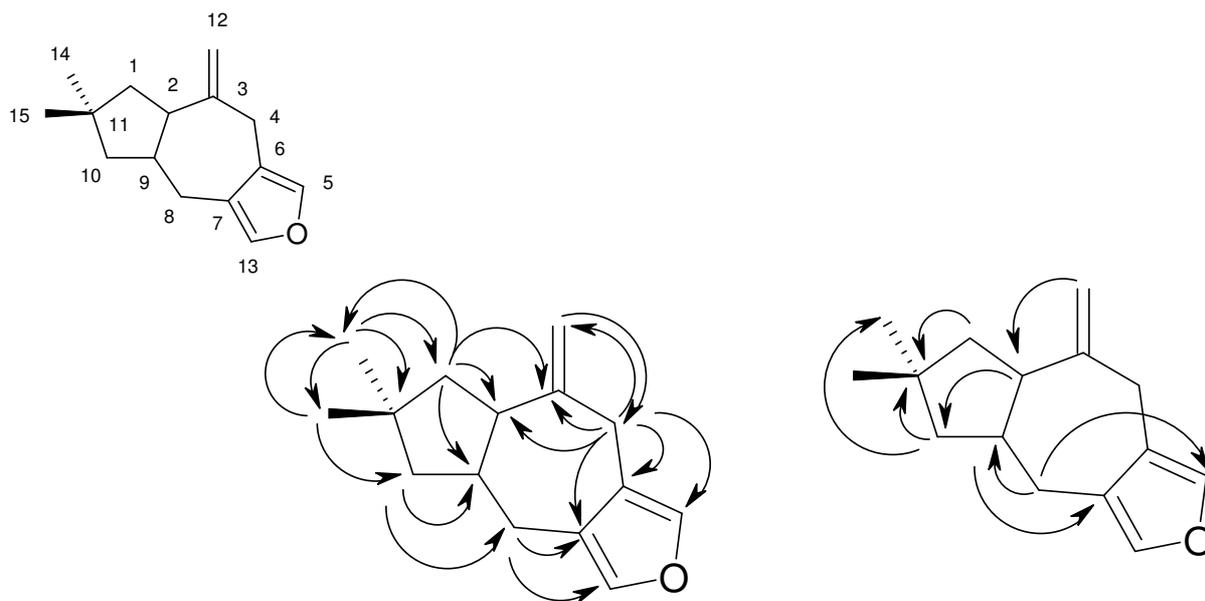


**Abb. 42:**  $^1\text{H-NMR}$  von 11,12-Dimethyl-9-methylen-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-31) (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Mittels zweidimensionaler NMR-Techniken (HMQC-, HMBC-, HH-COSY) konnten weitere Strukturzusammenhänge aufgeklärt werden. Leider erwies sich diese Verbindung **H-31** in Deuteriochloroform als relativ instabil, sodass kein NOESY-Spektrum aufgenommen werden konnte.

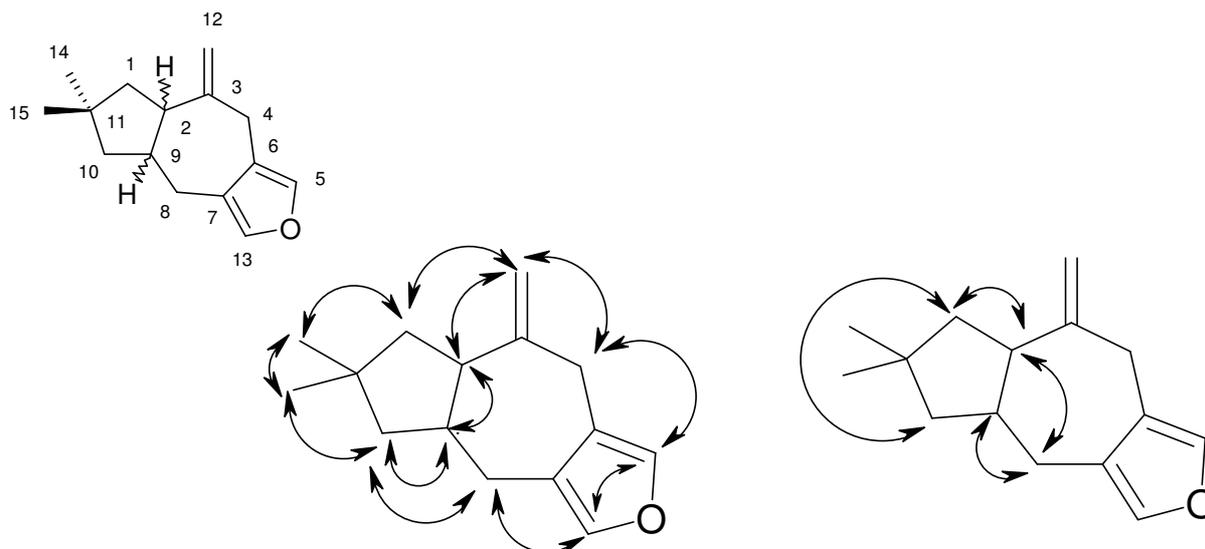
Zum HMBC-Spektrum (Abb. 43) ist folgendes anzumerken:

- Die beiden olefinischen Protonen des Furanringes H-5 und H-13 zeigen im HMBC-Spektrum keine Kopplungen mit C-Atomen. Es sind nur Kopplungen von benachbarten Protonen zu den Kohlenstoffatomen dieser Methingruppen (C-5 und C-13) wahrnehmbar.
- Die gleiche Situation beobachtet man bei den nicht-olefinischen, angulären Methinprotonen H-2 und H-9. Auch diese lassen im HMBC-Spektrum keine Spin-Spin-Kopplung mit C-Kernen erkennen.
- Da sich die  $^{13}\text{C}$ -Signale von C-5 und C-13 überlagern, lassen sich die Kopplungen mit diesen Kernen nur bedingt auswerten.



**Abb. 43: HMBC-Kopplungen der Komponente H-31.**

Im HH-COSY-Spektrum wurden die in den folgenden Sätzen abgebildeten Spin-Spin-Kopplungen nachgewiesen:



Die beobachteten HH-Kopplungen unterstützen den postulierten Strukturvorschlag für die Verbindung (**H-31**).

Als letzter Punkt ist die Stereochemie an den beiden Chiralitätszentren C-2 und C-9 zu klären. Leider standen hierzu, wie schon erwähnt die Informationen aus dem NOE-Experiment nicht zur Verfügung. Somit blieb nur die Möglichkeit, die Spin-Spin-Kopplung der Kerne H-2 und H-9 zu untersuchen. Da im Molekülmodell der Torsionswinkel entweder etwa  $0^\circ$  beträgt (*cis*-Kopplung) oder ca.  $180^\circ$  (*trans*-Kopplung), erscheint eine sichere sterische Differenzierung anhand der Kopplungskonstante  $^3J_{H-2, H-9}$  ohne konkrete Vergleichsdaten nicht möglich, da die Karplus-Beziehung für beide Fälle vergleichbare Kopplungswerte angibt.

Die beobachtete Größe der Kopplung zwischen den Protonen H-2 und H-9 betrug 11.18 Hz und läßt beide sterischen Konfigurationen zu.

Die isolierte Pilzkomponente **H-31** wurde erstmals von *Froberg et al.*<sup>122</sup> beschrieben. Die Autoren erwähnten sie als eine Substanz, die als Syntheseprodukt in einer Produktmischung enthalten war, machten aber keine Angaben zur Stereochemie. Spektroskopische Vergleichsdaten wurden von ihnen nicht genannt.

Somit ist nun aus Fruchtkörpern des Baumpilzes *Heterobasidion annosum* gewonnene (**H-31**) erstmals als Naturstoff nachgewiesen worden; zudem wurden die kompletten  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten verfügbar gemacht.

Für diesen neuen Naturstoff **H-31** wird hier der Name Lacterofuran vorgeschlagen.

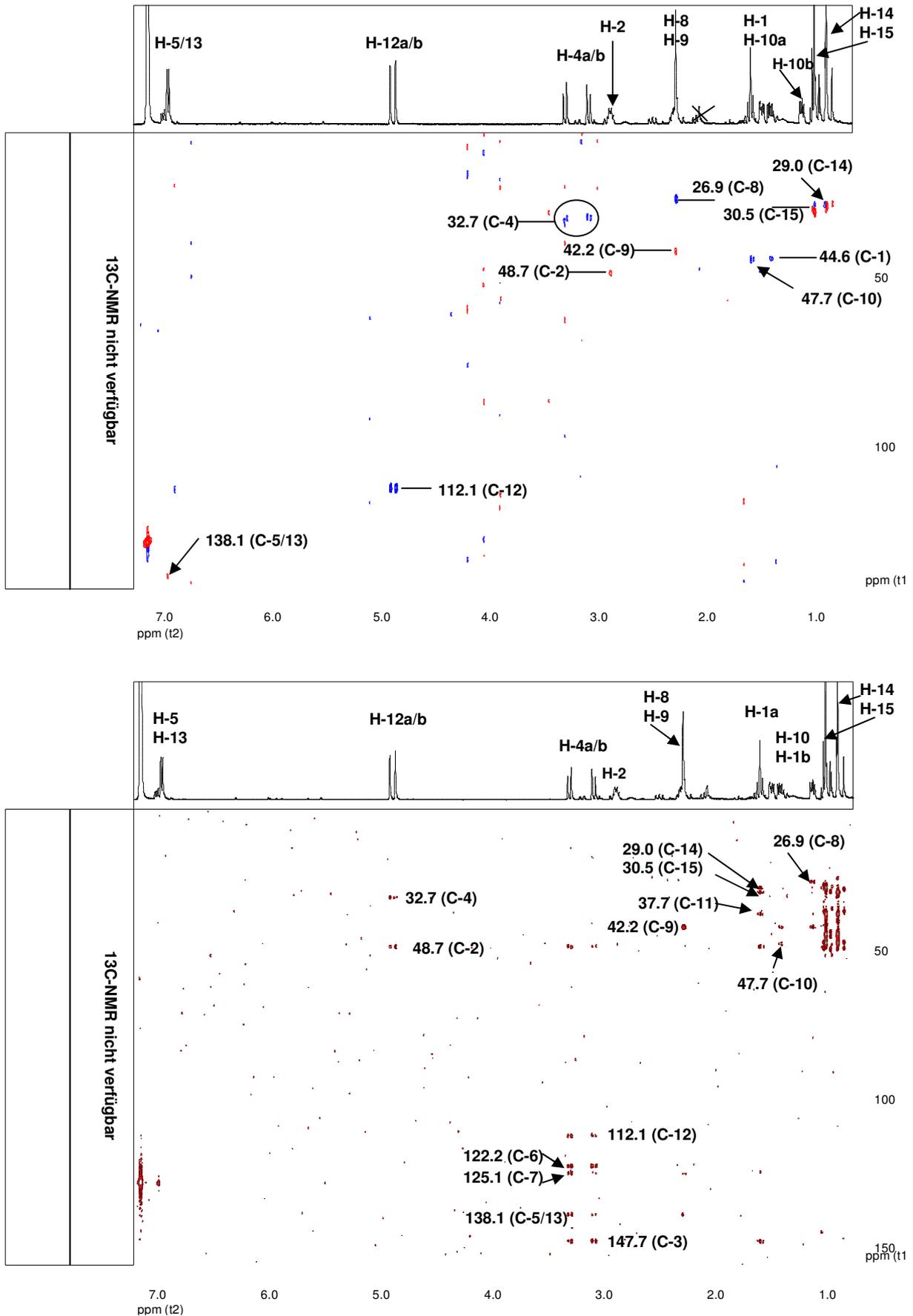
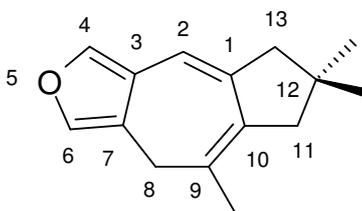
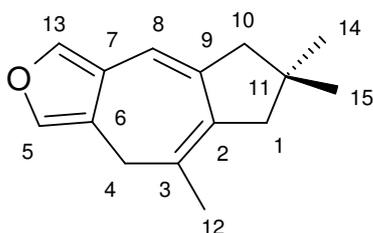


Abb. 44: HMQC- und HMBC-Spektrum von 11,12-Dimethyl-9-methylen-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-31) (500.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

**9,12,12-Trimethyl-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-1,3,6,9-tetraen (H-34)****H-34**

Sesquiterpen-Nomenklatur

IUPAC

Als dritte Verbindung konnte die Substanz **H-34** aus der Pentanfraktion des Wasserdampfdestillates von *Heterobasidion annosum* isoliert werden (siehe Schema Abb. 32).

Im EI-MS (vgl. Abb. 45) fallen zwei intensive Peaks im höheren Massenbereich auf, die das Spektrum dominieren: Der Peak mit der Nominalmasse 214, der zugleich den Basispeak repräsentiert, stellt wahrscheinlich das Molekülion dar;  $m/z$  199 (80%) wird durch Abspaltung einer Methylgruppe gebildet. Die Intensitätsverteilung der Ionen deutet auf ein stabiles, polycyclisches System hin.

Die HR-MS-Messung gibt für das Molekülion  $m/z$  214 eine Summenformel von  $C_{15}H_{18}O$  an (Abweichung: 0,2 mmu); daraus resultiert für diese Verbindung eine Anzahl von sieben Doppelbindungsäquivalenten.

Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge dieser Verbindung, konnten die  $^{13}C$ -NMR-Daten nur aus den HMQC- und HMBC-Spektren ermittelt werden. Insgesamt war eine Anzahl von 15 Kohlenstoffen und 18 Protonen in den NMR-Spektren nachzuweisen, was die molekulare Zusammensetzung von  $C_{15}H_{18}O$  bestätigt. Die  $\delta$ -Werte der einzelnen Kohlenstoffsignale, Ihre Multiplizität, sowie die entsprechenden  $^1H$ -NMR-Daten sind in Tab. 19 aufgeführt.

Im olefinischen  $^{13}C$ -NMR-Bereich waren die Signale von acht Kohlenstoffen sichtbar ( $\delta$ = 113.89 ppm, d, C-8; 123.66, s, C-7; 124.88, s, C-6; 128.54, s, C-3; 135.63, s, C-2; 137.09, d, C-5; 139.29, d, C-13 und 142.22, s, C-9). Diese Kohlenstoffsignale belegen das Vorliegen von vier Doppelbindungen. Daraus ergibt sich für das Molekül eine Anzahl von drei Ringen.

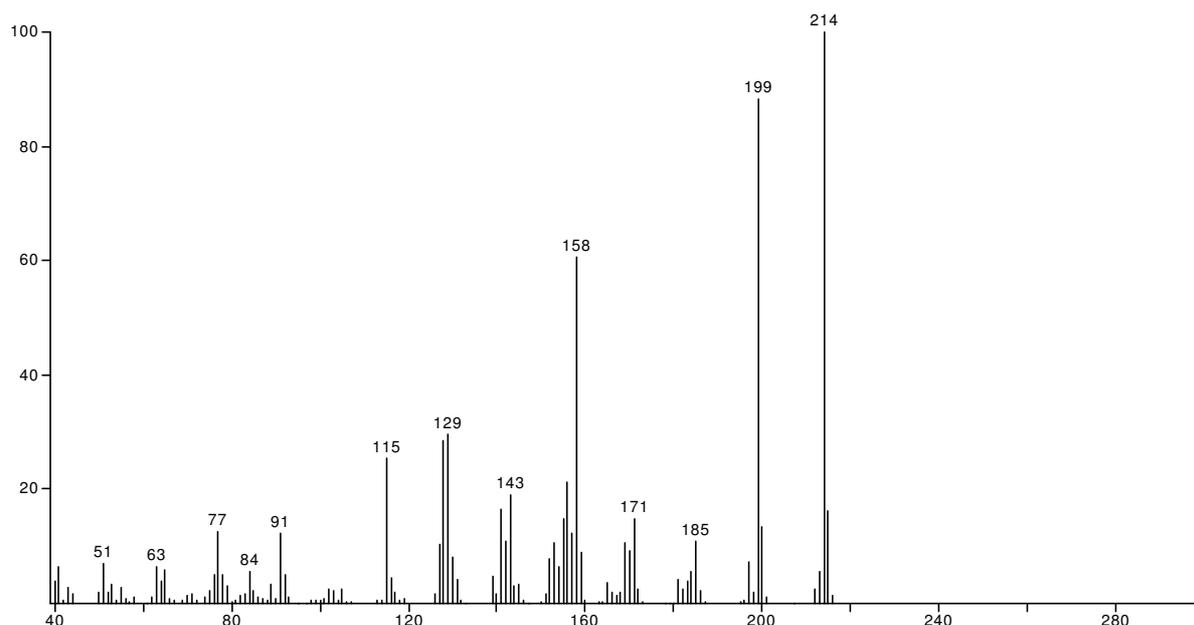


Abb. 45: EI-Massenspektrum von 9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-1,3,6,9-tetraen (H-34).

Nr.	<sup>13</sup> C-NMR (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) in ppm bei 125.77 MHz	C-Atom	Strukturelement	<sup>1</sup> H-NMR-Daten (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) in ppm bei 500.13 MHz
1	22.81 q	12	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.65 s
2	28.6 q	14	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.96 s
3	28.6 q	15	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.96 s
4	30.86 t	4	-CH <sub>2</sub> -	2H, 3.04 s
5	35.75 s	11	>C<	
6	47.96 t	1	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.1 s
7	51.4 t	10	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.22 d, <i>J</i> = 1.1 Hz (long range mit H-1/H-13)
8	113.89 d	8	=CH-	1H, 6.3 s
9	123.66 s	7	>C=	
10	124.88 s	6	>C=	
11	128.54 s	3	>C=	
12	135.63 s	2	>C=	
13	137.09 d	5	=CH-	1H, 6.88 s
14	139.29 d	13	=CH-	1H, 7.13 s
15	142.22 s	9	>C=	

Tab. 19: Zuordnung der NMR-Signale von 9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-1,3,6,9-tetraen (H-34).

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 46) zeigt im olefinischen Bereich drei Protonen (H-13, δ = 7.13 ppm, s (evtl. überlagert vom Lösungsmittelpeak); H-5, 6.88, s; H-8, 6.3, s).

Damit muß das Molekül fünf quartäre, olefinische C-Atome enthalten.

Im mittleren  $\delta$ -Bereich von 1.65 bis 3.04 ppm sind vier Singulettsignale erkennbar, die neun Protonen entsprechen: H-4,  $\delta$ = 3.04 ppm, s, -CH<sub>2</sub>-; H-10, 2.22, d, -CH<sub>2</sub>-; H-1, 2.1, s, -CH<sub>2</sub>-; H-12, 1.65, s, -CH<sub>3</sub>. Im Hochfeldbereich schließt sich ein scharfes Singulett aus sechs Protonen an, das zwei überlagerten Methylgruppen entspricht (H-14 und H-15 bei 0.96 ppm), welche folglich beide an einem quartären C-Atom positioniert sein müssen.

Zu diesem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sind folgende Anmerkungen zu machen:

- Die Methylenprotonen H-10 weisen im HH-COSY-Spektrum eine long-range-Kopplung mit H-1 (<sup>4</sup>J<sub>H-10, H-1</sub>, W-Anordnung) und H-13 (<sup>6</sup>J<sub>H-10, H-13</sub>, konjugiertes System) auf und zeigen eine angedeutete Dublettstruktur.
- Alle weiteren Protonensignale liegen als Singuletts vor, zum Teil allerdings verbreitert (H-1 und H-13).

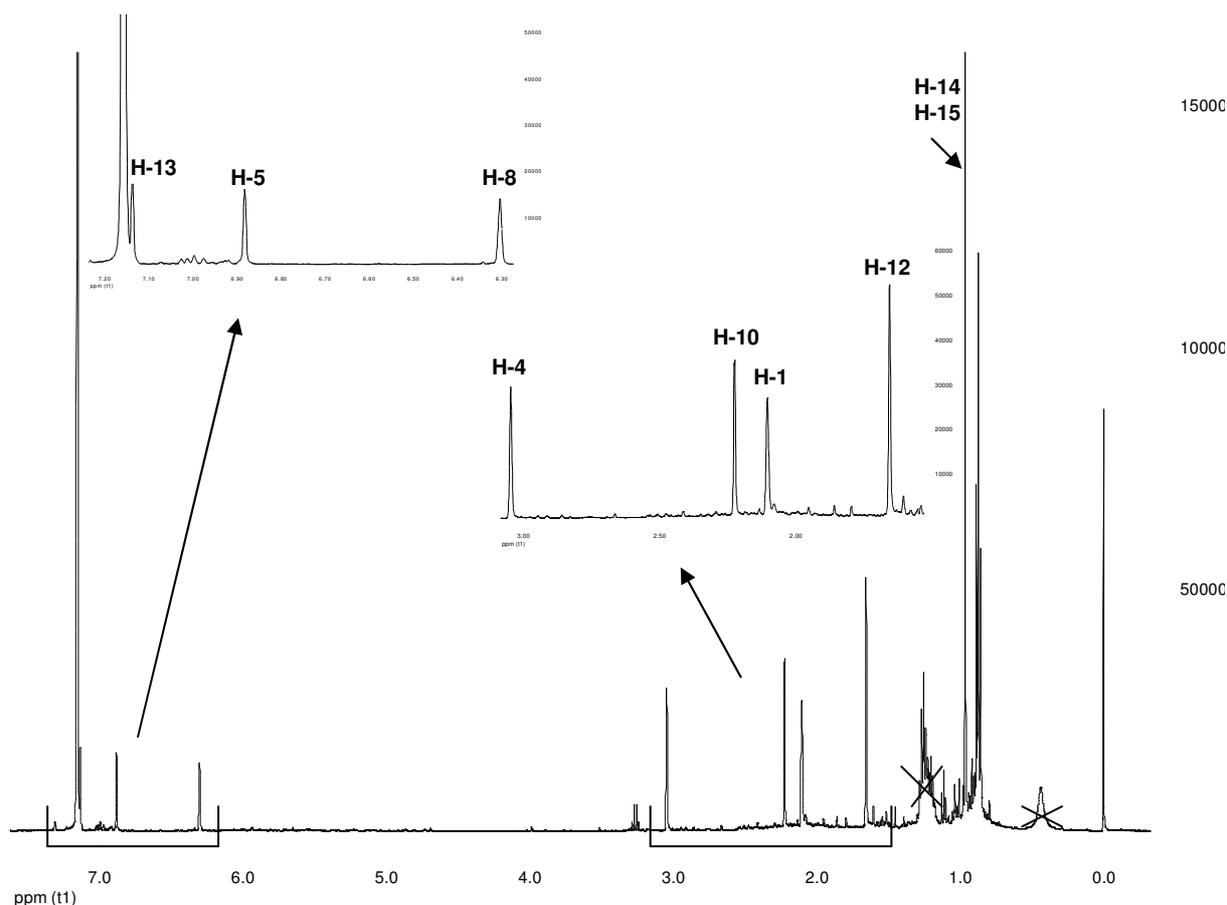
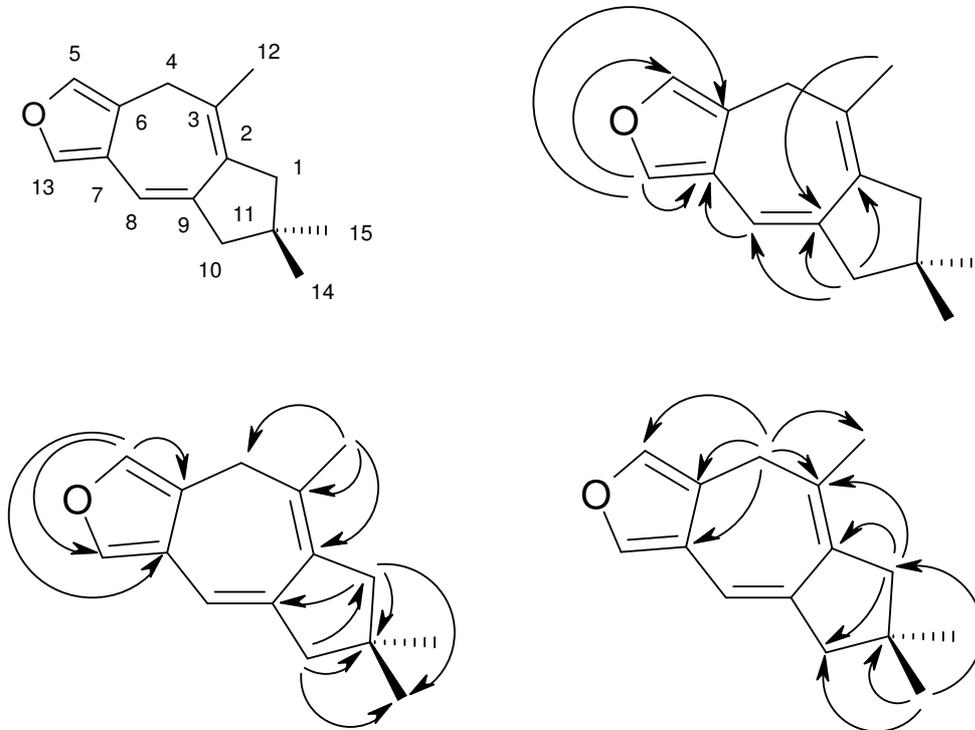


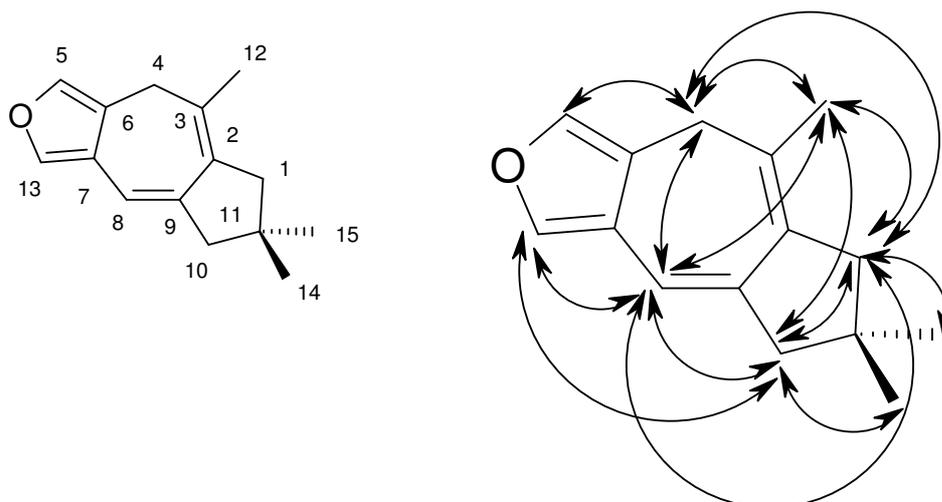
Abb. 46: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-1,3,6,9-tetraen (H-34) (500.13 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

Eine detaillierte Strukturaufklärung erfolgte anhand von HMQC-, HMBC- und HH-COSY-Spektren.

Die im Molekül zu beobachtenden HMBC-Kopplungen sind in den folgenden Skizzen wiedergegeben:



Die wichtigsten dem HH-COSY-Spektrum zu entnehmenden Kopplungen sind in den folgenden Zeichnungen dargestellt:



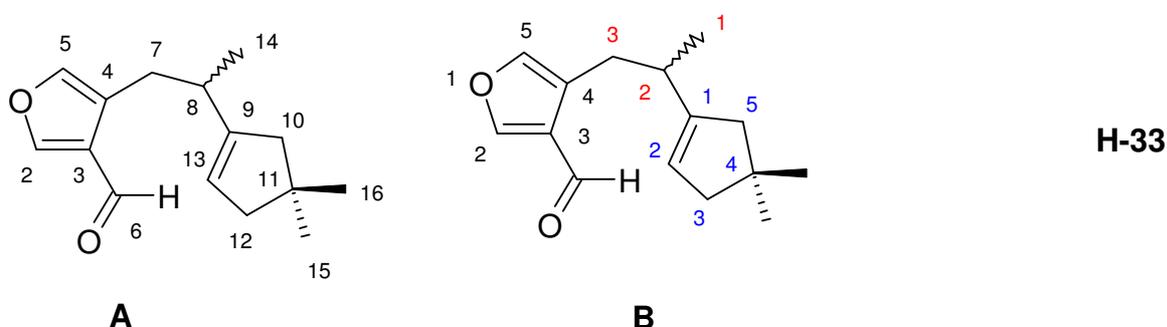
Zu den im HH-COSY-Spektrum gefunden Kopplungen sind folgende Anmerkungen zu machen:

- Alle im Spektrum nachgewiesenen Crosspeaks waren sehr klein, was darauf zurückzuführen ist, dass im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum praktisch nur long-range-Kopplungen zu beobachten sind.
- Die im COSY-Spektrum registrierten Kopplungen stehen im Einklang mit der abgeleiteten Struktur der Komponente **H-34**.

Die so erhaltene Struktur konnte über die CAS-Datenbank als bereits bekannt identifiziert werden. Sie wurde von Sterner et al.<sup>123</sup> als Zersetzungsprodukt von Velutinal Derivaten (vgl. Kap. 4.2.4) beschrieben, welche bei der Chromatographie an Kieselgel auftreten. Der Autor hat aber keine MS- und NMR-Daten dieser Substanz publiziert. Herr Prof. Olov Sterner (Universität Lund, Schweden) stellte mir allerdings die  $^1\text{H-NMR}$  und MS-Daten dieser Verbindung freundlicher Weise zur Verfügung. Ein Vergleich dieser MS- und  $^1\text{H-NMR}$ -Daten mit denen der aus *Heterobasidion* isolierten Komponente **H-34** ergab ein hohes Maß an Übereinstimmung.

Im Massenspektrum gab es nur Unterschiede in den Intensitäten der Signale. Beim NMR-Spektrum waren geringe Abweichungen in den chemischen Verschiebungen sichtbar, die vermutlich darauf zurückzuführen sind, dass die Referenzdaten in einem anderen Lösungsmittel aufgenommen wurden.  $^{13}\text{C-NMR}$ -Informationen lagen leider nicht vor. Weder die  $^{13}\text{C-NMR}$ -, noch die  $^1\text{H-NMR}$ -Daten sind bisher publiziert worden. Anhand der spektroskopischen Vergleichdaten konnte bestätigt werden, dass es sich bei der Verbindung **H-34** um 9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-1,3,6,9-tetraen handelt.

### Lactaral (H-33)



A: Bezifferung nach Magnusson et al.<sup>124</sup>

B: IUPAC 4-[2-(4,4-Dimethylcyclopent-1-enyl)propyl]furan-3-carbaldehyd.

Die zweite säulenchromatographische Fraktion des Wasserdampfdestillates von *Heterobasidion annosum* (vgl. Schema Abb. 32), wurde durch präparative Kapillar-GC aufgetrennt und die hier beschriebene Verbindung **H-33** isoliert.

Das EI-Massenspektrum dieser Komponente (Abb. 47) läßt einen Molekülpeak bei  $m/z$  232 vermuten:  $m/z$  217 ( $M^+ -15$ , -  $\text{CH}_3$ ),  $m/z$  214 ( $M^+ -18$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ),  $m/z$  204 ( $M^+ -33$ , -  $\text{CH}_3$ , -  $\text{H}_2\text{O}$ ),  $m/z$  199 ( $M^+ -33$ , -  $\text{CH}_3$ , -  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Die beobachteten Massendifferenzen von 28 Dalton lassen zwar die Abspaltung von CO vermuten, sind aber nicht ganz eindeutig, da CO und  $\text{C}_2\text{H}_4$  isobar sind und keine HR-MS-Daten vorlagen. Bei einer Interpretation als CO kann aus den Sequenzen  $m/z$  232, 214, 186 und  $m/z$  232, 204, 186 geschlossen werden, dass diese Verbindung zwei Sauerstoffatome enthält.

Dann würde sich für **H-33** eine molekulare Zusammensetzung von  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$  ergeben. Diese Summenformel konnte durch Auswertung des  $^{13}\text{C}$ -Pendant- und HMQC-Spektrums bestätigt werden, d.h. die Komponente enthält 15 Kohlenstoffatomen und 20 Protonen. Die  $\delta$ -Werte der einzelnen C-Signale, ihre Multiplizität, sowie die entsprechenden  $^1\text{H}$ -NMR-Daten sind in Tab. 20 aufgeführt.

Entsprechend dieser Daten muß die diskutierte Verbindung sechs Doppelbindungs-äquivalente besitzen.

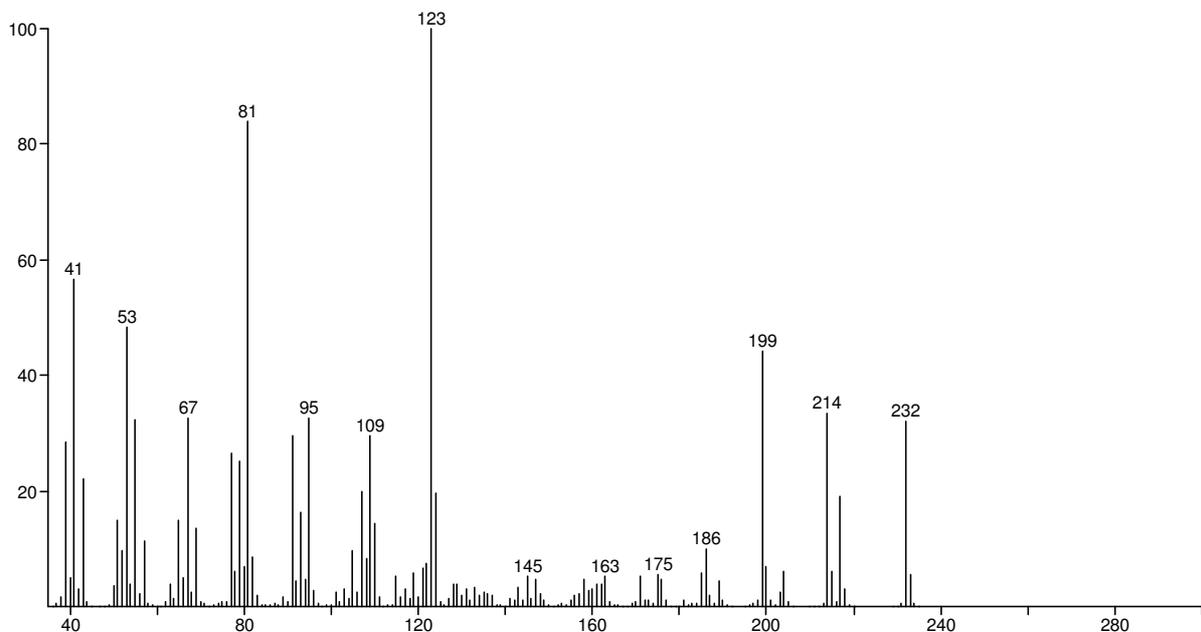


Abb. 47: EI-Massenspektrum von Lactaral (H-33).

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (vgl. Abb. 84 im Spektrenanhang) zeigt im tiefen Feld sechs olefinische Kohlenstoffe ( $\delta = 122.7$  ppm, d, C-13; 122.98, s, C-4; 127.5, s, C-3; 142.64, d, C-5; 148.79, s, C-9; 153.46, d, C-2) und ein Carbonyl-Kohlenstoff in Form einer Aldehydgruppe (185.69, d, C-6). Daraus leitet sich für diese Verbindung die Anzahl von vier Doppelbindungen ab. Unter Berücksichtigung der Gesamtzahl von sechs Doppelbindungsäquivalenten muß die vorliegende Verbindung dann zwei Ringe im Molekül enthalten.

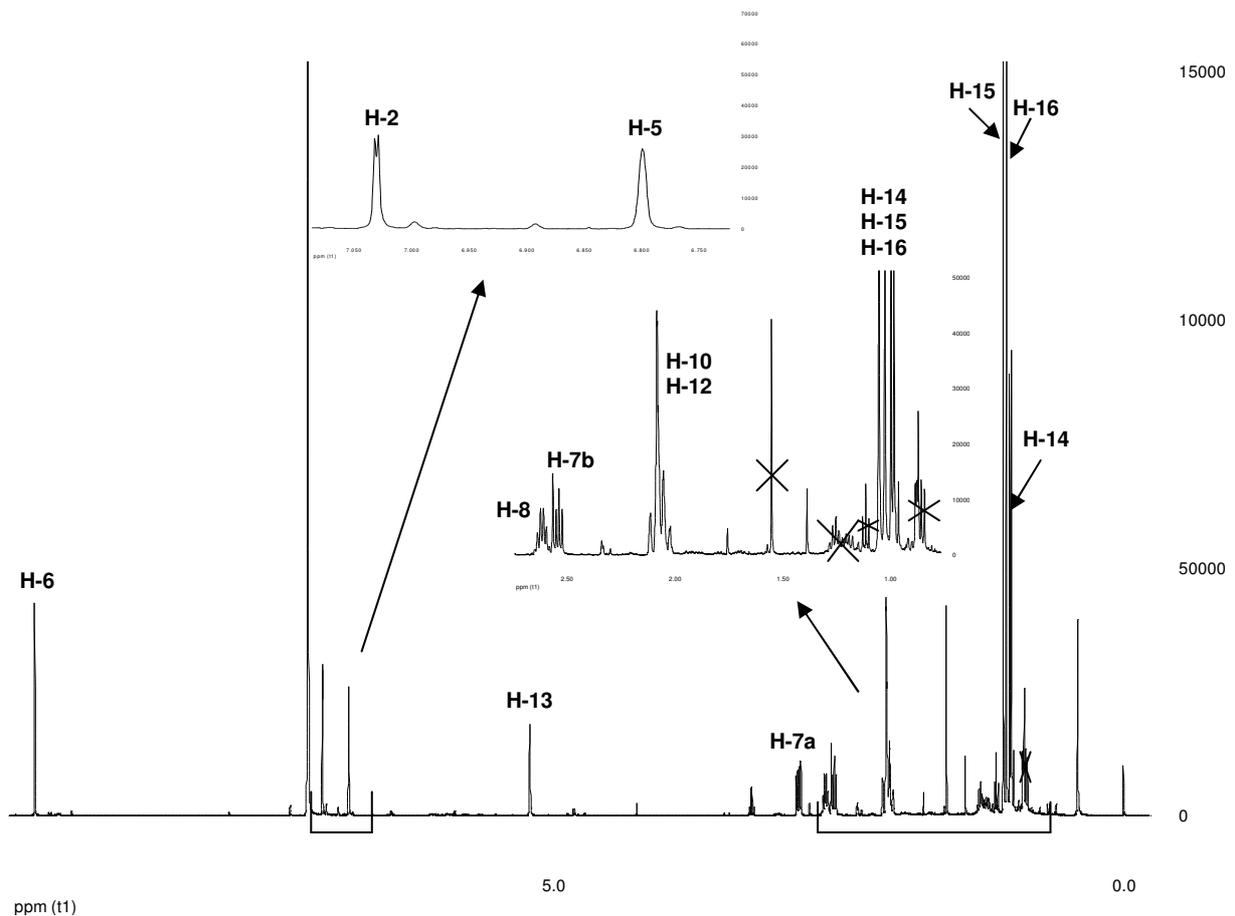
Nr.	$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) in ppm bei 125.77 MHz	C-Atom	Strukturelement	$^1\text{H}$ -NMR-Daten ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) in ppm bei 500.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	19.46 q	14	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.99 d	$^3J_{\text{H-14, H-8}} = 6.9$
2	30.03 t	7	-CH <sub>2</sub> -	H-7a, 2.85 dd H-7b, 2.54 dd	$^2J_{\text{H-7a, H-7b}} = 13.8$ $^3J_{\text{H-7a, H-8}} = 6.6$ $^2J_{\text{H-7b, H-7a}} = 13.8$ $^3J_{\text{H-7b, H-8}} = 7.2$
3	30.13 q	15	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.05 s	
4	30.22 q	16	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.02 s	
5	35.71 d	8	>CH-	1H, 2.61m	$^3J_{\text{H-8, H-7a}} = 6.6$ $^3J_{\text{H-8, H-14}} = 6.9$ $^3J_{\text{H-8, H-7b}} = 7.4$
6	38.82 s	11	>C<		
7	47.89 t	10	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.08 m	
8	47.89 t	12	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.08 m	
9	122.7 d	13	=CH-	1H, 5.2 br s	
10	122.98 s	4	>C=		
11	127.5 s	3	>C=		
12	142.64 d	5	=CH-	1H, 6.8 s	
13	148.79 s	9	>C=		
14	153.46 d	2	=CH-	1H, 7.03 d	$^5J_{\text{H-2, H-5}} = 1.36$ Hz
15	185.69 d	6	-CHO	1H, 9.55 s	

**Tab. 20: Zuordnung der NMR-Signale von Lactaral (H-33).**

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abb. 48) zeigt ein stark tieffeldverschobenes Proton bei  $\delta = 9.55$  ppm (H-6, s), welches von einer Aldehydgruppe herrührt. Daran schliessen sich im olefinischen Bereich drei Protonen an: H-2,  $\delta = 7.03$  ppm, d ( $^5J_{\text{H-2, H-5}} = 1.36$  Hz); H-5, 6.8 ppm, s und H-13, 5.2 ppm, br s.

Die beiden geminalen Protonen H-7a und H-7b sind chemisch nicht äquivalent und treten bei verschiedenen  $\delta$ -Werten auf ( $\delta = 2.85$  und 2.54 ppm). Das Proton H-7a ist durch eine geminale Kopplung ( $^2J_{\text{H-7a, H-7b}} = 13.8$  Hz) und eine vicinale Kopplung

( $^3J_{\text{H-7a, H-8}} = 6.6 \text{ Hz}$ ) zu einem Doppeldublett aufgespalten. Das Schwesterproton H-7b zeigt ein ineinander verschachteltes Doppeldublett mit  $^2J_{\text{H-7b, H-7a}} = 13.8 \text{ Hz}$  und  $^3J_{\text{H-7b, H-8}} = 7.2 \text{ Hz}$ . Die unterschiedlichen Kopplungskonstanten der beiden Methylenprotonen H-7a/b deuten darauf hin, dass keine freie Drehbarkeit um die Bindungsachse C-7/C-8 vorliegt.



**Abb. 48:**  $^1\text{H-NMR}$  von Lactaral (500.13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

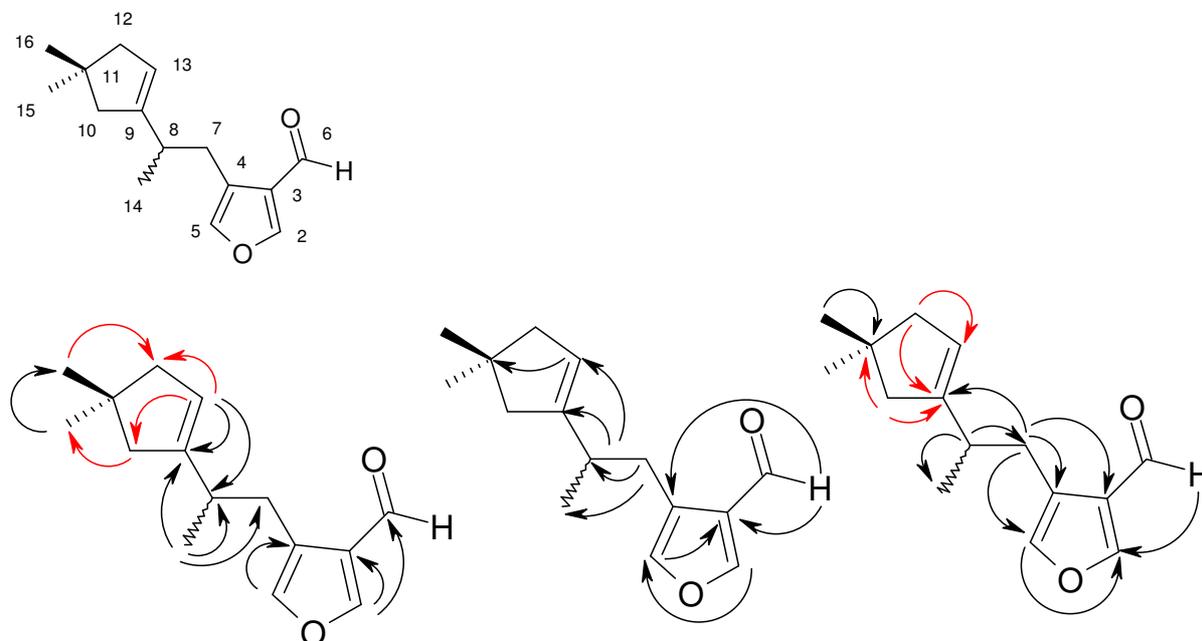
Das Methinproton H-8 erscheint als Multiplett von etwa sechs Peaks, die sich über einen  $\delta$ -Bereich von 2.65 bis 2.57 ppm erstrecken und ist zwischen H-7a und H-7b lokalisiert. Es weist folgende Kopplungen auf, die an den Kopplungspartnern erkennbar sind:  $^3J_{\text{H-8, H-7a}} = 6.6 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H-8, H-7b}} = 7.4 \text{ Hz}$  und  $^3J_{\text{H-8, H-14}} = 6.9 \text{ Hz}$ .

Die Protonen der beiden Methylengruppen H-10 und H-12 zeigen ein stark überlagertes Multiplettsignal ( $\delta = 2.1$  bis  $2.01 \text{ ppm}$ ).

Im Hochfeldbereich sind die Signale von drei Methylgruppen sichtbar: H-15 ( $\delta = 1.05 \text{ ppm}$ , s); H-16 ( $1.02$ , s) und H-14 ( $0.99 \text{ ppm}$ ), welche zu einem Dublett mit  $^3J_{\text{H-14, H-8}} = 6.9 \text{ Hz}$  aufspaltet.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurden HMQC-, HMBC-, HH-COSY- und NOESY-Spektren ausgewertet.

Die im Molekül zu beobachtenden HMBC-Kopplungen sind in den folgenden Skizzen wiedergegeben:



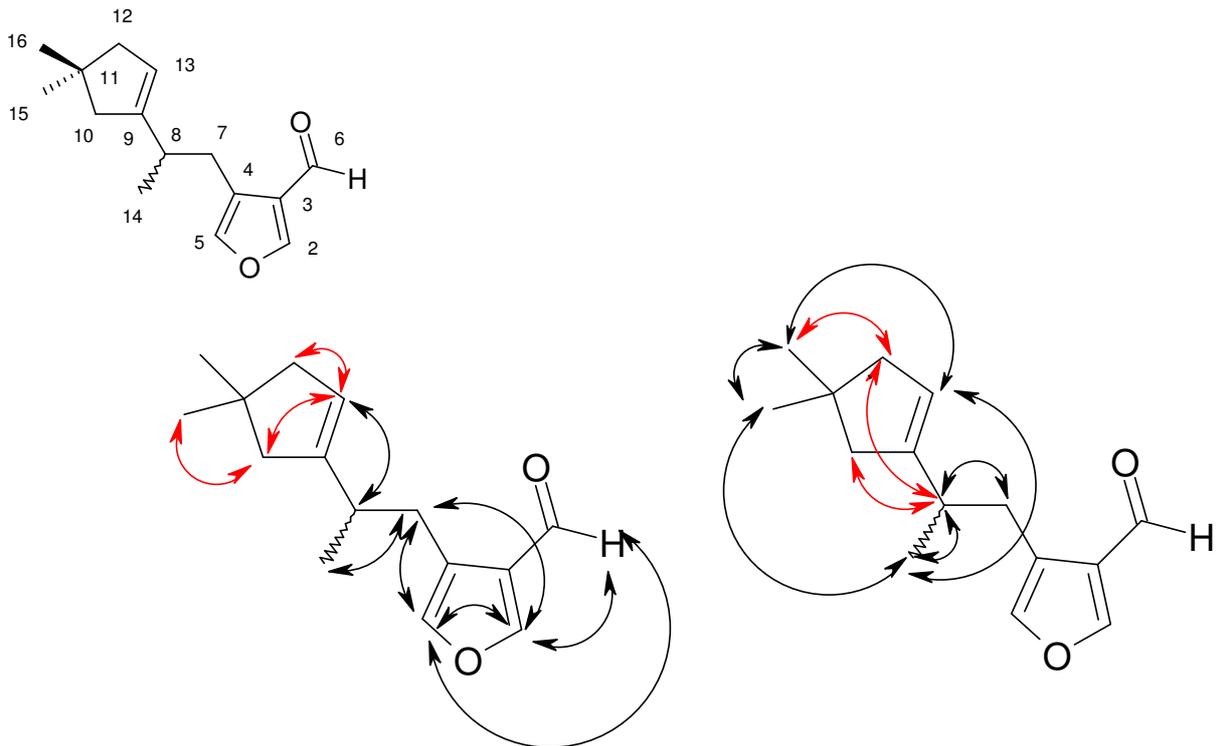
Zu der HMBC-Auswertung ist folgendes anzumerken:

- Alle erhaltenen HMBC-Daten stehen mit der postulierten Struktur in Einklang.
- Die Analyse wurde durch die Überlagerung der Protonen der beiden Methylengruppen H-10 und H-12 erschwert, da alle Kopplungen von diesen Protonen und zu diesen C-Atomen (C-10/C-12) nicht eindeutig waren. Die entsprechenden Pfeile sind deshalb in den obigen Skizzen rot eingefärbt.

Dieser letzte Punkt betrifft auch die HH-COSY-Auswertung. Entsprechend sind auch hier die nicht eindeutigen Kopplungen in den folgenden Skizzen rot unterlegt.

Als Fazit ist festzuhalten, dass auch die Ergebnisse der HH-COSY-Analyse die abgeleitete Struktur der isolierten Komponente **H-33** bestätigen.

Hinzuweisen ist abschließend noch auf eine sehr weitreichende long-range-Kopplung, die zwischen den Methylgruppen H-14 und H-16 im COSY-Spektrum beobachtet werden konnte ( ${}^7J_{\text{H-14, H-16}}$ ). Dies mag über einen W-Mechanismus erklärbar sein.

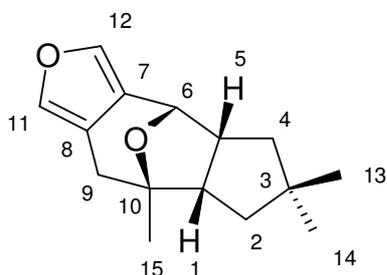


Die gefundene Struktur ist auch kompatibel mit der massenspektrometrischen Fragmentierung dieser Verbindung (vgl. Abb. 47): Der Basepeak  $m/z$  123 erklärt sich durch eine energetisch besonders günstige Spaltung der Bindung C-7/C-8 („doppelte“ Allylspaltung; C-8 als tertiäres Kohlenstoffatom). Auch das entsprechende Komplementärion  $m/z$  109 tritt im Spektrum auf, allerdings mit deutlich geringerer Intensität (28 %). Wahrscheinlich entsteht das intensive Fragment  $m/z$  81 (Int. 90%) aus dieser Ionenspezies durch Eliminierung eines Neutralteilchens der Nominalmasse 28, welches in diesem Fall als CO zu interpretieren ist.

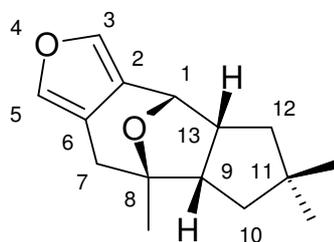
Diese aus dem Wasserdampfdestillat des Baumpilzes *Heterobasidion annosum* isolierte Komponente **H-33** erwies sich nicht als ein neuer Naturstoff. Sie wurde bereits von *Magnusson et. al.*<sup>124</sup> aus einem Hexanextrakt der Hutpilze (Milchlinge) *Lactarius vellereus* und *L. pergamenus* isoliert und mit dem Namen Lactaral belegt. Die von diesen Autoren publizierten NMR-Daten (<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR) stimmten mit denen der untersuchten Verbindung überein.

Dieses ist das erste Mal, dass dieser Aldehyd in einem Wasserdampfdestillat nachgewiesen wurde. Besonders hervorzuheben ist auch die Tatsache, dass dieser Naturstoff hier erstmalig bei einem Vertreter der pilzlichen Ordnungsgruppe der *Aphylophoranae* aufgefunden wurde.

**Furanether A / (1S, 13R, 9S, 8S)- 8,11,11-Trimethyl-4,14-dioxatetracyclo[6.5.1.0<sup>2,6</sup>.0<sup>9,13</sup>]tetradeca-2,4-dien (H-32)**



Sesquiterpen-Nomenklatur



IUPAC

**H-32**

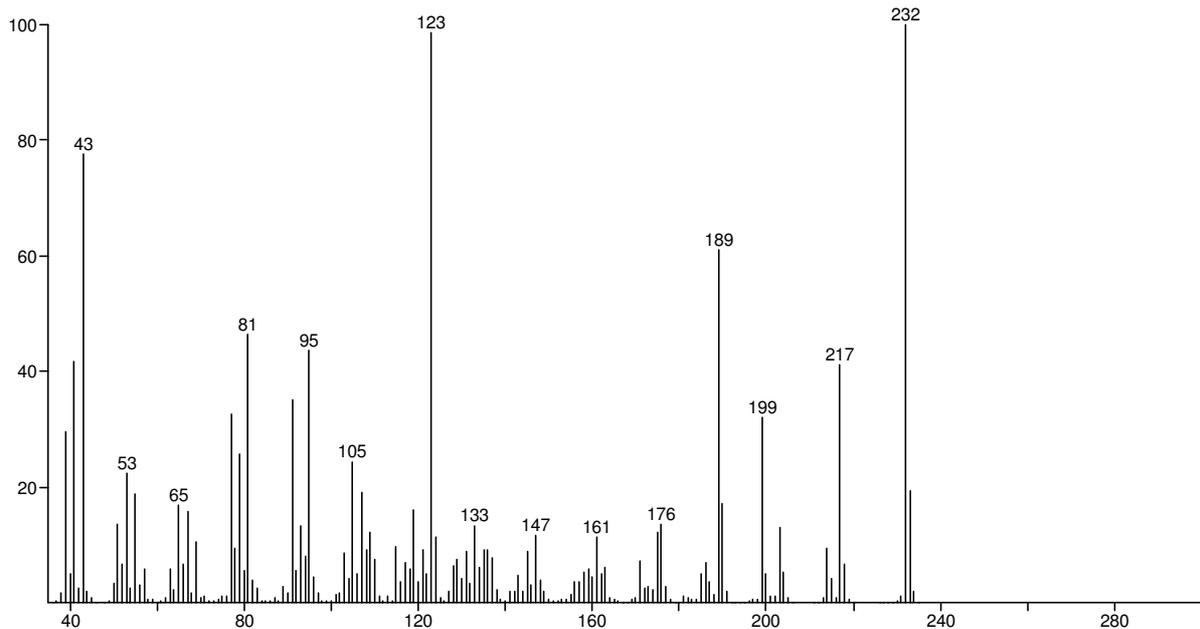
Aus der dritten Pentan-Fraktion der säulenchromatographischen Trennung des Wasserdampfdestillates von *Heterobasidion annosum* an Kieselgel (vgl. Schema Abb. 33), wurde über die präparative Kapillar-GC, die Verbindung **H-32** isoliert.

Das EI-Massenspektrum dieser Komponente (Abb. 49) läßt einen Molekülpeak bei  $m/z$  232 vermuten. Ein Vergleich mit dem EI-Massenspektrum der Komponente **H-33** (Lactaral) zeigte deutliche Übereinstimmungen im Fragmentierungsmuster. So treten auch hier die Ionen  $m/z$  217 ( $M^+ -15$ ),  $m/z$  214 ( $M^+ -18$ ),  $m/z$  204 ( $M^+ -28$ ),  $m/z$  199 ( $M^+ -33$ ) auf. Ausserdem weist auch hier das Teilchen  $m/z$  123 eine sehr hohe Intensität (Int. 98 %) auf und es ist zudem ein intensives Fragment der Nominalmasse  $m/z$  81 erkennbar.

Diese Beobachtungen lassen für die Komponente **H-33** ebenfalls das Vorliegen eines doppelt oxygenierten Sesquiterpenkohlenwasserstoffs mit der molekularen Zusammensetzung von  $C_{15}H_{20}O_2$  vermuten. Allerdings deutet die hohe Intensität des  $M^+$  (Basispeak) im Gegensatz zum Lactaral **H-33** auf ein stabileres Molekül, etwa ein polycyclisches System aus ankondensierten Ringen, hin.

Die angenommene Summenformel konnte durch Auswertung des  $^{13}C$ -Pendant- und HMQC-Spektrums bestätigt werden. Insgesamt wurden 15 Kohlenstoffatomen und 20 Protonen gefunden. Die  $\delta$ -Werte der einzelnen C-Signale, ihre Multiplizität, sowie die entsprechenden  $^1H$ -NMR-Daten sind in Tab. 21 aufgeführt.

Entsprechend dieser Daten muß die vorliegende Verbindung sechs Doppelbindungs-äquivalente besitzen.



**Abb. 49: EI-MS von Furanether A (H-32)**

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (vgl. Abb. 85 im Spektrenanhang) zeigt im tiefen Feld die Signale von vier olefinischen Kohlenstoffen ( $\delta=138.04$  ppm, d, C-11; 136.82, d, C-12; 124.38, s, C-8; 118.75, s, C-7). Daraus leitet sich für diese Verbindung die Existenz von zwei Doppelbindungen ab. Entsprechend der Gesamtzahl von sechs Doppelbindungsäquivalenten muß die Verbindung folglich vier Ringe im Molekül enthalten.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abb. 50) zeigt im olefinischen Bereich die Signale von zwei Protonen: H-11, ( $\delta= 6.89$  ppm) und H-12 (6.8 ppm) als Singulett.

Das Methinproton H-6 zeigt mit  $\delta= 4.82$  ppm eine starke Tieffeldverschiebung und spaltet mit einer geminalen Kopplung von  $^3J_{\text{H-6, H-5}} = 6.9$  Hz zum Dublett auf. Die starke chemische Verschiebung deutet auf die Nähe zu einem Sauerstoffatom hin.

Im mittleren  $\delta$ -Bereich ( $\delta= 3.1$  bis 2.2 ppm) sind die Signale von vier Protonen sichtbar: H-5 ( $\delta= 3.03$  ppm, m), H-1 (2.62, m), H-9a (2.55, dd) und H-9b (2.31, d).

Das Methinproton H-5 ( $\delta= 3.03$  ppm) spaltet zu einem komplexen Multiplett auf (Spin-Spin-Kopplungen mit allen vicinalen Protonen: H-1, H-4a/b, H-6, vgl. COSY-Skizzen).

Der Kopplungspartner H-1 ( $\delta= 2.62$  ppm) läßt ein symmetrisches, aus sechs Linien bestehendes Multiplett erkennen, welches als doppeltes Doppeldublett (ddd)

interpretiert werden kann ( ${}^3J_{H-1, H-2a} = 8.1$  Hz,  ${}^3J_{H1, H-2b} = 11.7$  Hz und  ${}^3J_{H-1, H-5} = 11.7$  Hz) (vgl. Abb. 51).

Nr.	${}^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) in ppm bei 125.77 MHz	C-Atom	Strukturelement	${}^1\text{H-NMR-Daten}$ ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) in ppm bei 500.13 MHz	
1	28.14 q	13	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.88 s	
2	29.1 q	15	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.38 s	
3	29.53 q	14	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.84 s	
4	31.01 t	9	-CH <sub>2</sub> -	H-9a, 2.55 dd H-9b, 2.31 d	${}^4J_{H-9a, H-11} = 1.65$ ${}^2J_{H-9a, H-9b} = 16.1$ ${}^2J_{H-9b, H-9a} = 16.1$
5	40.88 t	4	-CH <sub>2</sub> -	H-4a, 1.15 ddd H-4b, 0.9 dd (überl.)	${}^4J_{H-4a, H-2a} = 1.7$ ${}^3J_{H-4a, H-5} = 8.5$ ${}^2J_{H-4a, H-4b} = 12.85$ ${}^3J_{H-4b, H-5} = 8.5$ ${}^2J_{H-4b, H-4a} = 12.85$
6	42.0 t	2	-CH <sub>2</sub> -	H-2a, 1.06 ddd H-2b, 0.98 t	${}^4J_{H-2a, H-4a} = 1.7$ ${}^3J_{H-2a, H-1} = 8.1$ ${}^2J_{H-2a, H-2b} = 11.8$ ${}^2J_{H-2b, H-2a} = 11.8$ ${}^3J_{H-2b, H-1} = 11.7$
7	46.51 s	3	>C<		
8	52.6 d	5	>CH-	1H, 3.03 m	${}^3J_{H-5, H-6} = 6.9$ ${}^3J_{H-5, H-4a} = 8.5$ ${}^3J_{H-5, H-1} = 11.7$
9	55.42 d	1	>CH-	1H, 2.62 ddd	${}^3J_{H-1, H-5} = 11.7$ ${}^3J_{H-1, H-2a} = 8.1$ ${}^3J_{H-1, H-2b} = 11.7$
10	74.53 d	6	>CH-	1H, 4.82 d	${}^3J_{H-6, H-5} = 6.9$
11	79.91 s	10	>C<		
12	118.75 s	7	=C<		
13	124.38 s	8	=C<		
14	136.82 d	12	=CH-	1H, 6.8 s	
15	138.04 d	11	=CH-	1H, 6.89 s	

Tab. 21: Zuordnung der NMR-Signale von Furanether A (H-32).

Zum höheren Feld schliessen sich die Signale der Methylenprotonen H-9 an. Diese sind chemisch nicht äquivalent: H-9a ( $\delta = 2.55$  ppm) und H-9b ( $\delta = 2.31$  ppm). Das Proton H-9a präsentiert sich als Doppeldublett mit einer geminalen Kopplung  ${}^2J_{H-9a, H-9b} = 16.1$  Hz und einer long-range-Kopplung  ${}^4J_{H-9a, H-11} = 1.65$  Hz. Sein Partnerproton H-9b zeigt nur die Dublettaufspaltung der geminalen Spinkopplung  ${}^2J_{H-9b, H-9a} = 16.1$  Hz.

Im Hochfeldbereich des Spektrums ( $\delta = 1.4$  bis  $0.8$  ppm) fallen als stärkste Signale die Resonanzen der drei Methylgruppen auf: H-15 ( $\delta = 1.38$  ppm, s), H-13 ( $\delta = 0.88$  ppm, s) und H-14 ( $\delta = 0.84$ , s).

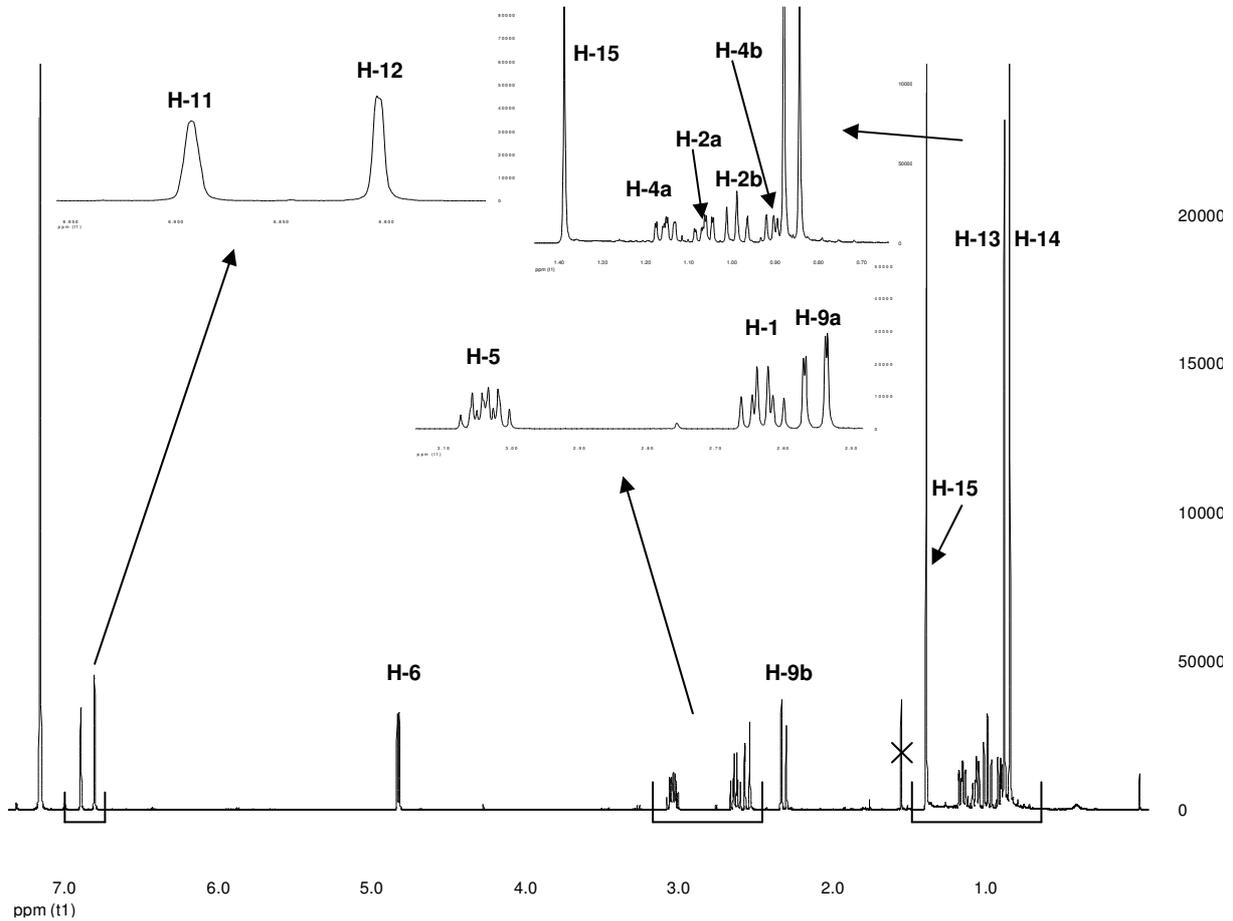


Abb. 50:  $^1\text{H-NMR}$  von Furanether A (H-32) (500.13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

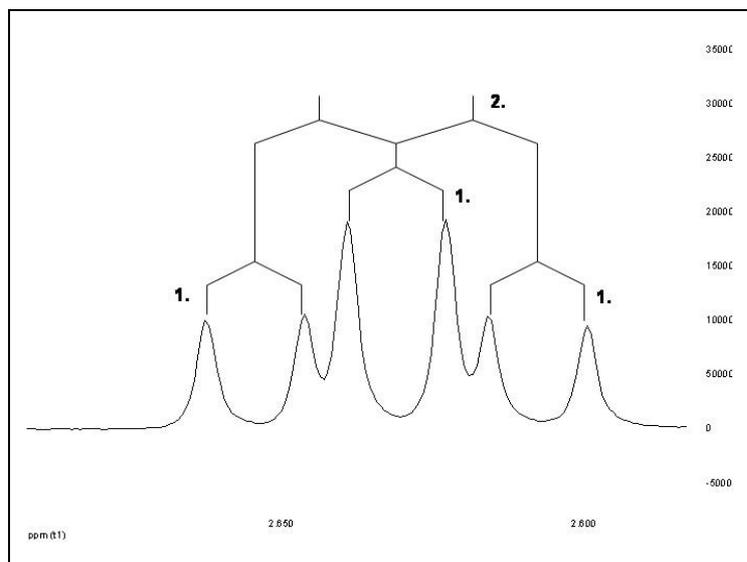
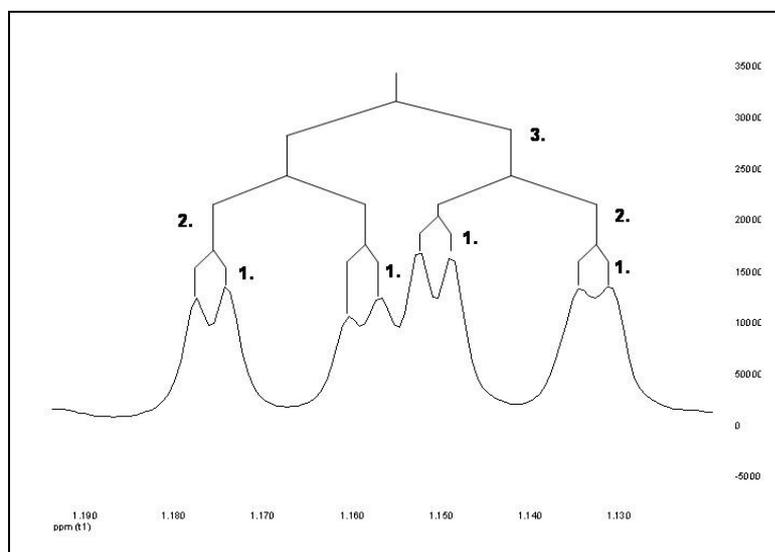


Abb. 51: Aufspaltung des Protons H-1 (1.:  $^3J_{\text{H-1}, \text{H-2a}} = 8.1$  Hz, 2.:  $^3J_{\text{H-1}, \text{H-2b}, \text{H-5}} = 11.7$  Hz)

Das Signal des Protons H-4a ( $\delta = 1.15$  ppm) ist durch die Kopplungen  $^2J_{\text{H-4a, H-4b}}$  (12.85 Hz),  $^3J_{\text{H-4a, H-5}}$  (8.5 Hz) und  $^4J_{\text{H-4a, H-2a}}$  (1.7 Hz) zum Dublett eines Doppeldubletts aufgespalten (ddd, vgl. Abb. 52)



**Abb. 52: Aufspaltung des Protons H-4a (1.:  $^4J_{\text{H-4a, H-2a}} = 1.7$  Hz, 2.:  $^3J_{\text{H-4a, H-5}} = 8.5$  Hz, 3.:  $^2J_{\text{H-4a, H-4b}} = 12.85$  Hz)**

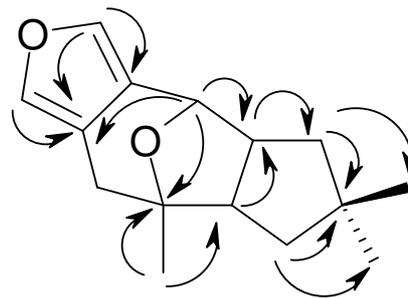
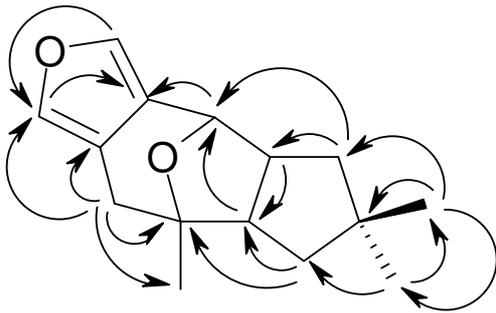
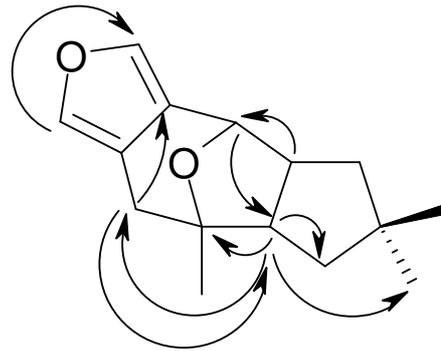
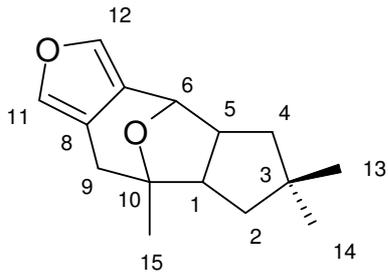
Das geminale Schwesterproton H-4b ( $\delta = 0.9$  ppm) tritt als Doppeldublett auf, welches partiell von dem Signal der Methylprotonen H-13 überlagert wird und folgende Kopplungskonstanten erkennen läßt:  $^2J_{\text{H-4b, H-4a}} = 12.85$  Hz und  $^3J_{\text{H-4b, H-5}} = 8.5$  Hz.

Als letztes bleibt die komplementäre Methylengruppe H-2 zu diskutieren. Auch diese beiden geminalen H-Atome sind chemisch nicht äquivalent. Das Signal des Protons H-2a ( $\delta = 1.06$  ppm) ist durch die Spin-Spin-Kopplungen mit den Kernen H-2b ( $^2J_{\text{H-2a, H-2b}} = 11.8$  Hz), H-1 ( $^3J_{\text{H-2a, H-1}} = 8.1$  Hz) und H-4a ( $^4J_{\text{H-2a, H-4a}} = 1.7$  Hz) zum Dublett eines Doppeldubletts aufgespalten (ddd).

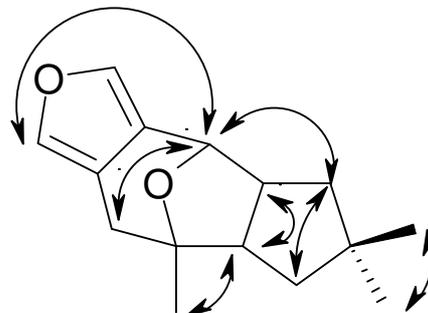
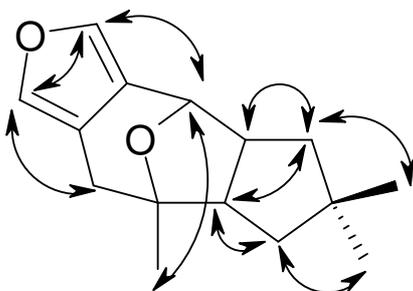
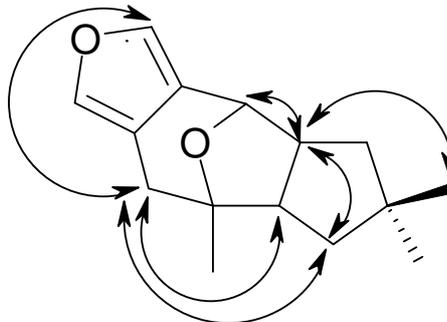
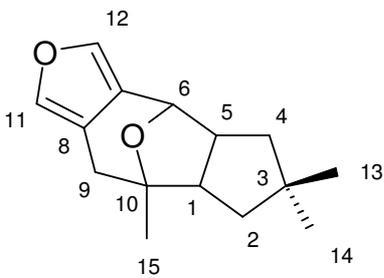
Das geminale Schwesterproton H-2b ( $\delta = 0.98$  ppm) dagegen erscheint als Triplett, ist aber in Wirklichkeit ein Doppeldublett ( $^2J_{\text{H-2b, H-2a}} = 11.8$  Hz und  $^3J_{\text{H-2b, H-1}} = 11.9$  Hz), dessen beide innere Linien sich überlagern.

Für die detaillierte Strukturaufklärung wurden auch die HMQC-, HMBC-, HH-COSY- und NOESY-Spektren benutzt.

Die im HMBC-Spektrum nachgewiesenen HC-Korrelationen werden in den folgenden Skizzen veranschaulicht:



Auch die im Folgenden wiedergegebenen HH-COSY-Kopplungen belegen die abgeleitete Struktur der Komponente **H-32**.



Eine CAS-Recherche ergab, dass es sich bei der isolierten Verbindung **H-32** um einen oxygenierten Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff aus der Reihe der Furanether handelt<sup>125, 126</sup>. Zur genauen Klärung der relativen Konfiguration wurden die im NOESY-Spektrum beobachteten Wechselwirkungen ausgewertet (vgl. Abb. 53).

Die NOE-Wechselwirkungen, die die Identität der vorliegenden Verbindung **H-32** mit Furanether A belegen, sind insbesondere die zwischen den Protonen H-2 und H-9, sowie H-4 und H-12 (vgl. Abb. 54). Da die betreffenden Protonen relativ weit entfernt positioniert sind, müssen die beobachteten Wechselwirkungen aus der starken Faltung des Moleküls resultieren. Diese Wechselwirkungen wären bei dem mehr gestreckten Bau des Furanether B nicht möglich. Ausserdem unterstützen die beobachteten Wechselwirkungen zwischen H-1 und H-15, sowie H-5 und H-15 die Struktur von Furanether A, da diese Wechselwirkungen nur auftreten können, wenn diese Protonen alle in der selben Ebene angeordnet sind. Umgekehrt muß man nach dem Molekülmodell für Furanether B eine NOE-Wechselwirkung zwischen H-1 und H-9 fordern, die bei dieser Komponente nicht zu beobachten war.

Ein Vergleich der <sup>13</sup>C-Daten der isolierten Verbindung **H-32** mit entsprechenden Literaturdaten<sup>127</sup> bestätigen die Identität dieser Verbindung (vgl. Tab. 22) mit Furanether A.

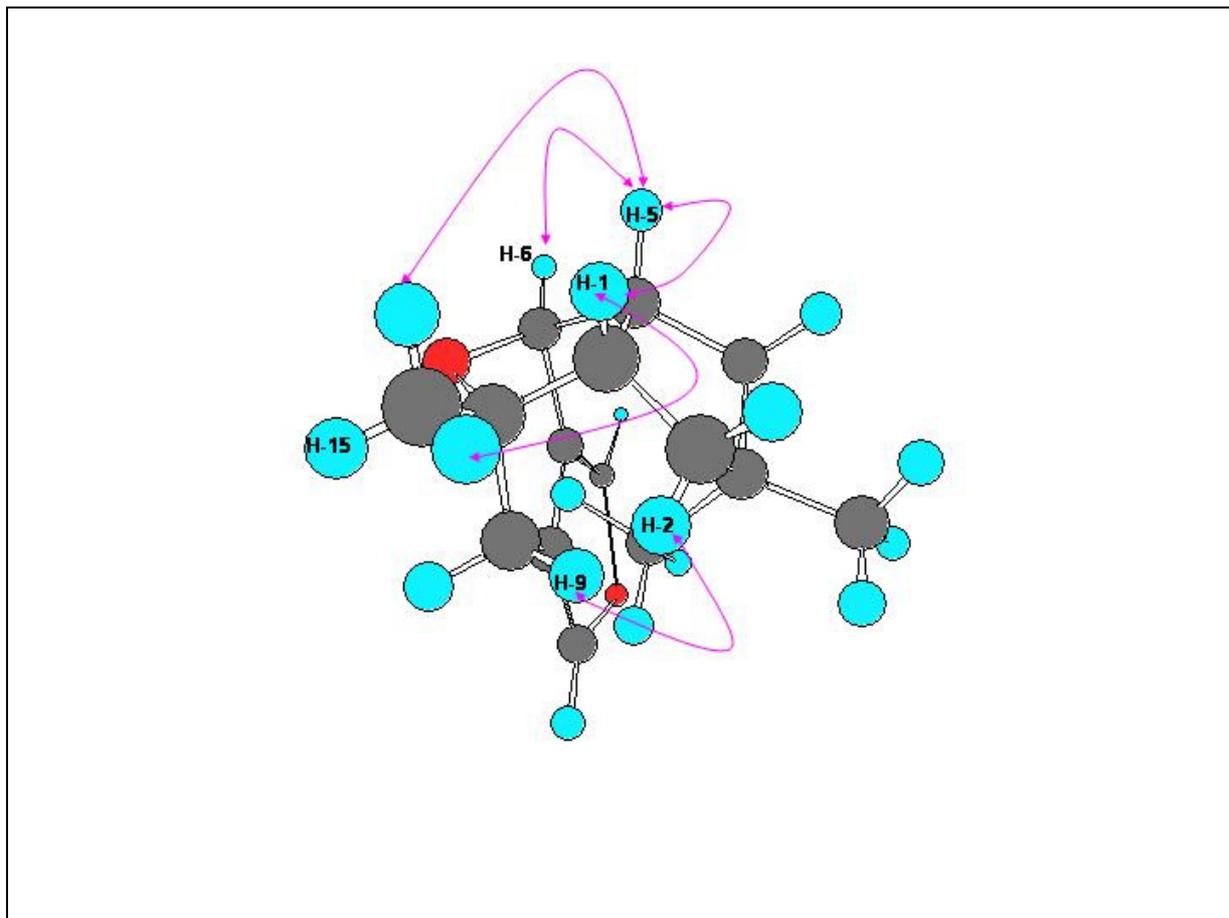


Abb. 53: Wichtige NOE-Kopplungen von Furanether A (H-32).

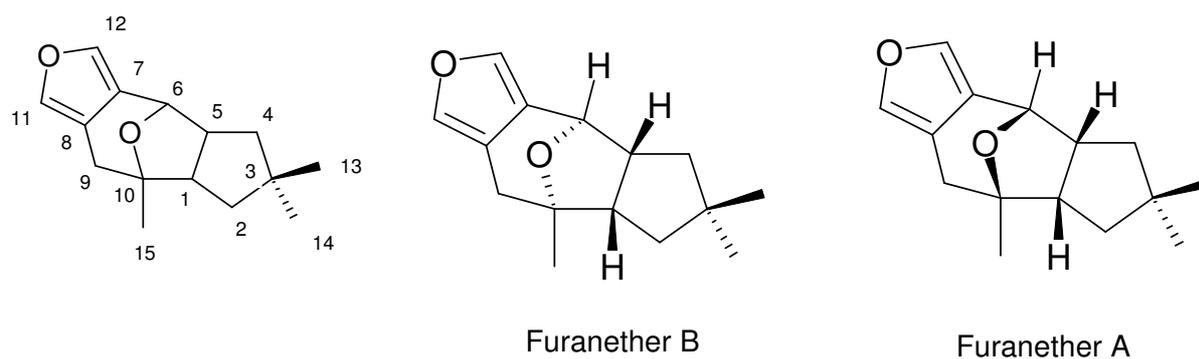


Abb. 54: Darstellung der beiden in der Literatur beschriebenen Furanether.

Furanether A **H-32** wurde vormals von Andina et al.<sup>127</sup> aus dem Acetonextrakt des Ständerpilzes *Russula sardonia* isoliert. Die von diesen Autoren publizierte NMR-Daten (<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR) stimmten mit denen der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Verbindung **H-32** überein, die somit das erstmalig in einem Pilz aus der

Ordnungsgruppe *Aphylophoranae* aufgefunden wurde. Hier werden auch das erste Mal zweidimensionale NMR-Daten dieser Substanz verfügbar gemacht.

Nr.	<sup>13</sup> C-NMR von H-32 (ppm)	C-Atom	Struktur-element	Furanether A <sup>127</sup>	Furanther B <sup>128</sup>
1	28.14 q	13	CH <sub>3</sub>	27.7 q	23.7 q
2	29.10 q	15	CH <sub>3</sub>	28.5 q	26.0 q
3	29.53 q	14	CH <sub>3</sub>	29.1 q	28.4 q
4	31.01 t	9	-CH <sub>2</sub> -	30.5 t	35.1 t
5	40.88 t	4	-CH <sub>2</sub> -	40.3 t	41.5 t
6	42.00 t	2	-CH <sub>2</sub> -	41.5 t	42.9 t
7	46.51 s	3	>C<	46.2 s	46.0 s
8	52.60 d	5	>CH-	51.9 d	50.9 d
9	55.42 d	1	>CH-	54.5 d	55.9 d
10	74.53 d	6	>CH-	74.3 d	75.3 d
11	79.91 s	10	>C<	79.8 s	80.0 s
12	118.75 s	7	=C<	117.7 s	117.0 s
13	124.38 s	8	=C<	123.2 s	126.5 s
14	136.82 d	12	=CH-	136.2 d	133.1 d
15	138.04 d	11	=CH-	137.4 d	137.9 d

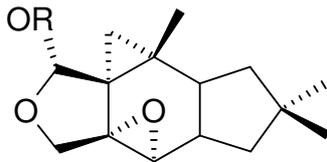
Tab. 22: Vergleich der <sup>13</sup>C-NMR-Daten von Furanether A und Furanether B mit der von uns aus *H. annosum* isolierten Verbindung H-32 (Angaben in CDCl<sub>3</sub> als Lösungsmittel).

#### 4.2.4 Überprüfung der isolierten Sesquiterpene von *H. annosum* auf Artefaktbildung

Von einigen der aus *Heterobasidion annosum* isolierten Sesquiterpene könnte vermutet werden, dass diese nicht genuin im Pilzfruchtkörper vorliegen. Gestützt wird diese Vermutung durch Publikationen, in denen diese Furanosesesquiterpene (Lacterane und Secolacterane) als Zersetzungsprodukte des in Russulaceen vorkommenden Velutinals auf Kieselgel beschrieben wird <sup>123</sup>. Sterner et al. konnten nachweisen, dass die von mir in *Heterobasidion annosum* nachgewiesenen Substanzen Lactaral (**H-33**) und 5,6,7,9-Tetrahydro-6,6,8-trimethylazuleno-(5,6c)-furan (**H-34**), aus Velutinal entstehen können. Velutinal ist ein Sesquiterpenfettsäureester, der im Ringsystem zwei Sauerstoffe als Ether gebunden enthält (vgl. Abb. 55). Einer der Sauerstoffe liegt im Molekül als Epoxidgruppe vor.

Unter Abspaltung der Fettsäure und anschließender Ringöffnung des Epoxides lagert sich Velutinal zu einer Reihe von furanoiden Sesquiterpenen um.

Diese oder ähnliche Reaktionen können unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei der Verletzung der Pilzfruchtkörper, ebenfalls ablaufen. Man vermutet, dass diese sehr schnell verlaufenden Reaktionen den Pilzen zur Verteidigung, z.B. gegenüber Fraßfeinden, dienen<sup>123 129</sup>.



R=Stearoyl (**H-94**)

R=6-Ketostearoyl (**H-95**)

**Abb. 55: Velutinal (H-93)**

Zur Klärung, ob die isolierten Sesquiterpene genuin im Pilz enthalten sind oder als Artefakte bei der Extraktion entstanden sind, wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt.

### 1. Versuch:

Frisch gesammelte Fruchtkörper von *H. annosum* wurden ohne Vorzerkleinerung in flüssigem Stickstoff zerstoßen und mit kaltem n-Pentan (-20 °C) extrahiert. Der so erhaltene Extrakt wurde mittels einer zweidimensionalen DC untersucht [LM: n-Pentan : Diethylether 80:20]. Nach der ersten Entwicklung (1. Dimension) blieb die DC-Platte 20 Minuten bei Zimmertemperatur liegen, bevor die zweite Entwicklung (2. Dimension) erfolgte.

Auf der DC-Platte (vgl. Abb. 56) sind die Verbindungen, welche sich nicht zersetzt haben, als Flecken auf der Diagonalen sichtbar (Nr.1 bis 5). Zersetzungsprodukte sind anhand zusätzlicher Flecken, ober- und unterhalb der Diagonalen, erkennbar. So konnten von fünf Ausgangsverbindungen folgende Zersetzungen beobachtet werden (gekennzeichnet als a bzw. b):

Fleck	Stärke der Zersetzung	Fleck der Zersetzungsprodukte
1	stark	1a, 1b
2	schwach	2a
3	keine	-
4	stark	4a, 4b
5	schwach	5a



Abb. 56 zum 1. Versuch: Nachweis der Zersetzung auf der zweidimensionalen DC (Im 2. Versuch konnten bei der eindimensionalen DC nur in der Bande 4 (4, 4a und 4b zusammen) die Verbindungen H-32 und H-34 nachgewiesen werden.

### 2. Versuch:

Der frisch hergestellte Extrakt wurde mittels präparativer DC eindimensional aufgetrennt [LM: n-Pentan : Diethylether 80:20] und danach die Banden 1, 2 und 4 (inklusive der evtl. schon entstandenen Artefakte (vgl. Abb. 56)) so schnell wie möglich isoliert. Eine GC-MS-Analyse dieser abgeschabten Zonen ergab folgende Ergebnisse:

- Alle DC-Banden bestanden aus mehreren Peaks.
- Die Zonen 1 und 2 wiesen keine Verbindungen auf, die im GC-MS-Lauf des Gesamtöles von *Heterobasidion annosum* aufzufinden waren.

Daraus ist zu folgern, dass es sich hierbei wahrscheinlich um genuine Komponenten handelt, die sich im Verlauf der Wasserdampfdestillation in

andere Verbindungen umwandeln und somit bei der Analyse der flüchtigen Inhaltsstoffe nicht mehr nachweisbar sind.

- Die Zone 4 dagegen besteht zwar ebenfalls überwiegend aus Substanzen, die im Wasserdampfdestillat nicht aufzufinden sind, d.h. vermutlich nativen Charakter haben, jedoch lassen sich in dieser auch zwei Komponenten aus dem Wasserdampfdestillat nachweisen. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um den Furanether A (**H-32**) und 5,6,7,9-Tetrahydro-6,6,8-trimethylazuleno-(5,6c)-furan (**H-34**).

### 3. Versuch:

Um Zersetzungsreaktionen, die auf der DC vorkamen, zu vermeiden, wurde die DC-Bande 4 mittels Säulenchromatographie abgetrennt. Zur Übertragung des entsprechenden RF-Bereiches der DC auf die Säule wurden zwei Farbstofftestmischungen (DC Farbstoffgemisch Riedel Nr. 37359 und Testfarbstoffgemisch (lipophil) von Merck) eingesetzt.

Nach erneuter Optimierung des Laufmittels [LM: n-Pentan : Diethylether 90 : 10] und Ermittlung des benötigten Laufmittelvolumens, konnte die der DC-Bande 4 entsprechende Fraktion säulenchromatographisch isoliert werden. Die erhaltene Fraktion wurde eingengt und über den Direkteinlass im MS vermessen.

Das erhaltene EI-MS (vgl. Abb. 57) zeigt, wie vermutet, charakteristische Ionen des Velutinals bzw. des O-Stearoylvelutinals:

m/z 516 (Int. 1%, M<sup>+</sup>), 284 (65%, Spaltung der Alkyl-O-Bindung unter einfacherer H-Umlagerung vom McLafferty-Typ), m/z 232 (80%, könnte als Komplementär-Ion zu m/z 284 interpretiert werden), m/z 214 (85%, vermutlich m/z 232 -H<sub>2</sub>O), m/z 203 (73%) und m/z 123 (100%). Da in der Literatur kein Massenspektrum dieser Komponente existiert, stand zur Orientierung nur eine Literaturstelle <sup>130</sup> zur Verfügung, die einige charakteristische Ionen des Alkoholteils Velutinal anführt. Diese Daten lassen vermuten, dass in der säulenchromatographisch isolierten Substanzzone 4 das instabile O-Stearoylvelutinal enthalten ist.

Zusammenfassend sind folgende Ergebnisse erzielt worden:

- Im 1. Versuch konnte gezeigt werden, dass der Extrakt von *Heterobasidion annosum* eine Reihe von Zersetzungsreaktionen aufweist.

- Im 2. Versuch konnten in der 4. DC-Bande die beiden Verbindungen **H-32** und **H-34** nachgewiesen werden. Es gelang aber nicht die Position dieser Verbindungen in der zweiten Dimension zu ermitteln. Weitere Verbindungen die von mir isoliert worden sind, konnten nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass nur die beiden Verbindungen **H-32** und **H-34** Zersetzungsprodukte sind. Die Verbindungen **H-30**, **H-31** und **H-33** konnten nicht als Zersetzungsprodukte nachgewiesen werden. Die Identitäten der in den Banden 1, 2 und 5 enthaltenen Verbindungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.
- Im 3. Versuch gelang es nur bedingt, die Verbindung **H-94** bzw. **H-95** als Ausgangsverbindung der beobachteten Zersetzungsreaktionen nachzuweisen.

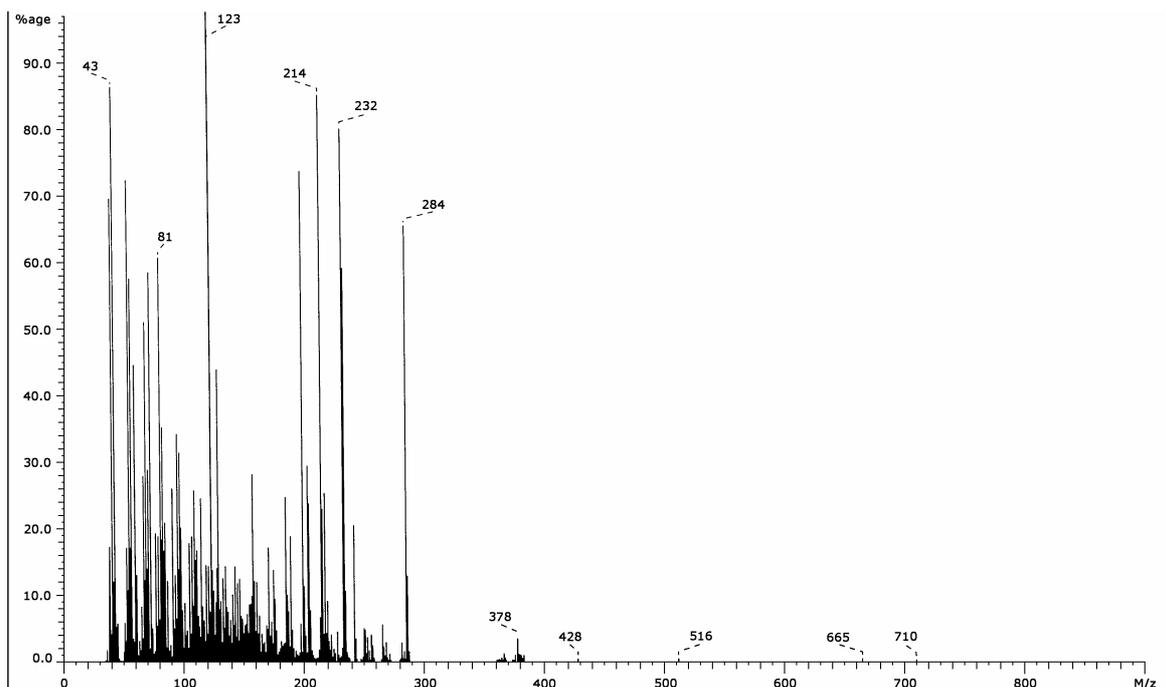


Abb. 57: Massenspektrum der SC-Fraktion Nr. 4 des frischen n-Pentan-Extraktes von *H. annosum* (Einzelheiten vergleiche Text).

#### 4.2.5 Weitere Substanzen aus dem Wasserdampfdestillat

Nach Abschluß der Isolierung der unbekanntenen Verbindungen aus dem Baumpilz *Heterobasidion annosum*, wurden weitere, bereits beschriebene, Verbindungen <sup>141</sup>

aus dem Wasserdampfdestillat dieses Pilzes isoliert. Dies geschah aus folgenden Gründen:

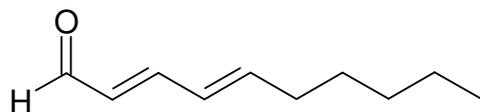
- Bei einigen dieser in der Literatur beschriebenen Verbindungen ist die Stereochemie nicht abgeklärt worden.
- In einigen Fällen, wie z.B. beim 1-Octen-3-ol, gab es keine Informationen über die Enantiomerenzusammensetzung.
- Die von Sievers <sup>141</sup> nur mittels GC-MS determinierte Identität einiger Komponenten wurde nun durch entsprechende NMR-Daten isolierter Verbindungen untermauert.

Im Prinzip wurde bei der weiteren Analyse des Wasserdampfdestillates folgendermaßen vorgegangen:

- Das Wasserdampfdestillat von *Heterobasidion annosum* wurde an Kieselgel mit n-Pentan / Diethylether säulenchromatographisch aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden durch präparative GC (kapillare / gepackte Säule) untersucht und die interessierenden Komponenten als Reinsubstanzen gesammelt. Neben den o.g. Fraktionen wurden dabei auch Restbestände von vorherigen Isolierungen aufgearbeitet (vgl. Schema Abb. 33).
- Nach entsprechender GC-MS-Kontrolle wurden von den isolierten Substanzen <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR-, HH-COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren angefertigt und ausgewertet.
- Im folgenden konnten die in Tab. 23 aufgeführten Verbindungen isoliert werden.

Verbindung	Nummer
E,E-2,4-Decadienal	H-25
E-2-Octenal	H-15
2-Pentylfuran	H-9
Toluol	H-1
n-Hexanal	H-2
R-(-)-1-Octen-3-ol	H-8-1
3-Octanon	H-8-2
1-Octanol	H-17

**Tab. 23: Bekannte Verbindungen aus *Heterobasidion Annosum*.**

**E,E-2,4-Decadienal (H-25)****H-25**

Das Wasserdampfdestillat wurde mit den Laufmittelsystemen n-Pentan : Diethylether 97% : 3%, 9:1 und 1:1 an Kieselgel säulenchromatographisch in fünf Fraktionen zerlegt. Die Fraktion 4 wurde am präparativen Kapillar-GC aufgetrennt, wobei die beiden Komponenten E,E-2,4-Decadienal **H-25** und E-2-Octenal **H-15** isoliert werden konnten.

Ein Datenbankvergleich des EI-Massenspektrum der Komponente **H-25** ergab eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Spektrum des 2,4-Decadienals ( $C_{10}H_{16}O$ ,  $M^+ = 152$ ).

Die Ergebnisse der  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Analyse sind in Tab. 24 zusammengefasst.

Nr.	$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ) in ppm bei 125.77 MHz	C-Atom	Strukturelement	$^1H$ -NMR-Daten ( $CDCl_3$ ) in ppm bei 500.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	14.5 q	10	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.9 t	$^3J_{H-10, H-9} = 6.8$
2	22.9 t	9	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.32 m	-
3	28.8 t	7	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.46 m	-
4	31.8 t	8	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.3 m	-
5	34.04 t	6	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.21 m	$^3J_{H-6, H-5} = 6.9$ $^3J_{H-6, H-7}$ , u.a.
6	128.8 d	4	>CH=	1H, 6.32 dd	$^3J_{H-4, H-3} = 9.26$ $^3J_{H-4, H-5} \approx 15.2$
7	130.35 d	2	>CH=	1H, 6.07 dd	$^3J_{H-2, H-1} = 8.0$ $^3J_{H-2, H-3} = 15.2$
8	147.2 d	5	>CH=	1H, 6.29 dd	$^3J_{H-5, H-6} = 6.9$ $^3J_{H-5, H-4} = 15.2$
9	153.1 d	3	>CH=	1H, 7.08 dd	$^3J_{H-3, H-4} = 9.6$ $^3J_{H-3, H-2} = 15.2$
10	194.2 d	1	-CHO	1H, 9.53 d	$^3J_{H-1, H-2} = 8.0$

**Tab. 24: Zuordnung der NMR-Signale von E,E-2,4-Decadienal (H-25).**

Im Doppelbindungsbereich weist das  $^{13}C$ -NMR-Spektrum die Kohlenstoffsignale eines Carbonylkohlenstoffs ( $\delta = 194.2$  ppm, d) und die von vier olefinischen

Kohlenstoffen ( $\delta = 153.1$  ppm, d, C-3; 147.2, d, C-5; 130.35, d, C-2 und 128.8, d, C-4) auf.

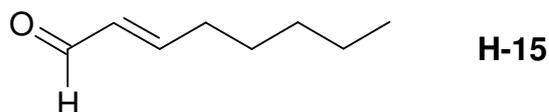
Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum läßt im höheren Frequenzbereich ein stark tieffeldverschobenes Aldehyd-Proton ( $\delta = 9.53$  ppm, d) und vier olefinische Protonen ( $\delta = 7.08$  ppm, dd, H-3; 6.32, dd, H-4; 6.29, dd, H-5; 6.07, dd, H-2) erkennen.

Die Größe der beiden vicinalen Kopplungen  $^3J_{\text{H-2, H-3}}$  und  $^3J_{\text{H-4, H-5}}$  von 15.2 Hz belegt eine *trans, trans*-Konfiguration an den beiden Doppelbindungen des Decadienals.

Die Identität von E,E-2,4-Decadienal konnte durch die Auswertung der zweidimensionalen NMR-Spektren (HMQC-, HMBC- und HH-COSY) bestätigt werden.

Überraschenderweise waren in der Literatur keine  $^{13}\text{C-NMR}$ -Vergleichsdaten dieser Verbindung aufzufinden.

### E-2-Octenal (H-15)



Ein Datenbankvergleich des EI-Massenspektrums dieser Komponente **H-15** ergab eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Spektrum des E-2-Octenals ( $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}$ ,  $M^+ = 126$ ). Die Grundstruktur des Octenals wurde insbesondere durch die Auswertung der zweidimensionalen NMR-Spektren bestätigt.

Ziel der Untersuchungen an dieser Verbindung war die Determinierung der Konfiguration an der CC-Doppelbindung.

Die Ergebnisse der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse sind in Tab. 25 zusammengefasst.

Im Doppelbindungsbereich weist das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum die Kohlenstoffsignale eines Carbonylkohlenstoffs ( $\delta = 194.4$  ppm, d) und die von zwei olefinischen Kohlenstoffen ( $\delta = 158.9$  ppm, d, C-3; 133.1, d, C-2) auf.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum läßt im höheren Frequenzbereich ein stark tieffeldverschobenes Aldehydproton ( $\delta = 9.5$  ppm, d) und zwei olefinische Protonen ( $\delta = 6.85$  ppm, dt, H-3; 6.12, tdd, H-2) erkennen.

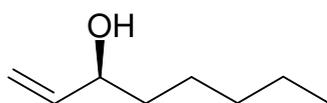
Die Größe der vicinalen Kopplungskonstanten  $^3J_{\text{H-2, H-3}}$  von 15.5 Hz belegt eine *trans*-Konfiguration an der Doppelbindung des Octenals.

Nr.	<sup>13</sup> C-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) in ppm bei 125.77 MHz	C-Atom	Strukturelement	<sup>1</sup> H-NMR-Daten (CDCl <sub>3</sub> ) in ppm bei 500.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	14.5 q	8	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.87 t	<sup>3</sup> J <sub>H-8, H-7</sub> = 7.0
2	22.7 t	7	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.33 m	
3	27.9 t	5	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.52 m	
4	31.8 t	6	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.27 m	
5	33.1 t	4	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.33 m	
6	133.1 d	2	>CH=	1H, 6.12 tdd	<sup>4</sup> J <sub>H-2, H-4</sub> = 1.4 <sup>3</sup> J <sub>H-2, H-1</sub> = 7.9 <sup>3</sup> J <sub>H-2, H-3</sub> = 15.5
7	158.9 d	3	>CH=	1H, 6.85 dt	<sup>3</sup> J <sub>H-3, H-4</sub> = 6.8 <sup>3</sup> J <sub>H-3, H-2</sub> = 15.5
8	194.4 d	1	-CHO	1H, 9.5 d	<sup>3</sup> J <sub>H-1, H-2</sub> = 7.9

Tab. 25: Zuordnung der NMR-Signale von E-2-Octenal (H-15).

Die Identifizierung von E-2-Octenal in Substanzmischungen flüchtiger Verbindungen erfolgt meist lediglich mittels GC-MS und RI-Datenvergleich. NMR-Vergleichsdaten für diese Verbindung konnten nur in der Spektrendatenbank „SDBS“<sup>131</sup> aufgefunden werden. Als Inhaltsstoff von Basidiomyceten konnte E-2-Octenal auch von Ziegenbein et al. in den Arten *Schizophyllum commune*, *Datronia mollis* und *Pycnoporus cinnabarinus* nachgewiesen werden<sup>132</sup>.

#### R(-)-1-Octen-3-ol (H-8-1)



H-8-1

Diese Verbindung wurde aus dem Wasserdampfdestillat von *H. annosum* säulen-chromatographisch an Kieselgel und anschließender präparativer GC isoliert (vgl. Kap. 7.3.1.3 und Schema Abb. 33).

Zwar ist auch diese Komponente auf der Basis von GC-MS-Daten von Sievers bereits im Wasserdampfdestillat dieses Baumpilzes nachgewiesen worden, jedoch wurde keine Enantiomerenbestimmung bei dieser chiralen Komponente vorgenommen. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Das EI-Massenspektrums dieser Komponente **H-8-1** zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Spektrum des 1-Octen-3-ols ( $C_8H_{16}O$ ,  $M^+ = 128$ ) von elektronischen Datenbanken.

Die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchungen sind in Tab. 26 zusammengefasst.

Die Struktur des 1-Octen-3-ols konnte durch die Auswertung der zweidimensionalen NMR-Spektren (HMQC-, HMBC- und HH-COSY) abgeleitet werden.

Ein Vergleich mit den  $^{13}C$ -Daten dieser Verbindung aus der SDBS-Datenbank bestätigte zudem die Zuordnung der Kohlenstoffsignale.

Nr.	$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ) in ppm bei 100.13 MHz	C-Atom	Strukturelement	$^1H$ -NMR-Daten ( $CDCl_3$ ) in ppm bei 500.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	14.4 q	8	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.89 t	$^3J_{H-8, H-7} = 6.9$
2	23.0 t	7	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.31 m	-
3	25.4 t	5	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.36 m	-
4	32.1 t	6	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.28 m	-
5	37.4 t	4	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.52 m	-
6	73.7 d	3	>CH-OH	1H, 4.09 q	$^3J_{H-3, H-2} = 6.2$ $^3J_{H-3, H-4} = 6.3$
7	114.9 t	1	=CH <sub>2</sub>	H-1a 5.22 td H-1b 5.1 td	$^3J_{H-1a, H-2} = 17.2$ $^2J_{H-1a, H-1b} = 1.3$ $^3J_{H-1b, H-2} = 10.4$
8	141.6 d	2	>CH=	1H, 5.87 ddd	$^3J_{H-2, H-1a} = 17.2$ $^3J_{H-2, H-1b} = 10.4$ $^3J_{H-2, H-3} = 6.2$

**Tab. 26: Zuordnung der NMR-Signale von R(-)-1-Octen-3-ol (H-8-1).**

Zur Klärung der absoluten Konfiguration wurde die optische Drehung polarimetrisch bestimmt und dann die Probe an einer chiralen GC-Säule, mit S(+)- und R(-)-1-Octen-3-ol-Zusatz als Referenz, aufgetrennt. Vor der gaschromatographischen Untersuchung wurde das 1-Octen-3-ol zum 2,2,2-Trifluoressigester umgesetzt, um die Trennung der Enantiomere zu ermöglichen<sup>133, 134</sup>.



Abb. 58: Umsetzung von R-(-)-1-Octen-3-ol (H-8-1) für die enantioselektive GC-Trennung.

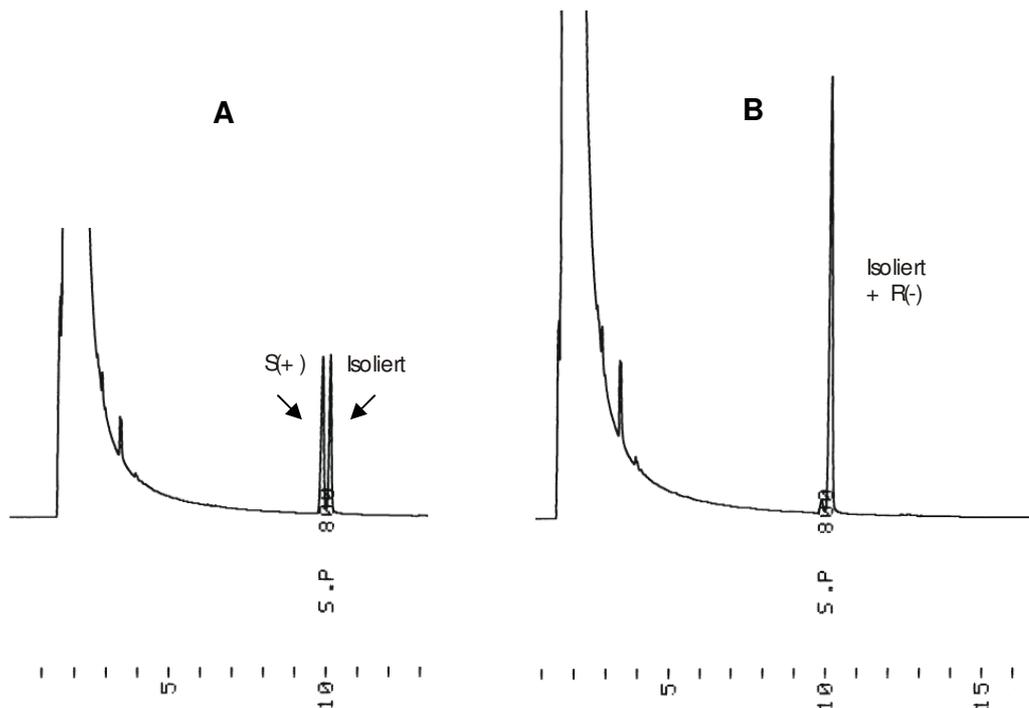


Abb. 59: GC-Bestimmung der Enantiomere des 1-Octen-3-ol (H-8-1).

- A) S-(+)-1-Octen-3-ol (Referenz) + isoliertem 1-Octen-3-ol.  
 B) R-(-)-1-Octen-3-ol (Referenz) + isoliertem 1-Octen-3-ol.

Das Ergebnis der enantioselektiven gaschromatographischen Analyse ist in Abb. 61 dargestellt und belegt, dass das aus dem Wasserdampfdestillat von *Heterobasidion annosum* isolierte 1-Octen-3-ol ganz überwiegend in der R-(-)-Form vorliegt (94,2 %).

Enantiomer	RT	Enantiomerenverhältnis in %
S-(+)-1-Octen-3-ol	9,8	5,8
R-(-)-1-Octen-3-ol	10	94,2

Tab. 27: Enantiomerenverhältnis von 1-Octen-3-ol.

Generell gilt R(-)-1-Octen-3-ol (**H-8-1**) als einer der Hauptaromastoffe in Pilzen und sorgt für den charakteristischen Pilzgeruch. Bei beliebten Spiesepilzen wie Champignon (*Agaricus campestris* und *A. bisporus*), Parasol (*Macrolepiota procera*), Hallimasch (*Armillaria mellea*) und dem Steinpilz (*Boletus edulis*) hat es eine wichtige Bedeutung als Aromastoff<sup>135, 136</sup>. Es konnte nachgewiesen werden, dass von den beiden Enantiomeren des 1-Octen-3-ols, die hier gefundene Variante von R(-)-1-Octen-3-ol (**H-8-1**), der eigentliche Aromaträger ist<sup>137</sup>.

Das S-(+)-Enantiomer, welches eher einen gemüseartigen Geruch zeigt<sup>138</sup>, konnte von Campos-Ziegenbein<sup>103</sup> in dem Baumpilz *Pycnoporus cinnabarinus* (Zinnobertramete) nachgewiesen werden.

#### 4.2.6 Untersuchung des Methanolextraktes

Der Methanolextrakt des Baumpilzes *Heterobasidion annosum* wurde an Sephadex LH-20 mit Methanol / Chloroform (1:1) säulenchromatographisch vorgetrennt. Bei dieser Trennung wurden drei Fraktionen erhalten. Im nächsten Schritt wurde zunächst die dritte Fraktion an Kieselgel mit Ethylacetat als Laufmittel chromatographiert (vgl. Abb. 60). Durch diese Trennung konnte die Verbindung Fomajorin S (**H-96**) isoliert werden.

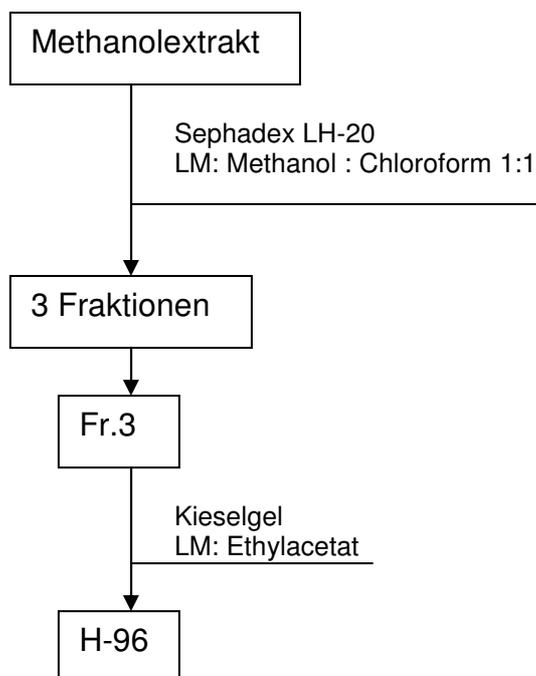
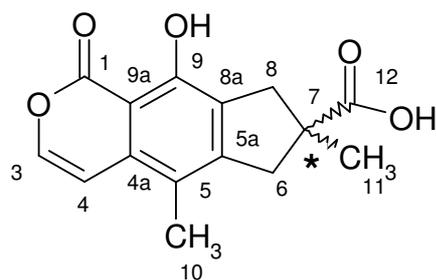


Abb. 60: Auftrennungsschema des Methanolextraktes von *Heterobasidion annosum*.

**Fomajorin-S (H-96)**

Das EI-Massenspektrum dieser Verbindung (**H-96**) deutet auf einen Molekülpeak bei  $m/z$  274 hin:  $m/z$  259 ( $M^+ - \text{CH}_3$ ),  $m/z$  246 ( $M^+ - 28$ ) und  $m/z$  229 ( $M^+ - 45$ ). Die HR-MS-Messung ergibt für diese Komponente eine elementare Zusammensetzung von  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$  (Abweichung: 1,1 mmu).

Die Intensitätsverteilung der Ionen deutet auf ein stabiles polycyclisches System hin (Molekülion als Basispeak, Intensitätsschwerpunkt im oberen Massenbereich). Die Abspaltung von CO aus dem Molekülion (Bildung von  $m/z$  246) könnte heterozyclisch gebundenen Sauerstoff indizieren.

Die Summenformel wurde durch Auswertung der  $^{13}\text{C}$ -NMR- und HMQC-Spektren bestätigt.

Alle im  $^{13}\text{C}$ -NMR- und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zugeordneten Kohlenstoff- und Protonensignale, sowie die dazugehörigen Multiplizitäten und HH-Kopplungskonstanten sind in Tab. 28 aufgeführt.

Entsprechend dieser Daten muß die diskutierte Verbindung **H-96** neun Doppelbindungsäquivalente enthalten, nämlich sechs Doppelbindungen und drei Ringe. Zwei der Doppelbindungen sind Bestandteile von Carbonylgruppen; die restlichen vier CC-Doppelbindungen verteilen sich auf sechs quartäre C-Atome und zwei Methingruppen.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ist in Abb. 61 wiedergegeben. Es zeigt im Tieffeldbereich bei  $\delta = 11.02$  ppm ein scharfes Singulett, welches der Hydroxylfunktion an C-9 zuzuordnen ist. Im Abschnitt zwischen  $\delta = 7.2$  und 6.5 ppm lassen sich die beiden Dubletts der olefinischen Protonen H-3 ( $\delta = 7.13$  ppm,  $^3J_{\text{H-3, H-4}} = 5.8$  Hz) und H-4 ( $\delta = 6.56$  ppm,  $^3J_{\text{H-4, H-3}} = 5.8$  Hz) erkennen.

Nr.	<sup>13</sup> C-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) in ppm bei 100.13 MHz	C-Atom	Struktur- element	<sup>1</sup> H-NMR-Daten nach Lit. <sup>139</sup>	<sup>1</sup> H-NMR-Daten (CDCl <sub>3</sub> ) in ppm bei 500.13 MHz	HH-Kopplungs- konstante in Hz
1	14.66 q	10	-CH <sub>3</sub>	2.25	2.18, s	
2	25.75 q	11	-CH <sub>3</sub>	1.45	1.38 s	
3	41.06 t	8	CH <sub>2</sub>	2.91, d, J=16.8 2.91, d, J=16.8	H-8α, 3.46, d H-8β, 2.93, d	<sup>2</sup> J <sub>H-8α, H-8β</sub> = 16.7 <sup>2</sup> J <sub>H-8β, H-8α</sub> = 16.7
4	44.61 t	6	CH <sub>2</sub>	3.53, d, J=17.2 3.57, d, J=17.2	H-6a, 3.5 d H-6b, 2.84 d	<sup>2</sup> J <sub>H-6a, H-6b</sub> = 16.9 <sup>2</sup> J <sub>H-6b, H-6a</sub> = 16.9
5	49.1 s	7	>C<			
6	105.76 d	4	=CH	6.62, d, J=5.8	6.56, d	<sup>3</sup> J <sub>H-4, H-3</sub> = 5.8
7	106.1 s	9a	>C=			
8	119.54 s	5	>C=			
9	127.28 s	8a	>C=			
10	134.3 s	4a	>C=			
11	143.23 d	3	=CH	7.19, d, J= 5.7	7.13, d	<sup>3</sup> J <sub>H-3, H-4</sub> = 5.8
12	152.07 s	5a	>C=			
13	156.24 s	9	=C-OH	11.1	11.02 s	
14	167.24 s	1	>C=O			
15	181.95 s	12	COOH	11.1	n.n.	

**Tab. 28: Zuordnung der NMR-Signale von Fomajorin S (H-96)**

Die beiden Protonen von H-6 (6a, 6b) sind chemisch nicht äquivalent. H-6a ( $\delta = 3.5$  ppm) ist zu einem Dublett aufgespalten ( $^2J_{H-6a, H-6b} = 16.9$  Hz) und partiell mit den Signalen von H-8 $\alpha$  überlagert. Auch das hochfeldverschobene H-6b ( $\delta = 2.84$  ppm) zeigt eine Dublettstruktur ( $^2J_{H-6b, H-6a} = 16.9$  Hz).

Ähnlich verhält sich die Situation bei den analogen Protonen der Methylengruppe H-8. Auch diese sind chemisch nicht äquivalent: H-8 $\alpha$  ( $\delta = 3.46$  ppm) tritt als Dublett auf ( $^2J_{H-8\alpha, H-8\beta} = 16.7$  Hz) und zeigt eine partielle Überlagerung mit einem Signal des Protons H-6a. Das Proton H-8 $\beta$  ist schwach hochfeldverschoben ( $\delta = 2.93$  ppm) und liegt ebenfalls als Dublett vor ( $^2J_{H-8\beta, H-8\alpha} = 16.7$  Hz).

Im Hochfeldbereich lassen sich die beiden Methylgruppen H-10 ( $\delta = 2.18$  ppm) und H-11 ( $\delta = 1.38$  ppm) als Singuletts beobachten.

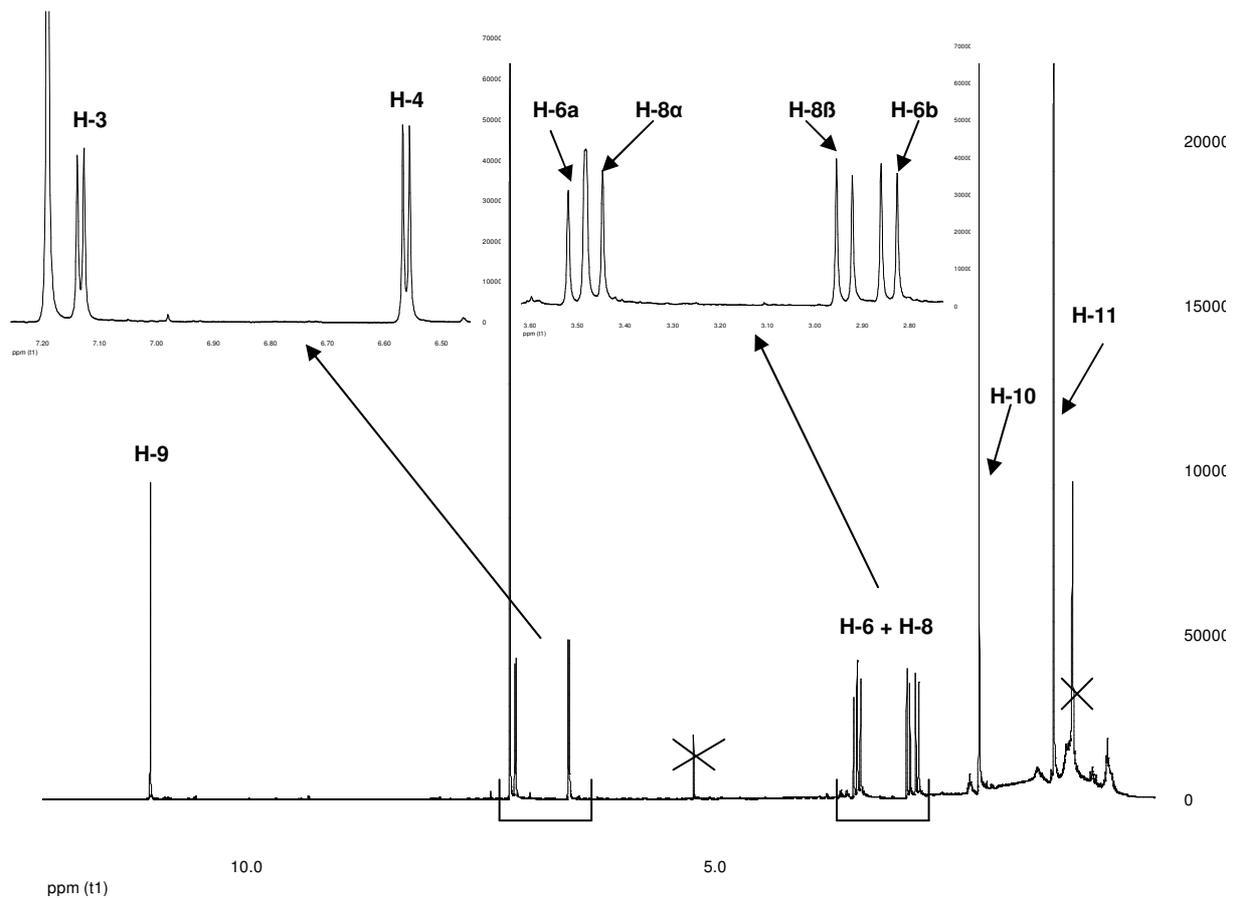
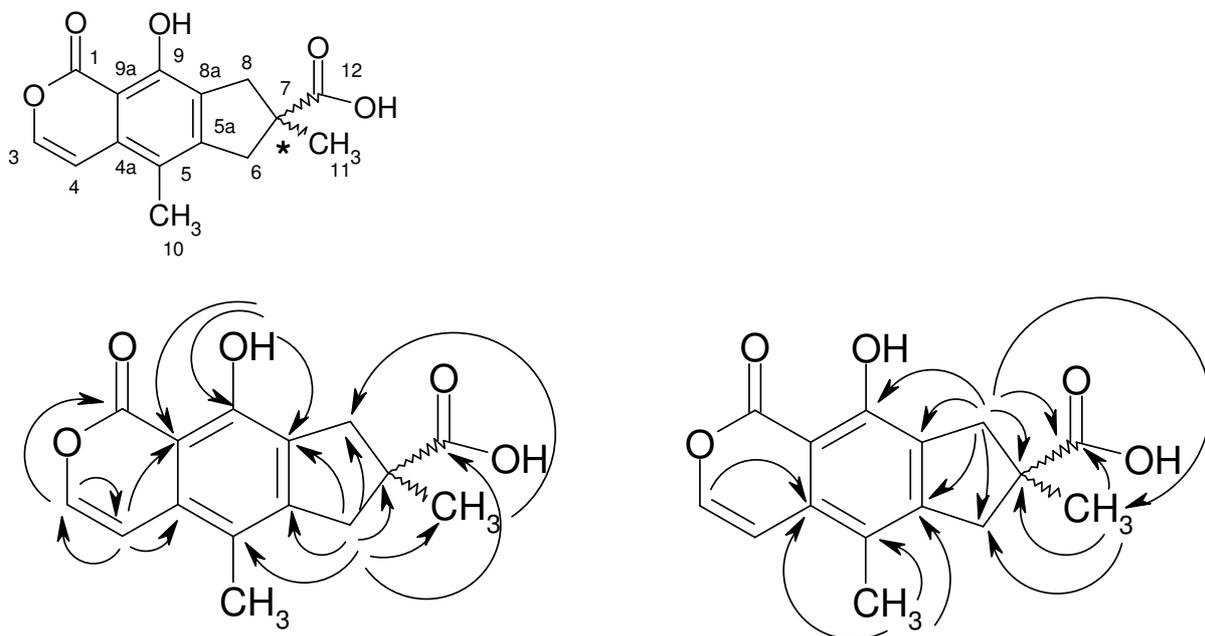
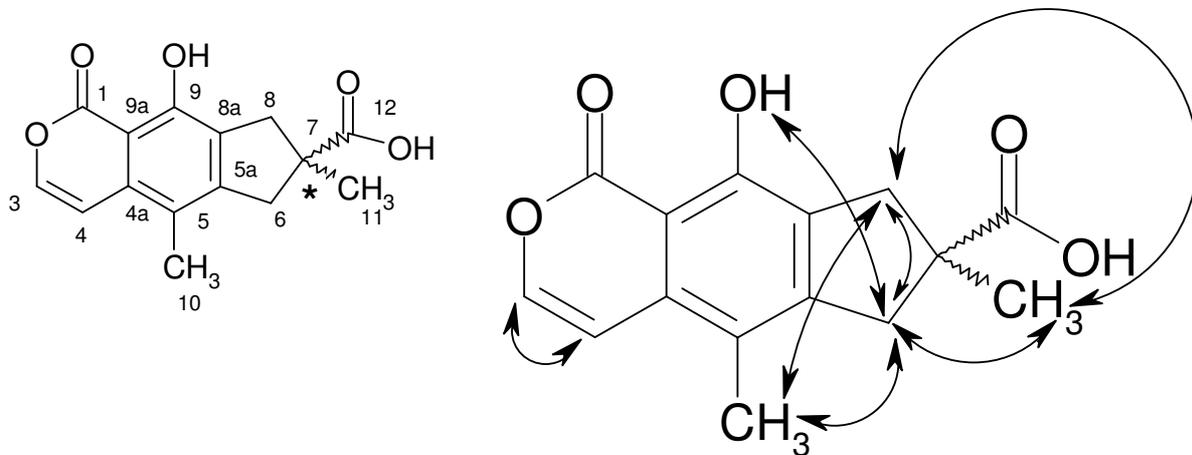


Abb. 61:  $^1\text{H-NMR}$  von Fomajorin S (H-96) (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Die zusätzliche Anwendung verschiedener zweidimensionaler NMR-Techniken führte zur Ableitung der Struktur des Fomajorin S. Die Ergebnisse der HMBC-Analyse sind in folgenden Skizzen zusammengefasst:



Die Ergebnisse der HH-COSY-Analyse veranschaulicht die folgende Skizze:



Zur weiteren Absicherung der Struktur von Fomajorin S (**H-96**) wurden die NOE-Wechselwirkungen ausgewertet. Bedingt durch die planare Molekülstruktur, lassen sich jedoch auch durch diese Technik keine Aussagen zur relativen Konfiguration am C-7 machen. Die Ergebnisse der NOE-Analyse sind in Abb. 62 zusammen gefasst und bestätigen die postulierte Struktur.

Die in der Literatur <sup>139, 141</sup> publizierten, digitalen massenspektrometrischen Daten über diese Verbindung zeigen zwar qualitativ eine befriedigende Übereinstimmung, jedoch lassen sich zum Teil deutliche Abweichungen in den Ionenintensitäten erkennen.

Die einzige Quelle, die <sup>1</sup>H-NMR-Daten des Fomajorin S (Deuteriochloroform als Lösungsmittel) publiziert hat, findet sich bei Bliestle et al. <sup>139</sup>. Diese Werte sind meinen Messwerten in Tab. 28 vergleichend gegenübergestellt; sie sind jedoch nur partiell kompartibel:

Die Lagen der Protonen H-8 $\alpha$  und H-6b wurde falsch angegeben. Auch die Position des Protons der Carboxylfunktion H-12 ist nicht korrekt; das Signal bei 11.1 ppm entspricht definitiv nur einem Wasserstoffkern, nämlich dem phenolischen Proton H-9. Dagegen zeigen meine NMR-Daten dieser Verbindung eine sehr gute Übereinstimmung mit den von Sievers <sup>141</sup> in DMSO gemessenen <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von dem aus einem Extrakt gewonnenen Fomajorin S.

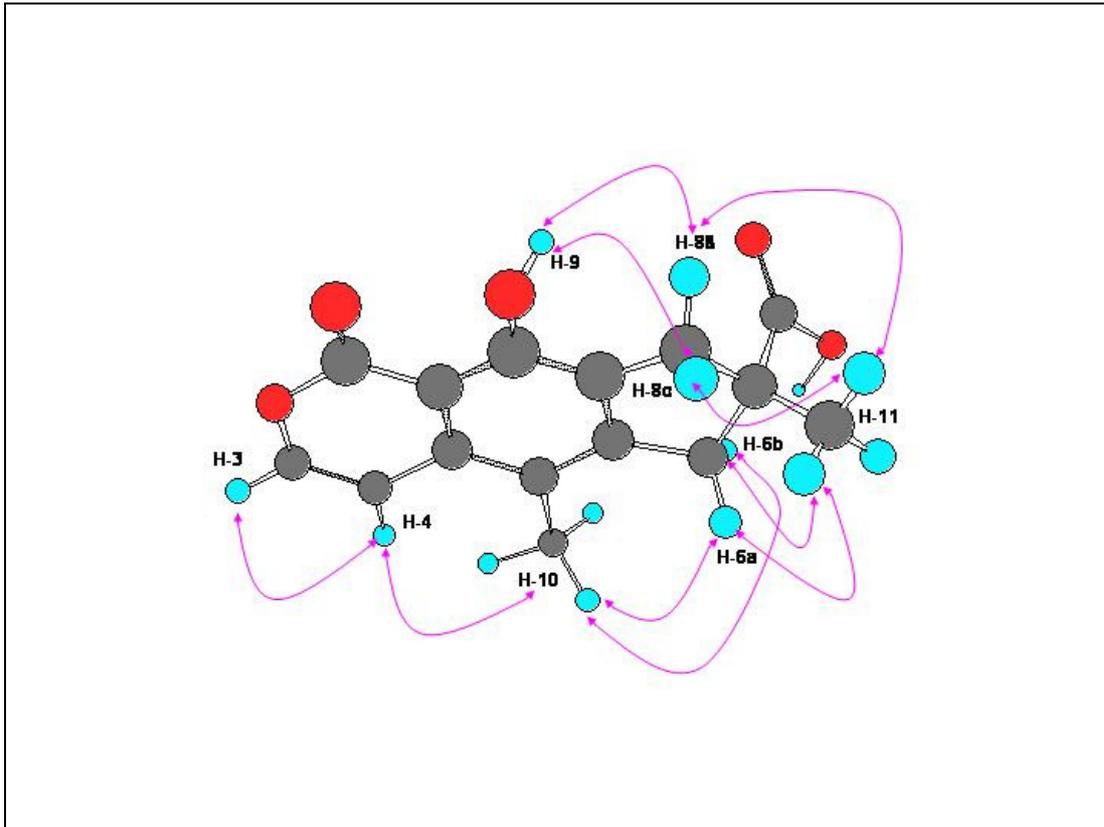


Abb. 62: NOE-Wechselwirkungen von Fomajorin S (H-96).

Bei diesem Inhaltsstoff (**H-96**) handelt es sich um eine Substanz, die aus dem Kulturmedium und den Fruchtkörpern von *Heterobasidion annosum* isoliert und zum Teil auf mögliche Bioaktivitäten hin untersucht wurde. Sie wies eine Hemmwirkung gegen antagonistische Pilze und *E. coli* auf <sup>140</sup> und zeigte Radikalfängereigenschaften im DPPH-Test, sowie eine Cholinesterase-Hemmung <sup>141</sup>.

Im Verlauf der Untersuchungen des Methanolextraktes von *H. annosum* erhielt ich die Information, dass parallel zu meinen Arbeiten der Methanolextrakt dieses Pilzes am Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Hamburg ebenfalls auf seine Inhaltsstoffe hin untersucht wurde. Auch hier wurde zeitgleich Fomajorin S isoliert. Um weitere Überschneidungen zu vermeiden, stellte ich die weitere Untersuchung des Methanolextraktes von *H. annosum* ein, d.h. die anderen beiden Sephadex-Fractionen wurden nicht mehr analysiert.

### 4.3 Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Fomitopsis pinicola*

#### 4.3.1 Dichlormethanextrakt der Kruste

Im Rahmen der Suche nach unbekanntem Naturstoffen in Baumpilzen fiel bei der Analyse des Dichlormethanextraktes der Kruste von *Fomitopsis pinicola* eine Verbindung auf, die große Ähnlichkeit mit der bereits bekannten Pinicolsäure A aufwies.

Zunächst wurde der Extrakt säulenchromatographisch an Kieselgel mit n-Hexan und Ethylacetat als Laufmittel vorgetrennt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden mit MSTFA zu Trimethylsilyl-Derivaten umgesetzt und mittels GC-MS analysiert.

In der Pinicolsäure A – Fraktion konnte eine zweite Substanz nachgewiesen werden, die sich im EI-Massenspektrum um eine Massendifferenz von 14 Dalton unterschied. Diese beiden Komponenten ließen sich zwar trotz zahlreicher Versuche nicht trennen, doch gelang es, die Struktur der unbekanntem Verbindung aus den vorliegenden spektroskopischen Daten der Mischung abzuleiten.

Die Silylierung der Referenzsubstanz Pinicolsäure A (erhalten von J. Rösecke, vgl.<sup>155</sup>) mit MSTFA lieferte nach anschließender GC-MS-Analyse ein authentisches Vergleichs-EI-Massenspektrum. Dieses war identisch mit dem entsprechenden Spektrum der Pinicolsäure A aus meinem Pilzextrakt. Auch die Retentionszeiten der beiden Verbindungen stimmten überein.

#### Identifizierung eines Gemisches aus Pinicolsäure A / (+)-3-Oxolanosta-8,24-dien-21-carbonsäure (**F-1**) und 24-Methylen-3-oxolanosta-8-en-21-carbonsäure (**Fomiffinsäure A**) (**F-2**)

Das EI-Massenspektrum der Substanzmischung ließ neben dem Molekülion der Pinicolsäure A (**F-1**) ( $m/z$  454) mit der molekularen Zusammensetzung von  $C_{30}H_{46}O_3$  (HR-MS-Daten) das Molekülion einer zweiten Substanz mit  $M^+ = 468$  erkennen. Dies muß der zweiten Komponente (**F-2**) zugeordnet werden und weist eine Zusammensetzung von  $C_{31}H_{48}O_3$  auf. Bis auf dieses Molekülion ließen sich in dem Mischspektrum keine weiteren Fragmente sicher der Verbindung **F-2** zuordnen, d.h. es war davon auszugehen, dass diese ein sehr ähnliches Massenspektrum wie die Pinicolsäure A aufweist. Die beiden Fragmente  $m/z$  468 und  $m/z$  454 zeigen eine Massendifferenz von 14 Dalton, die entsprechend den Hochauflösungsdaten einer

Methylengruppe entspricht. Diese Massendifferenz ist auch aus den EI-Massenspektren der TMS-Derivate in der GC-MS-Analyse ersichtlich (vgl. Abb. 63 und Abb. 64). Demnach enthält die Verbindung **F-2** eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe mehr.

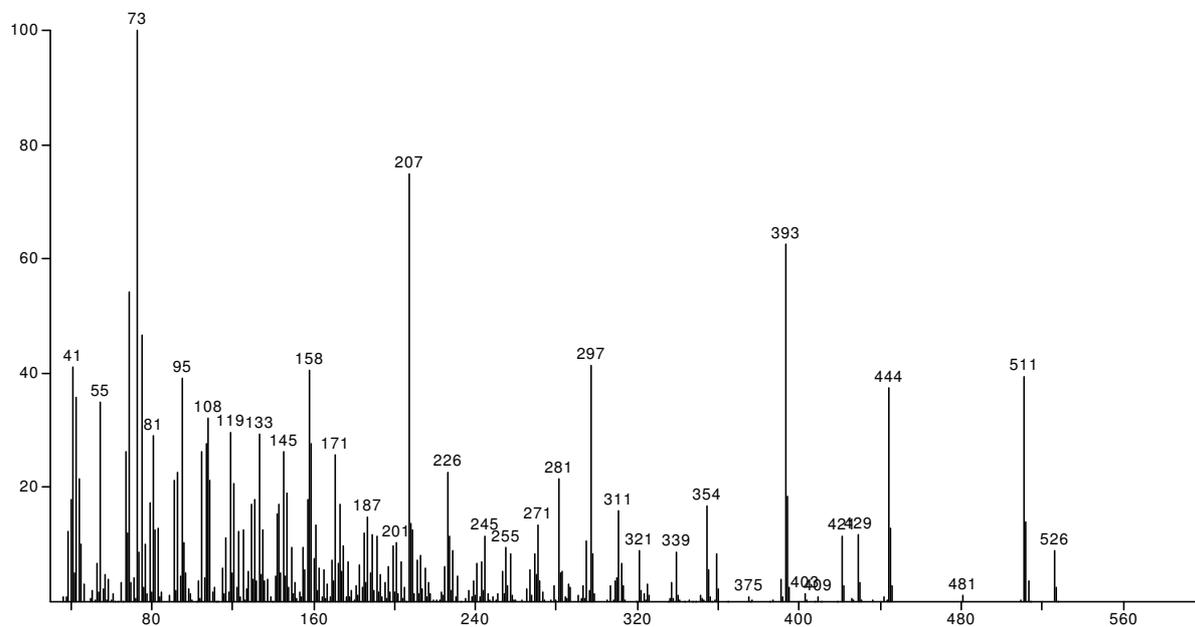


Abb. 63: MS des TMS-Esters von Pinicolsäure A (F-1).

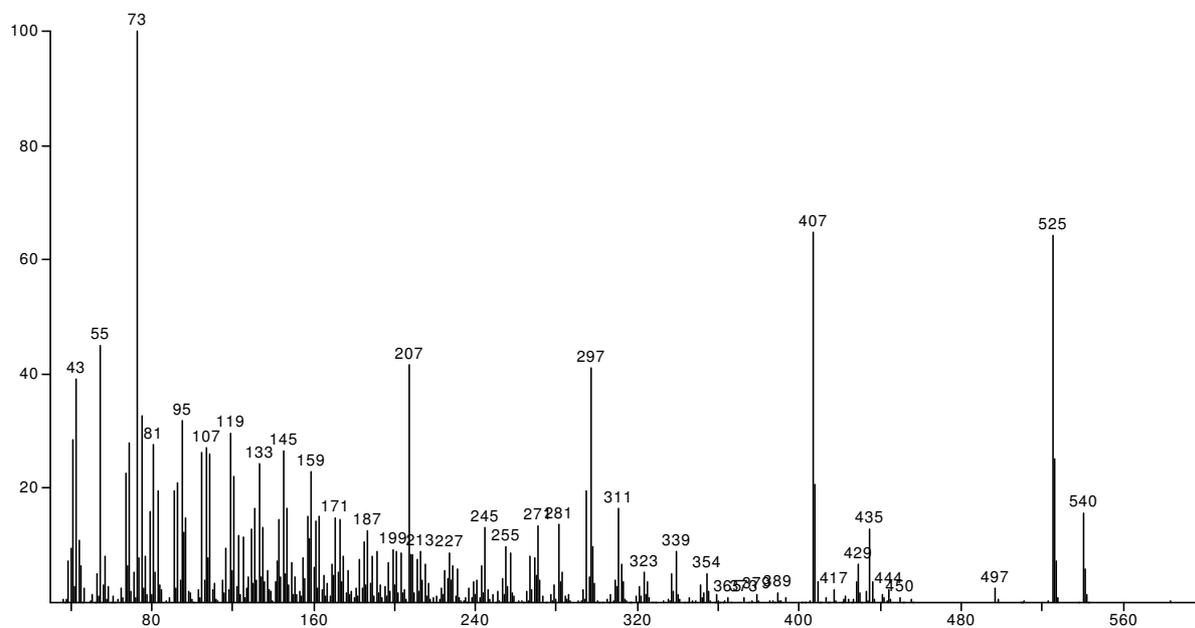


Abb. 64: MS des TMS-Esters der Fomeffinsäure A (F-2).

Pinicolsäure A (F-1)						
Kohlenstoff	<sup>13</sup> C-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) in ppm (aus Mischung)	Struktur-element	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) in ppm (aus Mischung)	<sup>1</sup> H-NMR-Literaturdaten (Pyridin) <sup>39</sup>	<sup>1</sup> H-NMR-Literaturdaten (Pyridin) <sup>155</sup>	Kopplungskonst. in Hz
1	36.18 t	-CH <sub>2</sub> -	H-1b, 1.65 m H-1a, 1.98 m	-	-	-
2	34.58 t	-CH <sub>2</sub> -	H-2b, 2.45 m H-2a, 2.61 m	-	-	-
3	217.61 s	>C=	-	-	-	-
4	47.4 s	>C<	-	-	-	-
5	51.25 d	>CH-	1H, 1.64 m	-	-	-
6	19.4 t	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.65 m	-	-	-
7	25.9 t	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.13 m	-	-	-
8	133.18 s	>C=	-	-	-	-
9	135.04 s	>C=	-	-	-	-
10	36.96 s	>C<	-	-	-	-
11	20.95 t	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.05 m	-	-	-
12	28.87 t	-CH <sub>2</sub> -	H-12b, 1.47 m H-12a, 1.76 m	-	-	-
13	44.3 s	>C<	-	-	-	-
14	49.64 s	>C<	-	-	-	-
15	30.45 t	-CH <sub>2</sub> -	H-15b, 1.29 m H-15a, 1.67 m	-	-	-
16	27.06 t	-CH <sub>2</sub> -	H-16b, 1.4 m H-16a, 2.0 m	-	-	-
17	47.16 d	>CH-	1H, 2.12 m	-	-	-
18	16.09 q	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.82 s	3H, 0.99, s	3H, 1.05, s	-
19	18.68 q	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.1 s	3H, 1.06, s	3H, 0.99, s	-
20	47.68 d	>CH-	1H, 2.34 m	-	1H, 2.64, dt	-
21	181.58 s	>C=O	-	-	-	-
22	32.46 t	-CH <sub>2</sub> -	2H, 1.61 m	-	-	-
23	26.32 t	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.02 m	-	-	-
24	123.54 d	=CH-	1H, 5.14 t	1H, 5.34, t	1H, 5.33, t	<sup>3</sup> J <sub>H-24, H-23</sub> = 7.2

Kohlenstoff	<sup>13</sup> C-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) in ppm (aus Mischung)	Struktur-element	<sup>1</sup> H-NMR- (CDCl <sub>3</sub> ) in ppm (aus Mischung)	<sup>1</sup> H-NMR- Literatur- daten (Pyridin) <sup>39</sup>	<sup>1</sup> H-NMR- Literatur- daten (Pyridin) <sup>155</sup>	Kopplungs- konst. in Hz
25	132.29 s	>C=	-			-
26	17.65 q	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.63 s	3H, 1.63, s	3H, 1.62, s	-
27	25.7 q	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.72 s	3H, 1.68, s	3H, 1.67, s	-
28	21.28 q	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.13 s	3H, 1.14, s	3H, 1.04, s	-
29	26.22 q	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.14 s	3H, 1.00, s	3H, 1.14, s	-
30	24.41 q	-CH <sub>3</sub>	3H, 0.94 s	3H, 1.06, s	3H, 0.98, s	-

Tab. 29: Vergleich der NMR-Daten (<sup>13</sup>C-/<sup>1</sup>H-) der Pinicolsäure A (F-1): Eigene Meßwerte und Literaturdaten (zwei Quellen). (<sup>1</sup>H-NMR bei 500.13 MHz und <sup>13</sup>C-NMR bei 100.13 MHz)

Aus den Daten der <sup>13</sup>C-Pendant-, HMQC- und HMBC-Spektren konnten für die olefinischen <sup>13</sup>C-Signale der Pinicolsäure A (F-1) folgende Zuordnungen getroffen werden: Zwei Carbonylkohlenstoffe ( $\delta$ = 181.58 ppm, s, C-21; 217.61, s, C-3) und vier olefinische Kohlenstoffe ( $\delta$ = 123.54 ppm, d, C-24; 132.29, s, C-25; 133.18, s, C-8; 135.04, s, C-9). Insgesamt konnte auf diese Weise eine Anzahl von 30 C-Atomen im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum nachgewiesen und durch Literaturvergleich<sup>39</sup> der Pinicolsäure A (F-1) zugeordnet werden. Die chemischen Verschiebungen und Multiplizitäten dieser Kohlenstoffe sind in Tab. 29 aufgeführt. Somit resultierte für diese Komponente unter Berücksichtigung der NMR-spektroskopischen Daten und der massenspektrometrischen Hochauflösung eine molekulare Zusammensetzung von C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>O<sub>2</sub>. Auch die Ergebnisse der <sup>1</sup>H-NMR-Analyse (<sup>1</sup>H-NMR-COSY) unterstützen die Struktur der vermuteten Pinicolsäure A. Dies bestätigen auch die entsprechenden Literaturangaben<sup>39, 155</sup>, die in Tab. 29 den eigenen Messdaten gegenübergestellt sind.

In der hier analysierten Mischung wurden in den NMR-Spektren einige zusätzliche Signale beobachtet, die nicht der Pinicolsäure A angehörten.

Diese konnten einer strukturell eng verwandten Säure mit gleichem Ringsystem, aber abweichender Seitenkette zugeordnet werden.

Kohlenstoff	<sup>13</sup> C-NMR Pinicolsäure A in ppm (CDCl <sub>3</sub> )	<sup>13</sup> C-NMR Fomeffinsäure A in ppm (CDCl <sub>3</sub> )	Struktur- element	<sup>1</sup> H-NMR Fomeffinsäure A in ppm (CDCl <sub>3</sub> )	Kopplungs- konst. in Hz
22	32.46 t	32.53 t	-CH <sub>2</sub> -	2H, 2.01 m	-
23	26.32 t	32.74 t	>CH <sub>2</sub> -	2H, 2.1 m	-
24	123.54 d	155.17 s	>C=	-	-
25	132.29 s	34.48 d	>CH-	1H, 2.26 m	-
26	17.65 q	22.33 q	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.06 t	<sup>3</sup> J <sub>H-26, H-25</sub> = 6.4
27	25.7 q	22.33 q	-CH <sub>3</sub>	3H, 1.06 t	<sup>3</sup> J <sub>H-27, H-25</sub> = 6.4
31		106.88 t	=CH <sub>2</sub>	H-31b 4.73 d* H-31a 4.8 d*	<sup>2</sup> J <sub>H-31a/b</sub> = 0.94

Tab. 30: Vergleich der charakteristischen NMR-Signale der Pinicolsäure A (F-1) und Fomeffinsäure A (F-2).

(\* = Dublettandeutung nur in der Dehnung erkennbar) (<sup>1</sup>H-NMR bei 500.13 MHz und <sup>13</sup>C-NMR bei 100.13 MHz)

Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung **F-2** sind insbesondere die Protonensignale der exoständigen Methylengruppe H-31a/b charakteristisch: H-31a (δ = 4.8 ppm), H-31b (δ = 4.73 ppm). Die Signale lassen in der Dehnung eine leichte Aufspaltung von der geminalen Kopplung (0.94 Hz) erkennen. Zudem fällt im Unterschied zur Pinicolsäure A im Aliphatenbereich das Multipllett von H-25 auf und das Fehlen des olefinischen Protons H-24.

Im HMBC-Spektrum konnten die in Abb. 65 gezeigten Kopplungen eindeutig nachgewiesen werden.

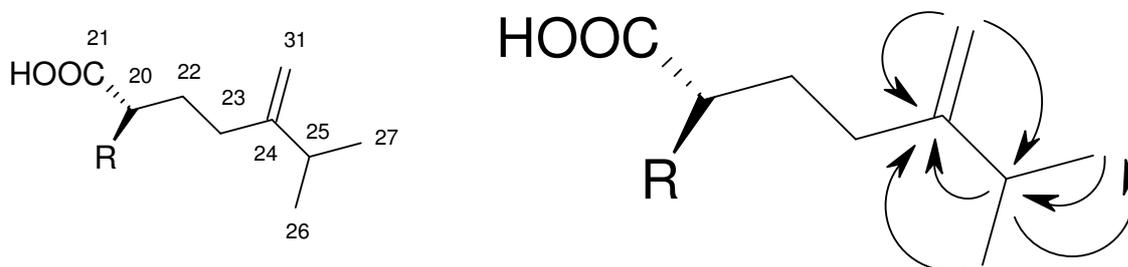
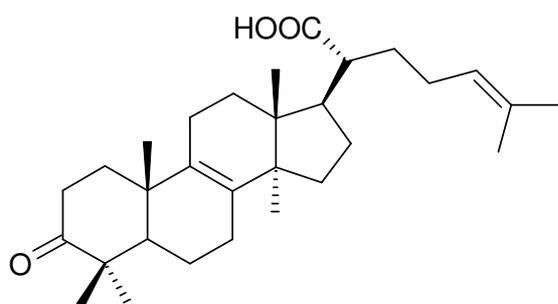
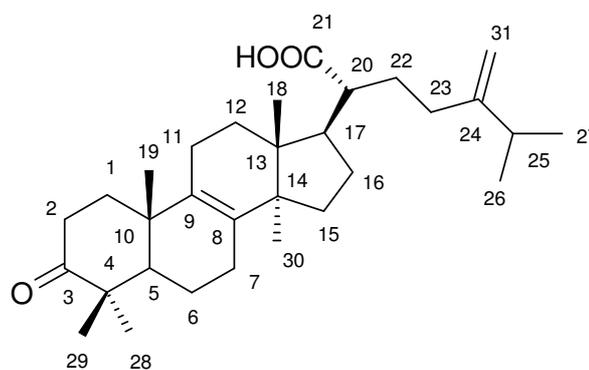


Abb. 65: Ausgewählte HMBC-Kopplungen der Fomeffinsäure A (F-2).

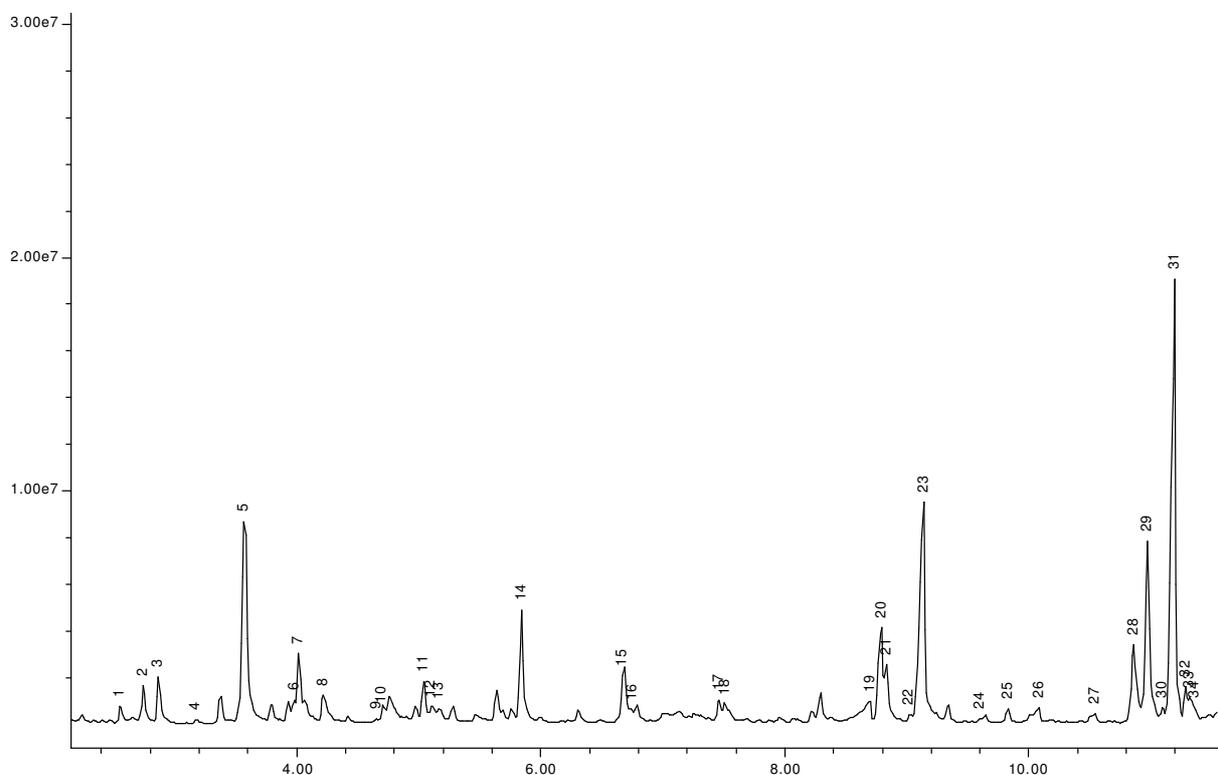
Eine CAS-Recherche ergab, dass es sich bei der hier untersuchten Verbindung **F-2** um die von *Xia Wu* et al.<sup>142</sup> aus dem Pilz *Fomes officinalis* isolierten Fomeffinsäure

A **F-2** handelt. Ein Vergleich der NMR-Daten mit der Literatur <sup>142</sup> bestätigt dieses Ergebnis. Von mir wurde diese Verbindung **F-2** im Baumpilz *Fomitopsis pinicola* zum ersten Mal nachgewiesen, während die Hauptkomponente Pinicolsäure A (3-Oxolanosta-8,22-dien-21-carbonsäure) (**F-1**) schon mehrfach in *Fomitopsis pinicola* nachgewiesen wurde <sup>39, 155</sup>.

Pinicolsäure A (**F-1**)Fomeffinsäure A (**F-2**)

#### 4.4 Das Wasserdampfdestillat von *Inonotus obliquus*

Der Baumpilz *Inonotus obliquus* zählt aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften, zu den wichtigsten Heilpilzen (vgl. Kap. 3.1.5). Die imperfekte (anamorphe) Form von *I. obliquus* wird in der Volksmedizin u.a. zur Erfrischung und als Tonikum verwendet. Hierzu wird aus dem Pilz ein erfrischender, wohlschmeckender Tee zubereitet. Aufgrund der Beobachtung, dass über die Zusammensetzung der flüchtigen Verbindungen, die ja häufig an der Aromabildung beteiligt sind, bisher nichts bekannt war, wurde das Wasserdampfdestillat dieses Pilzes untersucht. Dieses wurde säulenchromatographisch an Kieselgel in fünf Fraktionen aufgetrennt (vgl. Kap. 7.5). Diese Fraktionen und die Gesamtmischung wurden getrennt mittels GC-MS untersucht und ihre Komponenten durch Vergleich der RI-Werte, Datenbank-Spektren und z. T. auch durch GC-Coinjektion identifiziert. Hierbei konnten die in Tab. 31 aufgeführten Verbindungen identifiziert werden. Auf weitere Untersuchungen und Isolierungen wurden aufgrund der sehr geringen Menge an flüchtigen Verbindungen (<0,01%) im Pilzfruchtkörper verzichtet. Entsprechend war auch keine Klärung der Stereochemie einzelner Verbindungen möglich.



**Abb. 66:** Erster Teil (0 bis 11 min.) des Totalionenstromchromatogramms (TIC) des Wasserdampfdestillates von *Inonotus obliquus*.

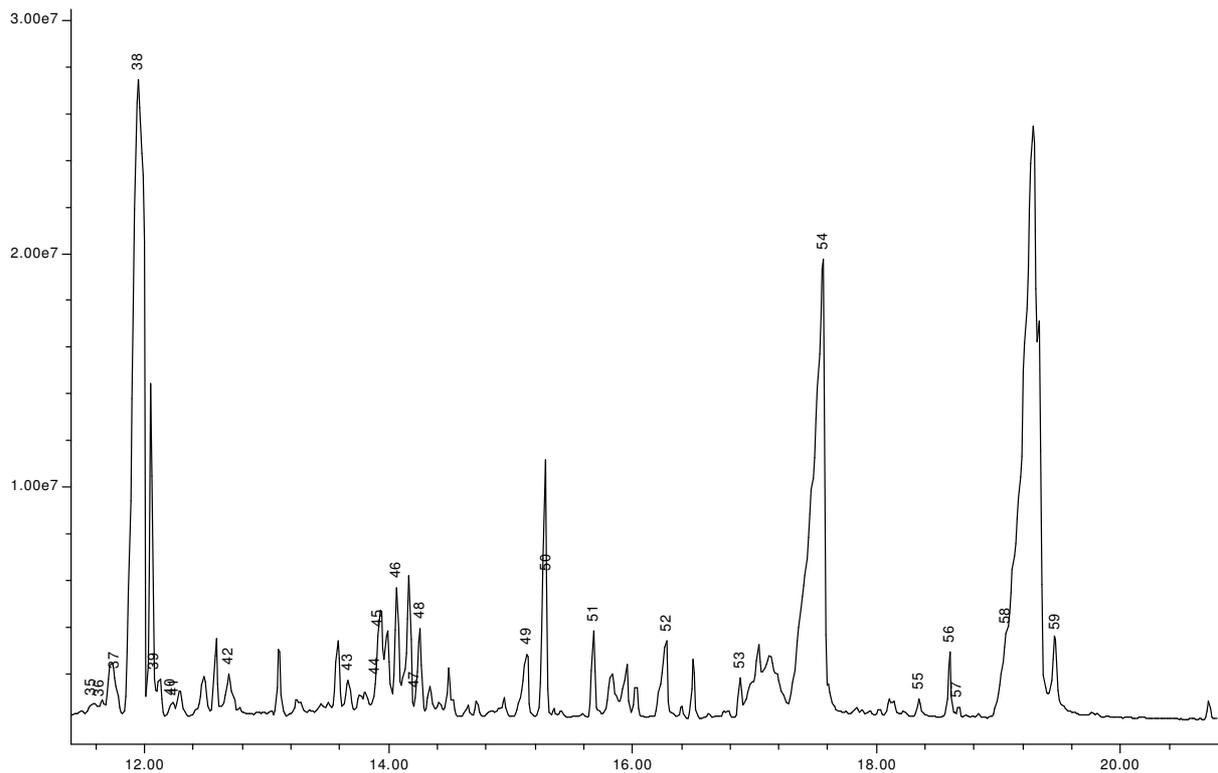


Abb. 67: Zweiter Teil (11 bis 20 min.) des Totalionenstromchromatogramms (TIC) des Wasserdampfdestillates von *Inonotus obliquus*.

Nr.	Zeit [Min.]	Substanzbezeichnung	RI	TIC %	[M+](Int%)	Identifizierung
I-1	2,55	1-Hexanol	839	0,18	102 (-)	1, 2
I-2	2,74	2-Heptanon	861	0,32	114 (4)	1, 2
I-3	2,87	n-Heptanal	876	0,42	114 (-)	1, 2
I-4	3,17	Methylhexanoat	906	0,04	130 (-)	1, 2
I-5	3,57	Benzaldehyd	933	2,78	106 (85)	1, 2
I-6	3,98	6-Methyl-5-hepten-2-on	960	0,07	126 (3)	1, 2
I-7	4,02	3-Octanon	962	0,30	128 (8)	1, 2
I-8	4,22	2-Pentylfuran	976	0,34	138 (15)	1, 2
I-9	4,65	5-Ethylcyclopent-1-en-carbaldehyd	1005	0,04	124 (31)	1, 2
I-10	4,69	Phenylacetaldehyd	1007	0,14	120 (17)	1, 2
I-11	5,04	E-2-Octenal	1028	0,31	126 (-)	1, 2
I-12	5,10	Acetophenon	1032	0,05	120 (30)	1, 2
I-13	5,17	2-Methylbenzaldehyd	1036	0,13	120 (92)	1, 2, 3
I-14	5,84	n-Nonanal	1077	1,00	142 (-)	1, 2, <sup>144</sup>
I-15	6,67	E-2-Nonenal	1129	0,68	140 (-)	1, 2
I-16	6,75	1,3-Dimethoxybenzen	1133	trace	138 (100)	1, 2, 3
I-17	7,47	n-Decanal	1178	0,16	156 (-)	1, 2
I-18	7,52	E,E-2,4-Nonadienal	1181	0,28	138 (-)	1, 2
I-19	8,70	Nonansäure	1257	0,33	158 (1)	1, 2
I-20	8,79	E,Z-2,4-Decadienal	1263	1,07	152 (6)	1, 2
I-21	8,83	2-Undecanon	1266	0,55	170 (3)	1, 2, <sup>143</sup>

Nr.	Zeit [Min.]	Substanzbezeichnung	RI	TIC %	[M+](Int%)	Identifizierung
I-22	9,02	Undecanal	1278	trace	170 (-)	1, 2
I-23	9,14	E,E-2,4-Decadienal	1286	2,70	152 (7)	1, 2, <sup>103</sup>
I-24	9,60	4-Phenyl-3-buten-2-on	1317	trace	146 (56)	1
I-25	9,83	2-Undecenal	1332	0,15	168 (-)	1, 2
I-26	10,08	Decansäure	1350	0,30	172 (1)	1, 2
I-27	10,54	$\beta$ -Elemen	1382	0,13	204 (-)	1, 2, <sup>143</sup>
I-28	10,86	<i>cis</i> - $\alpha$ -Bergamoten	1405	1,11	204 (4)	1, 2
I-29	10,98	$\alpha$ -Santalen	1413	1,67	204 (18)	1, 2
I-30	11,09	Geranylaceton	1421	0,06	194 (-)	1, 2
I-31	11,19	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoten	1429	4,55	204 (4)	1, 2
I-32	11,28	$\beta$ -Sesquifenchen	1436	0,23	204 (10)	1, 2
I-33	11,32	epi- $\beta$ -Santalen	1438	0,27	204 (5)	1, 2
I-34	11,36	$\beta$ -Barbaten	1441	trace	204 (9)	1, 2
I-35	11,57	STKW C15H22	1456	trace	202 (18)	-
I-36	11,63	$\beta$ -Ionone	1461	trace	202 (4)	1, 2
I-37	11,76	Selina-4,11-dien	1470	0,96	204 (49)	1, 2
I-38	11,95	$\beta$ -Selinen	1484	16,39	204 (71)	1, 2 *, <sup>144</sup>
I-39	12,08	$\delta$ -Selinen	1494	2,33	204 (100)	1, 2
I-40	12,22	Photosantalol	1504	trace	202 (13)	1, 2
I-41	12,24	STKW C15H22	1506	trace	202 (12)	-
I-42-1 I-42-2	12,69	$\beta$ -Calacoren + Dodecansäure	1542	0,54	200 (27) 200 (29)	1, 2 *
I-43	13,67	$\gamma$ -Eudesmol	1620	0,36	222 (3)	1, 2
I-44	13,89	$\beta$ -Eudesmol	1638		222 (1)	1, 2, <sup>143</sup>
I-45	13,92	Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	1640	1,35	222 (4)	1, 2, <sup>144</sup>
I-46	14,07	$\beta$ -Bisabolol	1652	0,81	220 (-)	1, 2, <sup>143</sup>
I-47	14,22	$\alpha$ -Bisabolol	1665	trace	220 (-)	1, 2, <sup>143</sup>
I-48	14,26	(Z)-Heptadec-8-en	1668	0,80	238 (10)	1, 2
I-49	15,13	Tetradecansäure	1742	0,97	228 (17)	1, 2
I-50	15,30	Guaiazulen	1758	2,34	222 (7)	1, 2
I-51	15,68	Hexadecanal	1789	0,68	222 (2)	1, 2
I-52	16,28	Pentadecansäure	1843	1,16	242 (22)	1, 2, 3
I-53	16,88	Methylpalmitat	1896	0,32	270 (8)	1, 2, 3
I-54	17,57	Hexadecansäure	1962	13,10	256 (34)	1, 2 *
I-55	18,35	Heptadecansäure	2038	0,17	270 (8)	1, 2
I-56	18,60	Linolsäuremethylester	2064	0,52	294 (13)	1, 2, 3
I-57	18,67	Methyloleat	2070	0,08	264 (2)	1, 2
I-58	19,07	Linolsäure	2110	21,52	280 (12)	1, 2 *
I-59	19,47	Octadecansäure	2152	1,07	284 (28)	1, 2

Verbindungs-Gruppe (identifizierte Komponenten)	Anteil in % im Gesamtöl
--	-------------------------------

Vom Gesamtöl identifiziert	85,83
----------------------------	-------

<i>Terpenoide Verbindungen</i>	
Monoterpene	-
Sesquiterpene	32,94

<i>Nicht terpenoide Verbindungen</i>	
	52,73
Aldehyde	10,54
Alkohole	0,18
Ether	0,34
Fettsäuren	38,78
Fettsäureester	0,96
Ketone	1,29
Kohlenwasserstoffe	0,8

EI-Massenspektrum: König et al. (MassFinder) <sup>151</sup> + MassLib Software <sup>145</sup> 1996 – 2008 (vgl. Kap. 7.5)		1
RI-Identifizierung über haus eigene Datenbank Prof. König/Massfinder		2
Identifizierung durch Koinjektion		3
RI-Abweichung durch Peakform und Größe:		*

**Tab. 31: Ergebnisse der GC- und GC-MS-Analyse der flüchtigen Verbindungen von *Inonotus obliquus*.**

Die Ergebnisse der GC- und GC-MS-Analysen der wasserdampf flüchtigen Verbindungen des Baumpilzes *Inonotus obliquus* lassen sich wie folgt zusammenfassen (vgl. Tab. 31):

- Der Pilz produziert sehr geringe Mengen (<0,01%) eines komplex zusammengesetzten Gemisches flüchtiger Verbindungen. Insgesamt wurden mittels GC-MS mehr als 150 Komponenten nachgewiesen, von denen 58 identifiziert werden konnten. Dies entspricht mengenmäßig einem prozentualen Anteil von 85,8 % im Gesamtöl.

- Insgesamt überwiegt die Menge an identifizierten nichtterpenoiden Verbindungen mit einem Anteil von etwa 52 %; demgegenüber machen terpenoide Verbindungen (nachgewiesen wurden nur Sesquiterpene) nur etwa 33 % im Gesamtöl aus.
- Die Fettsäuren stellen mit etwa 38,7 % die Hauptfraktion unter den flüchtigen Verbindungen dar. Hauptkomponente ist mit etwa 21 % Linolsäure, gefolgt von Palmitinsäure mit 13 %.
- Von den 18 identifizierten Sesquiterpenen, repräsentiert  $\beta$ -Selinen mit 16,4 %, die Hauptkomponente. Desweiteren wurden *cis*- und *trans*-Bergamoten,  $\alpha$ -Santalen,  $\beta$ -Sesquifenchen, *epi*- $\beta$ -Santalen, Photosantalol, sowie  $\beta$ - und  $\gamma$ -Eudesmol zum ersten Mal in *I. obliquus* als flüchtige Inhaltsstoffe von Pilzen nachgewiesen.
- Prinzipiell erfolgte eine Identifizierung immer sowohl durch massenspektrometrische, als auch durch gaschromatographische Daten. Zur massenspektrometrischen Absicherung wurden neben verschiedenen externen elektronischen Datenbanken (vgl. Material und Methoden) auch zwei arbeitskreisinterne MS-Bibliotheken benutzt (Massfinder/Prof. König; Datenbank Dr. W. Schultze).  
Nur eine Verbindung, die Komponenten **I-24**, wurde wegen ihrer sehr hohen massenspektrometrischen Übereinstimmung und ihrem charakteristischen Spektrenhabitus – mit gewissen Vorbehalt - ausschließlich anhand der MS-Daten zugeordnet.
- Fünf Verbindungen konnten durch Koinjektionen authentischer Referenzsubstanzen und Aufnahme deren Massenspektren identifiziert werden (vgl. Tab. 31).
- Die quantitativen Angaben erfolgten in TIC%, da wegen der komplexen Zusammensetzung die Zuordnung einzelner TIC-Peaks zu den entsprechenden GC-Peaks – insbesondere bei kleineren Komponenten – als relativ fehlerbehaftet angesehen werden muß.

#### **4.5 Vergleiche der RI-Werte von Substanzen aus *I. obliquus* und *H. annosum***

Die etherischen Öle von *Inonotus obliquus* und *Heterobasidion annosum* wurden durch GC-MS mit unterschiedlichen Temperaturprogrammen vermessen. Die Unter-

schiede bestanden in der Stärke der Heizrate pro Minute und in Zeit und Dauer von isothermen Phasen.

*Inonotus obliquus* : 80 °C mit 10 °C/min. auf 270 °C (ohne Isophase)

*Heterobasidion annosum*: 45 °C mit 5 °C/min. auf 270 °C (20 min. halten)

Vergleicht man die RI-Werte identischer Substanzen, die in beiden Pilzarten nachgewiesen werden konnten, so ist eine Abweichung der Werte zu beobachten.

Substanz	RI <i>I.</i> <i>obliquus</i>	RI <i>H.</i> <i>annosum</i>
2-Pentylfuran	976	981
E-2-Octenal	1028	1034
n-Nonanal	1077	1084
E-2-Nonenal	1129	1136
2-Undecanon	1266	1274
E,E-2,4-Decadienal	1286	1290
Pentadecansäure	1843	1869
Hexadecansäure	1962	1979
Octadecansäure	2152	2182

**Tab. 32: Abweichung der RI-Werte identischer Substanzen von *I. obliquus* und *H. annosum* bei unterschiedlichen GC-Programmen.**

Die ersten sechs Werte (980 bis 1300) haben im Mittel eine Abweichung von 0,54%. Erst ab einem RI-Wert von 1843 ist eine stärkere Abweichung sichtbar (siehe Tab. 32 und Abb. 68). Diese Abweichungen betragen im Mittel 1,2%.

Diese Untersuchung zeigt, dass ein Vergleich von RI-Werten nur bei Verwendung des gleichen Temperaturprogrammes zulässig ist. Nicht korrekte Werte erhält man insbesondere dann, wenn in Programmen mit isothermen und programmierten Heizphasen der Kovatsindex nur nach einer einzigen Formel berechnet wird.

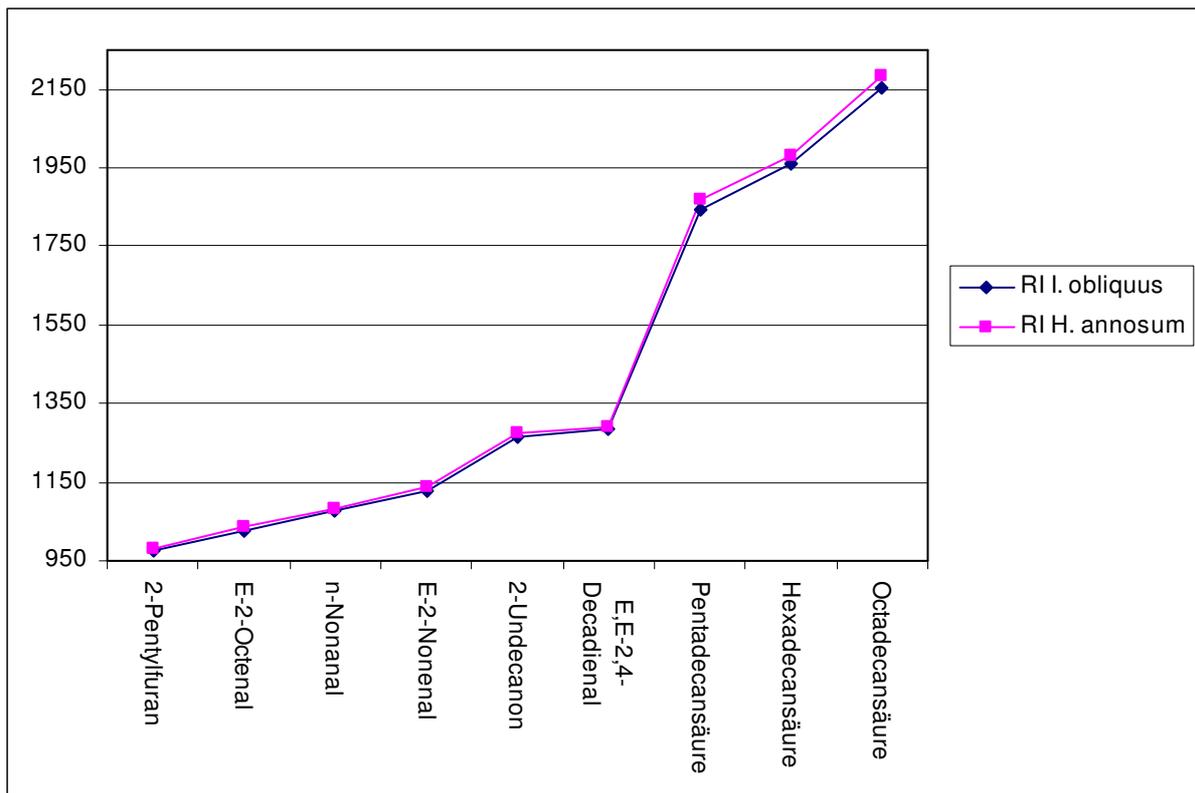


Abb. 68: KI-Abweichungen der Inhaltsstoffe aus *H. annosum* und *I. obliquus*.

## 5 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit waren Untersuchungen der forstpathogenen und teilweise pharmazeutisch verwendeten Baumpilze *Phellinus robustus* (Karst.) Bourdot & Galzin, *Heterobasidion annosum* (Fr.: Fr.) Bref., *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst. und *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil..

Die teilweise noch nicht oder nur ungenügend untersuchten Baumpilze wurden keiner kompletten Analyse unterzogen, sondern gezielt auf bestimmte Stoffgruppen bzw. Einzelverbindungen (unbekannte Naturstoffe) hin untersucht. Diese Substanzen wurden durch den Einsatz von unterschiedlichen Extraktions- und chromatographischen Trennmethoden (DC, SC, GPC, HPLC, präparative GC mit gepackten und Kapillarsäulen) aus den Pilzextrakten oder Wasserdampfdestillaten isoliert.

Die Identifizierung der Inhaltsstoffe erfolgte mittels verschiedener MS- (EI- in Nieder- und Hochauflösung, GC-MS) und NMR-Methoden (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMBC-, HMQC-, HH-COSY, NOESY).

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

### 3. *Phellinus robustus* (Karst.) Bourdot & Galzin

In der vorliegenden Arbeit wurden der n-Hexan- und Dichlormethanextrakt analysiert. Hierbei konnten folgende Verbindungen isoliert und in der Struktur aufgeklärt werden:

An steroidalen Verbindungen konnten die bekannten Naturstoffe Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**P-1**) (im Hexanextrakt), Ergosterolperoxyd (**P-3**) und 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (**P-2**) (beide im Dichlormethanextrakt) erstmals in diesem Pilz nachgewiesen werden. Alle drei Steroide sind bekannte Pilzinhaltsstoffe, welche bereits aus einer Vielzahl von Arten isoliert wurden. Es wird allerdings vermutet, dass es sich bei der Verbindung **P-3** um eine Substanz handelt, welche sich aus Ergosterol im Zuge der Isolierungsprozesse bildet<sup>146</sup>.

Neben Steroiden konnten aus dem Dichlormethanextrakt von *P. robustus* drei Sesquiterpene isoliert und identifiziert werden, von denen zwei, nämlich 4,5,5-Trimethyl-8-methylenbicyclo[5.4.0]undec-3-en und (1*R*\*,4*aS*\*,7*aS*\*,7*bR*\*)-3,3,7*b*-Trimethyl-5-methyldecahydrocyclopropa[e]azulen neue Naturstoffe darstellen und in dieser Arbeit erstmals beschrieben wurden.

Das dritte isolierte Sesquiterpen, Precapnelladien, ist bisher nur aus dem Tierreich bekannt; es wurde bisher lediglich in der Koralle *Capnella imbricata* (Bäumchenweichkoralle, Kenia-Bäumchen) nachgewiesen. Das Vorkommen dieser Verbindung in einem Baumpilz verdient deshalb besondere Erwähnung.

Neben Terpenen wurden aus den *Phellinus*-Fruchtkörpern auch drei Aromaten isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt. Zwei dieser Verbindungen, 4-Hydroxy-3-(3-methyl-1-oxobutyl-)benzaldehyd und 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on, repräsentieren neue Naturstoffe, wobei die letzte Substanz zwar bekannt ist, bisher aber nur als Syntheseprodukt<sup>115</sup> beschrieben wurde.

Die dritte aromatische Verbindung, 2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd, ist dagegen ein Inhaltsstoff, der bereits einmal in einer verwandten Pilzart (*Phellinus friesianus* Bres.; Bourdot & Galzin, bzw. *Phellinus punctatus* (Karst.) Pilát)<sup>112</sup> nachgewiesen wurde, jedoch für *P. robustus* neu ist.

#### 4. *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst.

Aus dem Baumpilz *Fomitopsis pinicola* wurde eine Mischung aus den bekannten Steroiden Pinicolsäure A (3-Oxolanosta-8,22-dien-21-carbonsäure) (**F-1**) und 24-Methylen-3-oxolanosta-8-en-21-carbonsäure (**F-2**) isoliert und strukturell aufgeklärt.

#### 5. *Heterobasidion annosum* (Sw.: Fr.) P. Karst.

In Ergänzung zu früheren Arbeiten wurden nun die flüchtigen Verbindungen von *H. annosum* erneut untersucht und eine Reihe von bisher nicht identifizierten Komponenten isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt.

Insgesamt produziert der Baumpilz *Heterobasidion annosum* geringe Mengen (0,03 und 0,1 % bezogen auf Frischpilz bzw. Trockenmasse) eines komplexen Gemisches flüchtiger Inhaltsstoffe, welches sich aus über 150 Verbindungen zusammensetzt. 44 Komponenten konnten identifiziert werden. Diese stellen einen Anteil von 53 % der gesamten flüchtigen Inhaltsstoffe dar. Die nachgewiesenen Verbindungen können eingeteilt werden in Terpene und Substanzen, die sich nicht aus Isopreneinheiten zusammensetzen. Der Anteil an nichtterpenoiden Verbindungen (35,83 %) setzt sich zusammen aus 1-Octen-3-ol (ca. 12,6 %), als Hauptkomponente und 12 % Fettsäuren.

Desweiteren gelang die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von isoliertem 1-Octen-3-ol mittels enantioselektiver Kapillar-GC an einer Cyclodextrinphase, nach Umsetzung zum TFA-Ester<sup>134, 147</sup>. Dabei wurde ein Verhältnis von 94,2 % R(-)- zu 5,8 % S-(+)-1-Octen-3-ol (16,2 : 1) nachgewiesen. Diese Relation (16:1) ist vergleichbar mit dem Verhältnis dieser beiden Enantiomeren in dem Baumpilz *Trametes gibbosa* (13,3 : 1<sup>148</sup>).

Die identifizierten Terpene des Wasserdampfdestillates von *H. annosum* teilen sich ein in Monoterpene (2,29 %), Sesquiterpene (14,19 %) und Diterpene (1,05 %). Die bekannten Sesquiterpene Protoillud-6-en (**H-26**),  $\beta$ -Bazzanen (**H-29**) und die Diterpene Dehydroabietinal (**H-43**), Abietal (**H-44**) und Methyldehydroabietat (**H-45**) konnten hier erstmalig als Pilzinhaltsstoffe nachgewiesen werden. Allerdings ist anzumerken, dass man die oxygenierten Diterpene vorzugsweise im Holz findet, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese an der nicht mehr differenzierbaren Kontaktzone zwischen Holz und Pilz miterfasst worden sind.

Die Zusammensetzung der flüchtigen Verbindungen von *H. annosum* zeichnet sich durch 20 ungewöhnliche Sesquiterpene aus, die Molekülionen von m/z 214, 216, 232 und in einem Fall von 234 aufweisen. Ein Großteil von ihnen konnte aufgrund zu geringer Konzentration oder thermischer Zersetzungen nicht durch präparative GC isoliert werden. Trotzdem gelang es, geringe Mengen von fünf dieser Verbindungen zu gewinnen und ihre Struktur mittels verschiedener NMR-Techniken aufzuklären:

Zwei von ihnen, 9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (Heterofuran A) (**H-30**) und 11,12-Dimethyl-9-methylen-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (Lacterofuran)(**H-31**) stellen neue Naturstoffe dar und wurden hier erstmals als Inhaltsstoffe eines wildwachsenden Pilzes nachgewiesen. In diesem Zusammenhang wurden erstmals auch die MS- und NMR-spektroskopischen Daten dieser neuen Verbindung **H-31** verfügbar gemacht.

Die Verbindungen Furanether A (**H-32**), Lactaral (**H-33**) und 9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-1,3,6,9-tetraen (**H-34**) wurden vormals nur in Arten der Gattungen *Lactarius* und *Russula* (Agaricanae) beschrieben. Hier konnten sie zum ersten Mal in einem holzzersetzenden Baumpilz einer anderen Ordnungsgruppe (Aphylophoranae) detektiert werden. Von **H-34** werden die MS- und NMR-spektroskopischen Daten zum ersten Mal präsentiert.

Mittels zweidimensionaler DC konnte anhand des n-Hexanextraktes nachgewiesen werden, dass die Verbindungen **H-32** und **H-34** nicht ursprünglich im Pilz

vorkommen, sondern Artefakte sind, die im Verlauf der Isolation entstehen. Leider gelang es nicht, die Ursprungsverbindung zu isolieren, aber es ist zu vermuten, dass es sich um Stearoylvelutinal handelt, welches schon im Zusammenhang mit der Biosynthese von Lactaran-Sesquiterpenen beschrieben wurde <sup>123</sup>.

#### 6. *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil.

Untersuchung des Wasserdampfdestillates von *Inonotus obliquus* zeigten, dass Fruchtkörper nur sehr kleine Mengen (unter 0,01 %) eines komplexen Gemisches von mehr als 150 flüchtigen Verbindungen produziert. Von diesen Komponenten konnten 58 mittels GC und GC-MS identifiziert werden, die einen Gehalt von 86 % der gesamten flüchtigen Verbindungen ausmachen. Die identifizierten Substanzen können eingeteilt werden in Terpene und nichtterpenoide Verbindungen.

Die nichtterpenoiden Verbindungen von *I. obliquus* repräsentieren ca. 52 % des Wasserdampfdestillates und setzen sich hauptsächlich aus aliphatischen, oxygenierten Komponenten (48,5 %), wie Fettsäuren (38,6 %) zusammen. Die Hauptkomponente ist Linolsäure mit 21,5 %. Neben den Fettsäuren (38,6%), konnten Aldehyde (10,5 %), Ketone (1,3 %), Ester (0,9 %), Kohlenwasserstoffe (0,8 %) und Spuren von Ethern (0,3 %) sowie Alkohole (0,2 %) nachgewiesen werden. Fast alle analysierten Terpene gehörten zu den Sesquiterpenen. 18 von ihnen (32,5 %) konnten identifiziert werden, mit  $\beta$ -Selinen (16,4 %) als Hauptkomponente. Daneben ließen sich auch *cis*-, *trans*-Bergamoten,  $\alpha$ -Santalen,  $\beta$ -Sesquifenchen, epi- $\beta$ -Santalen, Photosantalol, sowie  $\beta$ - und  $\gamma$ -Eudesmol identifizieren, die hier zum ersten Mal als Pilzinhaltsstoffe Erwähnung finden <sup>149</sup>.

## 6 Summary

Subject of this doctoral thesis are investigations of the forestpathogene wood-rotting fungi *Phellinus robustus* (Karst.) Bourdot & Galzin, *Heterobasidion annosum* (Fr.: Fr.) Bref., *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst. and *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil..

These fungi were analysed with regard to certain compound groups and single compounds, which were supposed to be new natural products. The substances were isolated from fungi extracts or hydrodistillates by different extraction methods and chromatographic separation techniques (TLC, CC, GPC, HPLC, preparative GC with packed and capillary columns).

Structure assignments were carried out by applying various MS (EI in low and high resolution, GC-MS) and NMR techniques ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , HMBC-, HMQC-, HH-COSY, NOESY).

Results can be summarized as follows:

### 1. *Phellinus robustus* (Karst.) Bourdot & Galzin

Analysis of the n-hexane and dichloromethane extracts of *Phellinus* fruiting bodies led to the isolation and structural elucidation of the following constituents:

The occurrence of the steroids ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ -ole (**P-1**) (hexane extract), ergosterolperoxide (**P-3**) and 5,8-epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-triene-3 $\beta$ -ole (**P-2**) (both isolated from a dichlormethane extract) was for the first time described in *Phellinus robustus* (Karst.).

These steroids are well known compounds, which have already been identified in several other fungi. However, compound **P-3** is supposed to be a decomposition product of ergosterole formed during isolation.

Moreover, three sesquiterpenes could also be isolated and identified from the dichlormethane extract of *P. robustus*. Two of them, 4,5,5-Trimethyl-8-methylenebicyclo[5.4.0]undec-3-ene and (1*R*\*,4*aS*\*,7*aS*\*,7*bR*\*)-3,3,7*b*-Trimethyl-5-methylenedecahydrocyclopropa[e]azulene represent new natural compounds.

Precapnelladiene, the third sesquiterpene isolated, was only detected in the animal kingdom so far.

Besides terpenes three aromatic constituents could be identified from the fruiting body of *Phellinus*. Two of them, 4-Hydroxy-3-(-3-methyl-1-oxobutyl-)benzaldehyde

and 1-(2,5-dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-one turned out to be new natural products. The third aromatic compound, 2-dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyde had been detected in the closely related fungus *Phellinus friesianus* Bres.; Bourdot & Galzin (*Phellinus punctatus* (Karst.) Pilát)<sup>112</sup>, but it is for the first time reported in *P. robustus*.

### 2. *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst.

A mixture of the well-known pinicolic acid A (3-oxolanosta-8,22-diene-21-carboxylic acid) (**F-1**) and 24-methylene-3-oxolanosta-8-ene-21-carboxylic acid (**F-2**) could be identified. When trying to isolate this substance by different separation techniques only a mixture of these two compounds could be obtained.

### 3. *Heterobasidion annosum* (Sw.: Fr.) P. Karst.

In this study the volatile constituents of this wood-rotting fungus were re-investigated. A number of so far unidentified constituents were isolated, the structures of which were elucidated by various MS- and NMR-techniques.

*H. annosum* produces low amounts (0.03 and 0.1% referring to fresh wt. and dry wt., respectively) of a complex mixture of more than 150 volatile constituents. 44 of them could be identified, representing about 53 % of the total volatiles. The constituents analyzed can be classified into terpenes and substances which non-isoprenoids. These non-terpenoid volatiles amount to 35.83 % with 1-octen-3-ol as predominant compound (12.6 %) in a ratio of R : S = 16 : 1. Fatty acids represent about 12 % of the hydrodistillate.

The identified terpenes from the hydrodistillate of *H. annosum* can be grouped into monoterpenes (2.29%), sesquiterpenes (14.19) and diterpenes (1.05%). The sesquiterpene protoillud-6-ene (**H-26**) and the diterpenes dehydroabietinal (**H-43**), abietal (**H-44**), and methyldehydroabietate (**H-45**) are well known natural constituents, but for the first time detected as fungal components.

The volatiles of *H. annosum* are characterized by a number of 20 unusual sesquiterpenes exhibiting the molecular ions  $m/z$  214, 216, 232 and in one case 234. Many of them could not be isolated by preparative GC due to their low concentration, a bad gc separation, and thermal decomposition, respectively. However, small quantities of five of these constituents could be isolated and characterized by different NMR techniques:

Two of them, 9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-diene (Heterofurane A) (**H-30**) and 11,12-Dimethyl-9-methylene-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-diene (Lacterofurane)(**H-31**) represent new natural constituents. The latter one was only known as a synthetic product, which was formed during synthesis of fungal metabolites <sup>122</sup>. Here it was described for the first time in a wild growing fungus. The spectroscopic data of this compound **H-31** are presented for the first time.

Compound **H-32** (furanether A), **H-33** (Lactaral) and **H-34** 9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-1,3,6,9-tetraene have only been described from species of the genus *Lactarius* and *Russula*, respectively (order group Agaricanae). Here they are for the first time detected in a wood-rotting fungus, belonging to a quite different order group (Aphylophoranae). In addition, MS- and NMR-data of **H-34** are made available.

When the pentane extract of *Heterobasidion* was subjected to two-dimensional TLC separation on silicagel plates, it was proved that **H-32** and **H-34** were no genuine fungal constituents but artefacts obviously formed during the isolation process. The primary product could not be detected, but it is supposed that these decomposition products derive from stearyl velutinal by transformation as it has been reported several times in case of lactaran biosynthesis <sup>123</sup>.

#### 4. *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil.

Investigations of the hydrodistillate, revealed that the wood-rotting fungus *I. obliquus* (steril anamorph) produces very low amounts (less than 0.01 %) of a complex mixture of more than 150 volatile constituents. 58 of them could be identified by GC and GC/MS, representing about 86 % of the total volatiles. The compounds identified can be classified into terpenes and substances which not arise from isoprene units.

These non-terpenoid volatiles of *I. obliquus* represent about 52 % of the hydrodistillate, mainly consisting of oxygenated aliphatic compounds (48.5 %) with fatty acids dominating (38.6 %). The principal constituent was linolic acid (21.5 %). Besides the acids (38.6 %) we found aldehydes (10.5%), ketones (1.3 %), esters (0.9 %) hydrocarbons (0.8 %), and traces of ethers (0.3 %) and alcohols (0.2 %).

Nearly all the terpenes analysed belong to the sesquiterpene group. 18 of them could be identified (representing 32.5 % of the hydrodistillate) with  $\beta$ -selinene

(16.4 %) as dominating compound. Among these sesquiterpenes *cis*- and *trans*-bergamotene,  $\alpha$ -santalene,  $\beta$ -sesquifenchene, epi- $\beta$ -santalene, photosantalol and  $\beta$ - and  $\gamma$ -eudesmol were identified and reported for the first time as volatile constituents of fungi<sup>149</sup>.

## **7 Experimenteller Teil**

### **7.1 Chemikalien, Messgeräte und Methoden**

#### **7.1.1 Reagenzien und Lösungsmittel**

Alle technischen Lösungs- und chromatographischen Laufmittel wurden von den Firmen Acros, Sodes und Riedel-de Haen bezogen. Vor der Verwendung wurden sie zweimal bei reduziertem Druck destilliert und in speziellen Fällen nochmals über Aluminiumoxid (Super I) filtriert.

Lösungsmittel für die HPLC wurden von der Firma Roth in HPLC-Qualität bezogen.

#### **7.1.2 Dünnschichtchromatographie**

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Alufolien mit Kieselgel 60 F254 der Firma Merck verwendet. Die Entwicklung der Chromatogramme wurde ohne Kammersättigung durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht (254 und 366 nm) und durch Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (0,5 mL Anisaldehyd, 10 mL Eisessig, 85 mL Methanol und 5 mL konz. Schwefelsäure<sup>150</sup>), anschließendes Erhitzen bei 110 °C (ca. 5 Minuten) und Betrachten bei Tageslicht.

#### **7.1.3 Flüssigchromatographie**

Für die Flüssigchromatographie bei Normaldruck wurden – je nach Problemstellung - Glassäulen unterschiedlicher Größen verwendet. Als stationäre Phasen dienten Kieselgel der Firma Merck (0,04-0,063 mm), Silica TSC 60 A der Firma ICN-Pharmaceuticals und, bei der GPC, Sephadex LH-20 der Firma Pharmacia Fine Chemicals.

#### **7.1.4 Hochleistungsflüssigchromatographie**

Für die HPLC-Trennungen wurde eine Anlage der Firma Merck / Hitachi mit folgenden Komponenten verwendet: L-6200A Intelligent Pump, ein L 3000 Photo Diode Array Detector und ein D 2500 Chromato-Integrator der Firma Merck/Hitachi. Das Gerät war mit einem Injektorsystem der Firma Rheodyne ausgerüstet.

Vor Verwendung wurden die Laufmittel entweder im Ultraschallbad oder im Heliumstrom entgast. Verwendete Trennsäulen:

- Caltrex AIII Kromasil Si 100/5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4 mm der Firma Synaptec GmbH.
- LiChrosorb RP8, 10  $\mu\text{m}$ , 250 x 4 mm der Firma Knauer.

Die unterschiedlichen, für die einzelnen Trennprobleme verwendeten, Laufmittelsysteme werden bei der Isolierung der jeweiligen Komponenten besprochen.

### 7.1.5 Konventionelle Kapillargaschromatographie

Die Durchführung der routinemäßigen kapillargaschromatographischen Analysen erfolgte mit folgenden Geräten:

- HRGC Fractovap Series 4160 der Firma Carlo Erba Instruments, ausgerüstet mit einem LT-Programmer Mod.430 und FID mit EL580 Steuereinheit, sowie mit einem Merck/Hitachi D 2500 Chromato-Integrator. Als Trennsäule diente eine CP-Sil 5 CB Kapillarsäule, 50 m Länge, 0,25 mm i.D. und 0,25  $\mu\text{m}$  Filmdicke der Firma Varian.
- GC 8000 Series, Mod.8160 der Firma Carlo Erba Instruments, ausgestattet mit einem FID und EL580 Steuereinheit, sowie einem Merck/Hitachi D2500 Chromato-Integrator.  
Als Trennsäule diente auch hier eine CP-Sil 5 CB (50 m Länge, 0,25 mm i.D. und 0,25  $\mu\text{m}$  Filmdicke).
- HP 6890 Series der Firma Hewlett-Packard. Zur Aufnahme und Auswertung der Chromatogramme wurde die HP-Chemstation-Software genutzt. Als Trennsäule diente eine J&W DBWax von 30 m Länge, 0,25 mm i.D. und 0,25  $\mu\text{m}$  Filmdicke.

Die angewendeten Temperaturprogramme werden in Tab. 33 aufgeführt.

Gerät	CE 4160	CE 4160	HP 6890	CE 8160
Analysierte Substanzen	Sesquiterpene	Triterpene	Sesquiterpene	Sesquiterpene
Trägergas	Wasserstoff	Wasserstoff	Stickstoff	Wasserstoff
Flow / Druck	2 mL/min	2 mL/min	0,7 mL/min	2 mL/min
Injektor	Split	Split	Split	Split
Temperaturprog.	50 °C-230 °C/ 3 °C pro min.	100 °C-300 °C/ 5 °C/min.	50 °C-230 °C/ 3 °C pro min	45 °C-240 °C/ 3 °C min 40 min halten bei 240 °C
Injektortemp.	220 °C	250 °C	220 °C	200 °C
Detektor	FID (250 °C)	FID (310 °C)	FID (250 °C)	FID (250 °C)
Injektionsvolumen	0,2 µL bis 1 µL	0,2 µL	0,2 µL	1 µL

**Tab. 33: Verwendete GC-Geräte und Analysenparameter.**

### 7.1.6 Enantioselektive Kapillargaschromatographie

Für die enantioselektive Kapillargaschromatographie wurde ein Gaschromatograph Fractovap Series 2150 der Firma Carlo Erba Instruments eingesetzt. Dieser war mit einem LT Programmer Mod. 232, einem Electrometer Mod. 180 und einem Merck/Hitachi D2500 Chromato-Integrator ausgestattet.

Es wurde eine Trennsäule mit Octakis(3-O-butyryl-2,6-di-O-pentyl)- $\gamma$ -cyclodextrin benutzt.

Säulenlänge: 50 m, Temperatur: 60 °C isotherm, Flow: 2.0 mL/min., Trägergas: Wasserstoff.

### 7.1.7 Präparative Kapillargaschromatographie

Für die präparative Kapillargaschromatographie wurde ein Gaschromatograph 6890 N (ausgestattet mit einem Autosampler 7683) der Firma Agilent eingesetzt, der mit einer präparativen Einheit der Firma Gerstel ausgerüstet war (Preparativ Fraction Collector, Julabo FP50 Kryostat).

Als Trennsäule diente eine FFAP-CB von 50 m Länge mit 1 µm Filmdicke und einem Innendurchmesser von 0,53 mm der Firma CS-Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland.

Trärgas: Helium 4.6 5 mL/min., Injektor: 200 °C, Detektor: 250 °C.

Die unterschiedlichen, für die einzelnen Trennprobleme verwendeten Temperaturprogramme werden bei der Isolierung der jeweiligen Komponenten besprochen.

### **7.1.8 Präparative Gaschromatographie**

Für die präparative Gaschromatographie an gepackten Säulen wurde ein modifizierter Gaschromatograph Varian 1400 mit W+W Recorder 312 der Firma W+W electronics Scientific Instruments (Basel, Schweiz) verwendet. Die Trennung erfolgte an gepackten Säulen, auf die ohne Split injiziert werden konnte. Am Ausgang der Säule wurde ein Teil des Gasstroms durch ein Splitventil (Splitverhältnis 1:10) über eine desaktivierte Kapillare (250 µm i.D.) zum Flammenionisationsdetektor geleitet. Der andere Teil gelangte über ein silanisiertes Stahlrohr zum Ausgang, wo die Substanz in einem mit Stickstoff gekühlten Teflonschlauch aufgefangen wurde.

Es wurden folgende präparative Säulen verwendet:

- 2,6-Methyl-3-phenyl-β-cyclodextrin (50/50 SE52) 6,4 % auf Chromosorb W-HP
- SE 52 (15 % auf Chromosorb W-HP)

Beide Säulen hatten einen Innendurchmesser von 0,4 cm und eine Länge von 2 m.

Trärgas: Helium 4.6 benutzt (Flow ca. 120 mL/min.), Injektor: 200 °C, Detektor (FID): 250 °C.

Die unterschiedlichen, für die einzelnen Trennprobleme verwendeten Temperaturprogramme werden bei der Isolierung der jeweiligen Komponenten besprochen.

### **7.1.9 Massenspektrometrie und GC-MS**

Die GC/MS-Messungen wurden mit einem Gaschromatographen HP 5890, der Firma HP, ausgestattet mit einer CpSil 5 CB fused-silica-Kapillarsäule (50 m Länge, 0,25 mm i.D und 0,4 µm Filmdicke) und einem Sektorfeld-Gerät VG 70-250S der Firma VG Analytical durchgeführt.

Es wurden für die Messungen die in Tab. 34 aufgeführten Temperaturprogramme verwendet. Als Trägergas wurde Helium benutzt (Flußrate: 1 mL/min.). Injektortemperatur: 200 °C, Transferline: 270 °C (300 °C bei Triterpenen).

Mono- und Sesquiterpene	80 °C (2 min.), dann mit 10%/min auf 270 °C
Mono- und Sesquiterpene	45 °C mit 5%/min auf 270 °C
Triterpene	130 °C (1 min.), dann mit 20%/min auf 300 °C

**Tab. 34: Temperaturprogramme für die GC-MS-Messungen.**

Massenspektrometrische Parameter

Ionisierung: EI, 70 eV

Ionenquelle: 200 °C

Massenbereich: 35 bis 300 m/z

Es wurden folgende elektronische Datenbanken herangezogen:

a) Mass Lib (V9.3 – 106) (Mass Lib, 1996 – 2008) <sup>145</sup> in Verbindung mit folgenden

Datenbanken:

- Wiley Registry of Mass Spectral Data (4<sup>th</sup> Ed.)
- NIST / EPA / NIH Mass Spectral Library (2005)
- Library MPI Mühlheim (2006)
- Geochemicals (1<sup>th</sup> Ed.)
- MRC Collection (1<sup>th</sup> Ed.)
- CC (4<sup>th</sup> Ed.)

Alle von "Chemical Concepts" Wiley

b) TNO-Bibliothek flüchtiger Verbindungen in Lebensmitteln [TNO Institut, Zeist]

c) MassFinder 3.53c (2004), D. Hochmuth / Prof. König <sup>151</sup>

d) Identification of ess. oil components by gas chromatography/quadrupol mass spectroscopy [Prof. R.P. Adams], Allures Publishing Company, Carol Stream, Illinois, 2001

e) Arbeitskreisinterne MS-Bibliothek etherischer Ölkompenten, [Schultze, Inst. f. Pharmazie, Hamburg]

### 7.1.10 NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, HH-COSY-, HMBC-, HMQC- und NOESY-Spektren erfolgte an den Geräten AMX 400 (400,1 MHz) und DRX 500 (500,1 MHz) der Firma Bruker. Als interner Standard wurde Tetramethylsilan verwendet. Die Lösungsmittel in NMR-Qualität ( $\text{C}_6\text{D}_6$  und  $\text{CDCl}_3$ ) wurden von der Firma Deutero, Kastelaun, Deutschland, bezogen. Die Auswertung erfolgte mit der MestreC-Software der Firma Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien.

### 7.1.11 Polarimetrie

Drehwerte wurden mit einem Polarimeter 341 der Firma Perkin Elmer in einer 1 dm Küvette bei 546 nm (Quecksilberdampf-Lampe) gemessen.

### 7.1.12 Wasserdampfdestillation

Das Pflanzenmaterial wurde in Stickstoff eingefroren und in einem Mörser zerkleinert. Je 300 Gramm des Pilzpulvers wurden in 1 Liter Wasser aufgeschlemmt und 4 h in einer Karlsruher-Wasserdampfdestillationsapparatur<sup>152</sup> destilliert. Als Vorlage dienten 2 mL n-Pentan.

Diese Pentanlösung wurde bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

### 7.1.13 Extraktionsverfahren des Pilzmaterials

Bis zur Verarbeitung erfolgte eine Zwischenlagerung des Probenmaterials bei  $-18$  bis  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

Die Aufarbeitung und Extraktion der unterschiedlichen Pilzarten geschah auf verschiedene Weise.

- *Phellinus robustus* wurde mit einer Axt bzw. Säge vorzerkleinert und anschließend in flüssigem Stickstoff zu Pulver zerstoßen. Das Pulver wurde im Ultraschallbad oder unter Rühren mit einer ausreichenden Menge an n-Hexan bzw. Dichlormethan (jeweils Bedeckung des Extraktionsgutes) mehrfach extrahiert, solange, bis die Extraktionslösung farblos war. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt.
- Insgesamt wurden bei der n-Hexan-Extraktion 593g Pilzmaterial eingesetzt und daraus 2,16g Extrakt erhalten. Bei der Extraktion mit Dichlormethan konnten aus 2816g Pilzmaterial 17,16g Extrakt erhalten werden.
- Bei *Fomitopsis pinicola* wurde die Kruste des gesamten Pilzes mit Dichlormethan abgespült. Der so erhaltene Extrakt wurde am

Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Aus 273g Pilzmasse wurden 12,2g Extrakt erhalten.

- Die Pilze *Heterobasidion annosum* und *Inonotus obliquus* wurden in flüssigen Stickstoff zerkleinert und mittels Wasserdampfdestillation extrahiert.

Die einzelnen Fruchtkörperchargen von *Heterobasidion* enthielten 0,03 % (bezogen auf Frischgewicht) bzw. 0,1 % (bezogen auf Trockengewicht) an wasserdampf-flüchtigen Verbindungen. Insgesamt wurden ca. 14 kg Pilzmaterial geerntet und verarbeitet.

Das Pilzmaterial von *Inonotus obliquus* wies mit einer Menge von weniger als 0,01 % nur Spuren von flüchtigen Verbindungen auf.

#### 7.1.14 Herkunft des Pilzmaterials

Die in dieser Arbeit untersuchten Baumpilzfruchtkörper wurden in den Jahren 2001 bis 2007 an folgenden Orten gesammelt :

*Heterobasidion annosum* : Ohmoor (Hamburg), Segeberger Forst und Tangstedter Forst sowie bei Lopau (Lüneburger Heide) und Bockenem (Hildesheim).

*Phellinus robustus* : Wilhelminenhof bei Güstrow und Hanshagen bei Greifswald.

*Inonotus obliquus* : Sävsjöström, Kronobergslän in Schweden, Lüneburg bei Hamburg, Himmelmoor (Quickborn) bei Hamburg.

*Fomitopsis pinicola* : Harz und Sävsjöström, Kronobergslän in Schweden.

Die Bestimmung der Pilze erfolgte anhand von Literatur<sup>153, 154</sup> und wurde von Priv. Doz. Dr. W. Schultze bestätigt.

## 7.2 Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Phellinus robustus*

### 7.2.1 Hexan-Extrakt

2 mL n-Hexan-Extrakt wurden an 100g Kieselgel säulenchromatisch mit unterschiedlichen Fließmittelsystemen vorgetrennt (LM : Petrolether : Ethylacetat 97% : 3% [400mL], 9 : 1 [200 mL], 7 : 3 [400mL], 4 : 6 [200mL], Ethylacetat [200mL], Methanol [200mL]). Hierbei konnten elf Fraktionen erhalten werden.

### 7.2.1.1 Fraktion 6

Die säulenchromatographische Auftrennung dieser Fraktion wurde an Kieselgel (20 g) durchgeführt. Als Laufmittel dienten 6x 100 mL Dichlormethan, dem jeweils eine steigende Menge an Methanol (von 100 bis 1800  $\mu\text{L}$ ) zugemischt wurde: [100 $\mu\text{L}$ ] + [300  $\mu\text{L}$ ] + [800  $\mu\text{L}$ ] + [1200  $\mu\text{L}$ ] + [1400  $\mu\text{L}$ ] + [1800  $\mu\text{L}$ ]. Das chromatographische Trennergebnis dieser Entwicklung wurde durch begleitende DC-Kontrolle von permanent gesammelten Fraktionen (jeweils ca. 10 mL, entsprechen einem Reagenzglasinhalt) überprüft. Diese wurden schließlich zu sieben Fraktionen vereinigt.

Von diesen Fraktionen erschienen Nummer 2 und 3 besonders vielversprechend für eine anschließende HPLC-Auftrennung.

HPLC-Parameter:

Säule : Caltrex AIII, Kromasil Si100/5  $\mu\text{m}$  250 x 4 mm

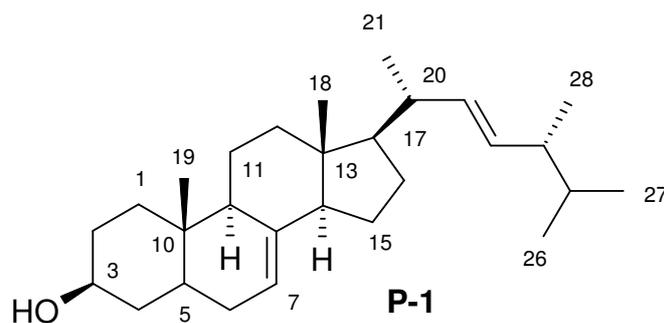
Laufmittel : Acetonitril 45%, Methanol 45% und Wasser 10%.

Flow : 0,7 mL/min

Detektor : UV 240 nm

Als Ergebnis dieser Auftrennung konnten 1,4 mg der Komponente **P-1** erhalten werden, deren Struktur spektroskopisch aufgeklärt wurde:

#### Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**P-1**)



$^{13}\text{C-NMR}$  (125.77 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):

Siehe Tab. 35

EI-MS  $m/z$  (rel. Int.):

398 [M]<sup>+</sup> (100 %), 300 (5), 273 (30), 271 (90), 246 (14), 213 (4), 161 (8), 147 (19), 107 (35), 69 (55), 43 (53)

## 7.2.2 Dichlormethan-Extrakt

Der Dichlormethan-Extrakt wurde an 200g Sephadex-LH20 mittels Größenaus-schlußchromatographie vorgetrennt (LM : Chloroform : Methanol 1:1 [500 mL]).

Hierbei fielen sechs Fraktionen an, von diesen die Nummern 5 und 6 eine Zusammensetzung zeigten, welche für weitere Isolationen erfolgversprechend schienen.

### 7.2.2.1 Fraktion 5

Diese Fraktion wurde an 100 g Kieselgel mit zwei unterschiedlichen Fließmitteln säulenchromatographisch aufgetrennt (LM : n-Hexan : Ethylacetat 1 :1 [250 mL], 1 :2 [500 mL]). Letztendlich wurden fünf Unterfraktionen erhalten. Die Unterfraktion Nr.3 wurde weiter an Kieselgel aufgetrennt (LM : n-Hexan : Ethylacetat : Dichlormethan 2 : 1 : 1 [500 mL]). Dabei wurden vier Fraktionen erhalten, von denen aus der zweiten Fraktion mittels HPLC zwei Reinsubstanzen isoliert werden konnten.

HPLC-Parameter:

Säule : LiChrosorb RP8 10 µm, 250 x 4 mm, von Knauer.

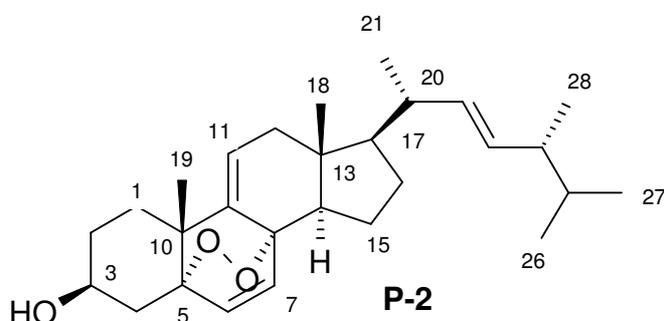
LM : Acetonitril 74%, Methanol 1%, Wasser 25%.

Flow : 0,7 mL/min.

Detektor : 254 nm.

Es konnten die folgenden Komponenten P-2 (2,5 mg) und P-3 (2,4 mg) isoliert und strukturell aufgeklärt werden:

### 5,8-Epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3β-ol (P-2)

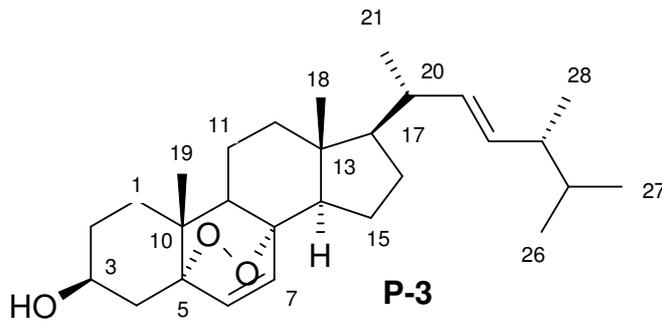


<sup>13</sup>C-NMR (100.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

Siehe Tab. 35

El-MS m/z (rel. Int.):

426 [M]<sup>+</sup> (13 %), 394 (100), 376 (69), 361 (8), 328 (5), 299 (15), 251 (95), 249 (14), 209 (12), 196 (11), 157 (8), 125 (9), 95 (9), 82 (19), 69 (48), 55 (32), 43 (22)

**Ergosterolperoxid (P-3)**<sup>13</sup>C-NMR (100.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

Siehe Tab. 35

El-MS m/z (rel. Int.):

428 [M]<sup>+</sup> (30 %), 410 (47), 396 (100), 363 (24), 337 (12), 285 (18), 267 (18), 225 (9), 213 (12), 159 (13), 152 (20), 95 (24), 82 (46), 69 (68), 55 (49), 47 (35)

<sup>13</sup>C-Verschiebung der aus *Phellinus robustus* isolierten Steroide

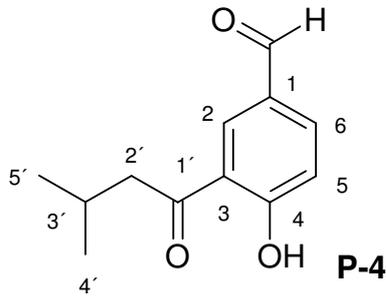
C-Atom	(P-1)	(P-2)	(P-3)
1	37.08 t	32.90 t	35.10 t
2	29.71 t	30.90 t	30.08 t
3	70.70 d	66.70 d	66.87 d
4	38.38 t	36.40 t	37.35 t
5	40.20 d	83.10 s	82.53 s
6	32.53 t	135.50 d	135.80 d
7	117.99 d	131.00 d	131.15 d
8	139.70 s	78.80 s	79.97 s
9	49.88 d	142.90 s	51.51 d
10	34.28 s	38.30 s	37.41 s
11	22.11 t	120.10 d	23.80 t
12	39.68 t	41.50 t	39.75 t
13	43.56 s	44.00 s	44.96 s
14	55.73 d	48.50 d	52.09 d
15	22.98 t	21.28 t	21.03 t
16	29.06 t	29.00 t	29.03 t
17	56.39 d	56.20 d	56.61 d
18	12.57 q	13.30 q	13.27 q
19	13.44 q	25.90 q	18.56 q
20	41.20 d	40.29 d	40.09 d
21	21.40 q	21.10 q	21.27 q
22	135.99 d	135.80 d	135.59 d
23	132.09 d	132.80 d	132.72 d
24	43.37 d	43.10 d	43.17 d
25	33.61 d	33.40 d	33.46 d
26	20.38 g	20.00 q	20.02 q
27	20.38 q	20.30 q	20.33 q
28	17.63 q	17.90 q	17.94 q

Tab. 35: <sup>13</sup>C-NMR-Daten, der aus *Phellinus robustus* isolierten Steroide.

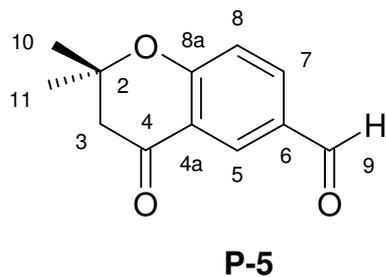
### 7.2.2.2 Fraktion 6

Diese Fraktion wurde an 100 g Kieselgel (LM: n-Hexan:Ethylacetat 4:1 [500 mL]) in fünf Unterfraktionen aufgetrennt. Nur die Unterfraktionen 6.2 und 6.4 bestanden aus Reinsubstanzen, deren Struktur spektroskopisch aufgeklärt wurde:

- 4-Hydroxy-3-(3-methyl-1-oxobutyl)benzaldehyd (**P-4**) / 1,3 mg und
- 2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd (**P-5**) / 12,3 mg.

**4-Hydroxy-3-(3-methyl-1-oxobutyl)benzaldehyd (P-4)**El-MS m/z (rel. Int.):

206 [M]<sup>+</sup> (17), 191 (15), 178 (4), 164 (12), 149 (100), 135 (2), 121 (12), 107 (5), 92 (8), 77 (8), 65 (18), 53 (8)

**2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd (P-5)**El-MS m/z (rel. Int.):

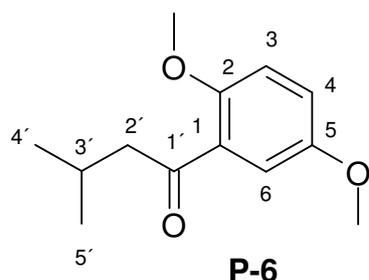
204 [M]<sup>+</sup> (50 %), 189 (100), 182 (14), 148 (72), 132 (12), 124 (12), 119 (25)

**7.2.2.3 Fraktion 5 und 6**

Um noch weitere Verbindungen aus den Fraktionen 5 und 6 zu isolieren, wurden noch weitere Dichlormethan-Extrakte aus *Phellinus robustus* Fruchtkörpern hergestellt und wie unter Punkt 7.2.2 beschrieben, an Sephadex-LH20 säulenchromatographisch aufgetrennt. Da einige Komponenten sowohl in der Fraktion 5, als auch in der Fraktion 6 auftraten, wurden diese für die nachfolgende säulenchromatographische Auftrennung an Kieselgel (LM : n-Hexan:Ethylacetat 7:1 [400 mL], 5:1 [600 mL]), vereinigt.

Dabei erhielt ich entsprechend der bei Punkt 7.2.1.1 beschriebenen Vorgehensweise siebzehn Fraktionen, aus denen wieder ein Bereich an Fraktionen (Nr.2 bis 14) vereinigt und an 100 g Kieselgel erneut aufgetrennt wurde (LM: n-Hexan : Diethylether 8:1 [600 mL]). Bei dieser Trennung konnten 1,9 mg der Verbindung **P-6** isoliert und als 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on identifiziert werden.

### 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (P-6)



#### El-MS m/z (rel. Int.):

222 [M]<sup>+</sup> (20%), 207 (4), 191 (4), 180 (6), 165 (100), 150 (6), 122 (8), 107 (8), 92 (6), 77 (10), 63 (6), 52 (6)

#### 7.2.2.4 Synthese von 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (P-6)

Da es sich bei dieser Verbindung um einen neuen Naturstoff handelte und weder spektroskopische, noch Retentionsdaten zum Vergleich vorlagen, wurde diese Verbindung zur Strukturabsicherung synthetisiert.

In einem eisgekühlten Zweihalskolben mit Calciumchloridrohr 20 mL Isovaleriansäurechlorid und 2,92 g 1,4-Dimethoxybenzol vorgelegt. Unter anhaltendem Rühren erfolgte die Zugabe von 3,2g wasserfreiem Aluminiumchlorid in kleinen Portionen (15 min. Abstand). Zwischen den Aluminiumchloridzugaben wurde nochmals 8 und 6 mL Isovaleriansäurechlorid hinzugegeben.

Nach Hinzufügen des restlichen Aluminiumchlorids wurde der Rührvorgang noch 1,5 h fortgesetzt. Die erhaltene Lösung wurde nach Beendigung der Reaktion in 30 mL Eiswasser gegeben, mit 30 mL Chloroform extrahiert und durch Zugabe von Kaliumhydrogencarbonat neutralisiert. Die gewonnene Chloroformphase wurde am Rotationsverdampfer eingengt und säulenchromatographisch an Kieselgel aufgetrennt [LM: n-Hexan : Diethylether 8:1 100 mL].

Die NMR-Daten dieser synthetisierten Verbindung stimmten mit denen der Komponente **P-6** überein.

### 7.2.2.5 Weitere Inhaltsstoffe aus den Fraktionen 5 und 6

Ein Teil der vereinigten Fraktionen 5 und 6 wurde an 350g Kieselgel säulenchromatographisch mit einem sukzessiv modifizierten Fließmittelsystem aufgetrennt (LM : n-Hexan : Ethylacetat 7:1 [400 mL], 5:1,5 [600 mL], 1:1 [300 mL]).

Hierbei wurde entsprechend dem unter Punkt 7.2.1.1 geschilderten Verfahren dreizehn Fraktionen erhalten.

Fraktion 1 wurde erneut an 50g Kieselgel mit einem schrittweise modifizierten Fließmittelsystem aufgetrennt (LM 1 : n-Hexan [100 mL], LM 2: n-Hexan :Diethylether 9:1 [100 mL], 7:3 [100 mL], 1:1 [200 mL], 3:7 [100 mL]).

Hierbei konnten in der bereits geschilderten Weise (7.2.1.1) sechs Fraktionen erhalten werden. Die erste Fraktion wurde am manuellen, präparativen Gaschromatographen (vgl. Kap. 7.1.8) unter folgenden Bedingungen getrennt:

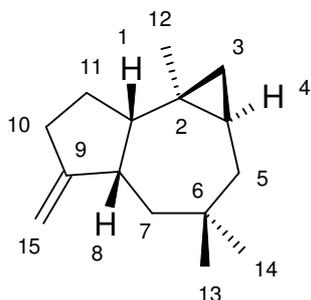
Säule : 2,6-Methyl-3-phenyl- $\beta$ -cyclodextrin.

Programm : 110 °C isotherm.

Bei dieser Analyse wurden die folgenden drei Substanzen isoliert:

### $\Delta^9(15)$ -Africanen **1aR\***, **4aS\***, **7aS\***, **7bR\***-3,3,7b-Trimethyl-5-methylen-decahydrocyclopropa[e]azulen) (**P-7**)

Nur relative Konfiguration bestimmbar.

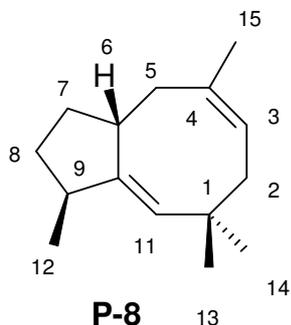


**P-7**

#### El-MS $m/z$ (rel. Int.):

204 [M]<sup>+</sup> (23 %), 189 (11), 175 (5), 161 (19), 148 (30), 136 (27), 121 (21), 105 (25), 93 (69), 79 (93), 67 (35), 55 (42), 41(100)

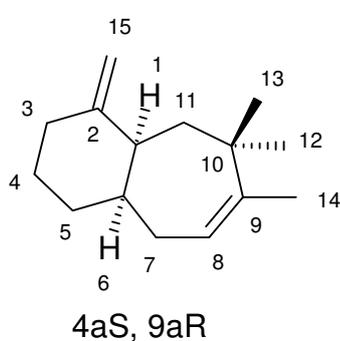
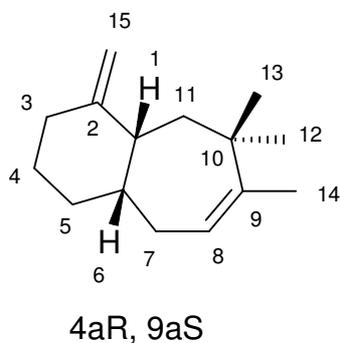
**3,3,6,11-Tetramethylbicyclo[6.3.0]undeca-1,5-dien (11R, 8S) Precapnelladien (P-8)**



El-MS m/z (rel. Int.):

204 [M]<sup>+</sup> (10 %), 189 (12), 161 (4), 150 (10), 136 (100), 121 (56), 107 (18), 93 (20), 79 (16), 67 (12), 53 (15), 41 (28)

**4,5,5-Trimethyl-8-methylenbicyclo[5.4.0]undec-3-en (1S\*, 7R\*) (P-9) / Phellinogen A**



**P-9**

El-MS m/z (rel. Int.):

[M<sup>+</sup>] 204 (23%), 189 (11), 175 (5), 161 (19), 148 (30), 133 (27), 121 (21), 105 (28), 93 (73), 79 (100), 67 (37), 53 (42), 41 (90)

### 7.3 Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Heterobasidion annosum*

#### 7.3.1 Auftrennung des Wasserdampfdestillates

Das Wasserdampfdestillat wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend an Kieselgel, in mehreren Schritten säulenchromatographisch aufge-

trennt. Die qualitative Analyse der erhaltenen Fraktionen wurde zunächst mittels DC durchgeführt. Danach erfolgte die Untersuchung der Fraktionen mittels Gaschromatographie und GC-MS, um die genaue Zusammensetzung zu klären. Zeigten mehrere Fraktionen Überschneidungen im Bereich der Hauptkomponenten und wiesen zudem noch viele weitere Peaks auf, so wurden diese vereinigt und erneut säulenchromatographisch aufgetrennt.

SC-Fraktionen, die im GC-MS unbekannte Inhaltsstoffe in ausreichender Konzentration enthielten, wurden mittels präparativer Kapillargaschromatographie an einer differenten (polaren !) GC-Säule aufgetrennt.

### 7.3.1.1 Isolierung und spektroskopische Daten von Sesquiterpenen

Zur Fraktionszuordnung der Säulenchromatographie, wurde bei allen folgenden Trennungen das unter Punkt 7.2.1.1 beschriebene Verfahren verwendet.

#### Vortrennung 1:

Das ätherische Öl von *Heterobasidion annosum* wurde an 16 g Kieselgel säulenchromatographisch mit unterschiedlichen Fließmitteln steigender Polarität aufgetrennt (LM 1 : n-Pentan [100 mL], LM 2: n-Pentan: Diethylether 9:1 [100 mL], 3:1 [100 mL], 1:1 [100 mL], Diethylether [70 mL]).

Hierbei ergaben sich zehn Fraktionen.

#### Vortrennung 2:

Parallel wurde ein weiteres Wasserdampfdestillat dieses Pilzes säulenchromatographisch an Kieselgel (11 g ) mit anderer Fließmittelzusammensetzung aufgetrennt: LM 1: n-Pentan [50 mL], LM 2: n-Pentan : Diethylether 95% : 5% [100mL], 70% : 30% [100 mL]. Hierbei wurden fünf Fraktionen erhalten.

#### Trennung 1:

Die Fraktionen 1 dieser beiden Vortrennungen wurden vereinigt und dann säulenchromatographisch an Kieselgel (15 g ) gereinigt (LM 1: n-Pentan [100 mL], LM 2: n-Pentan : Diethylether 70% : 30% [100mL]), indem der Vorlauf und Nachlauf der zu isolierenden Peak-Gruppe abgetrennt und für eine spätere Aufarbeitung aufgehoben wurde. Die aus fünf Peaks bestehende Mittelfraktion gelangte am

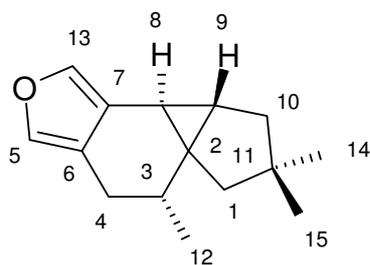
präparativen Kapillar-GC zur Auftrennung; drei dieser Komponenten konnten in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden.

GC-Parameter dieser Trennung (vgl. auch Kap. 7.1.7):

Säule : FFAP.

Programm : 130 °C auf 190 °C; Heizrate: 2,4 °C/min bis 190 °C (5 min. isotherm).

**9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien  
(1S\*,2R\*,9R\*,10S\*) Heterofuran A (H-30)**

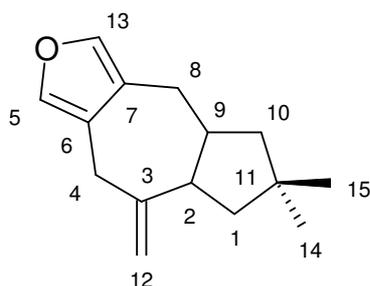


**H-30**

El-MS m/z (rel. Int.):

216 [M]<sup>+</sup> (100), 201 (85), 187 (23), 173 (18), 160 (32), 145 (46), 138 (45), 117 (27), 115 (25), 105 (13), 91 (32), 77 (18), 65 (12), 51 (8), 43 (23)

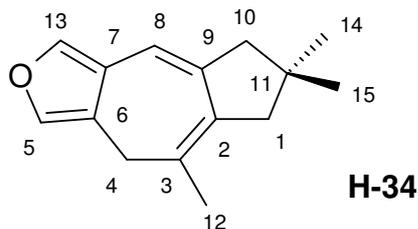
**11,12-Dimethyl-9-methylen-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-3,6-dien (H-31)**



**H-31**

El-MS m/z (rel. Int.):

216 [M]<sup>+</sup> (100), 201 (60), 187 (19), 173 (15), 160 (24), 145 (30), 131 (34), 119 (25), 105 (15), 91 (42), 77 (20), 65 (14), 55 (10), 41 (25)

**9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-1,3,6,9-tetraen (H-34)**El-MS m/z (rel. Int.):

214 [M]<sup>+</sup> (100), 199 (82), 185 (8), 171 (14), 158 (60), 143 (14), 129 (26), 115 (24),  
91 (12), 77 (12), 63 (5), 51 (5)

Trennung 2:

Alle Fraktionen aus den beiden Vortrennungen, die die gleichen unbekanntes Substanzen enthielten, wurden vereinigt, um diese Verbindungen in ausreichender Konzentration zu erhalten. Weitere Anreicherungen wurden durch präparative Gaschromatographie erreicht. Dabei war zu beachten, dass nur eine begrenzte Menge an Kühlfallen (sechs) zum Sammeln der zu isolierenden Komponenten zur Verfügung stand. Da man folglich in einem Lauf nur sechs Verbindungen auffangen konnte, durften die zu analysierenden SC-Fraktionen nicht zu komplex sein.

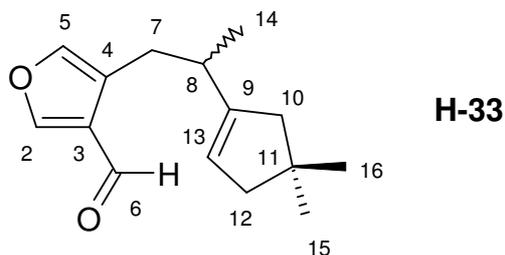
Die auf die geschilderte Weise erhaltene Fraktionsmischung wurde an Kieselgel (15g) säulenchromatographisch aufgetrennt (LM: n-Pentan : Diethylether 95% : 5% [200 mL]). Hierbei fielen vier, zum Teil noch immer sehr komplexe Fraktionen an, von denen sich in der Zusammensetzung nur die Fraktion 2 für eine weitere Aufarbeitung am Kapillar-GC eignete.

GC-Parameter dieser Trennung (vgl. auch Kap. 7.1.7):

Säule : FFAP.

Programm : 130 °C bis 190 °C; Heizrate: 2,5 °C/min; 190 °C (5 min. isotherm).

Auf diese Weise konnte Lactaral (H-33) isoliert werden.

**Lactaral (H-33)**El-MS m/z (rel. Int.):

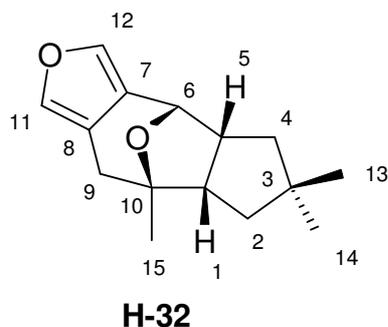
232 [M]<sup>+</sup> (32), 214 (34), 199 (44), 186 (10), 171 (6), 163 (6), 145 (5), 123 (100),  
109 (28), 95 (32), 81 (90), 67 (34), 53 (52), 41 (64)

Trennung 3:

Das ätherische Öl, das bei einer dritten Wasserdampfdestillation dieses Pilzes gewonnen wurde, wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (35 g) auf folgende Weise aufgetrennt: LM 1: n-Pentan [150 mL], LM 2: n-Pentan : Diethylether 97% : 3% [100 mL], 9 : 1 [100 mL], 1 : 1 [50 mL].

Hierbei wurden fünf Fraktionen erhalten. Nur die Fraktionen 3 und 4 eigneten sich für eine weitere präparative Kapillar-GC-Auftrennung. Zunächst wurde die Fraktion 3 untersucht. Die Aufarbeitung erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie bei der vorigen Trennung 2 beschrieben.

Auf diese Weise konnte die Verbindung **H-32** isoliert und die Struktur als Furanether A aufgeklärt werden

**Furanether A (H-32)**

El-MS m/z (rel. Int.):

232 [M]<sup>+</sup> (100), 217 (40), 199 (32), 189 (62), 176 (14), 161 (10), 147 (12), 133 (14), 123 (98), 105 (24), 95 (44), 81 (46), 65 (15), 53 (22), 43 (76)

**7.3.1.2 Untersuchungen zur Artefaktbildung bei Sesquiterpenen**

Die frisch gesammelten Fruchtkörper von *Heterobasidion annosum* wurden nach Reinigung zerkleinert und mit gekühltem n-Pentan (-20 °C) ca. 15 bis 20 Minuten extrahiert (mehrmaliges Schütteln mit Zwischenlagerung im Tiefkühlfach bei -20 °C). Der erhaltene n-Pentan-Extrakt wurde anschließend am Rotationsverdampfer eingeeengt und sofort für die Versuche verwendet (vgl. hierzu Kap. 4.2.4).

1. Versuch:

Als Vorversuch wurde der Extrakt mittels einer zweidimensionalen DC untersucht. Als Laufmittel diente n-Pentan : Diethylether im Mischungsverhältnis 80:20. Zwischen den beiden Entwicklungsschritten blieb die DC-Platte 20 min. lang bei Raumtemperatur an der Luft liegen.

Die Detektion erfolgte im UV-Licht (UV254)

2. Versuch:

Der Extrakt wurde mittels präparativer DC aufgetrennt [LM: n-Pentan : Diethylether 80 : 20]. Die im ersten Versuch ermittelten Banden 1, 2, 4 und 5 (vgl. Abb. 56) wurden isoliert und mittels GC und GC-MS untersucht. Zum Vergleich diente ein am selben Tag vermessener GC-MS-Lauf des Gesamtöles.

3. Versuch:

Die Übertragung der DC-Auftrennung auf die Säulenchromatographie erfolgte durch eine vergleichende DC-Untersuchung von Extrakt und zwei Farbstoffmischungen (DC-Farbstoffgemisch Riedel Nr. 37359 und Testfarbstoffgemisch (lipophil) E. Merck Nr. 1.09353.0050).

Bis zur Elution der grünen Farbstoffbande von der Kieselgelsäule wurden 15 mL Lösungsmittel benötigt. Die interessierende DC-Bande befand sich im Bereich von R<sub>f</sub> 0.65 bis 0.75, d.h. zwischen dem gelben (R<sub>f</sub> 0.55 – 0.60) und dem grünen (bei R<sub>f</sub> 0.94) Farbstoff. Bis zur Elution des gelben Farbstoffs von der Säule wurden weitere 19 mL benötigt.

In dem anschliessenden Hauptversuch zur SC-Auftrennung des Extraktes wurden diese 19 mL in drei getrennten Fraktionen aufgefangen:

1. 15 mL     verworfen
2. 7 mL      1. Fraktion
3. 7 mL      2. Fraktion
4. 5 mL      3. Fraktion

Die so erhaltenen Fraktionen wurden eingeeengt und massenspektrometrisch analysiert.

Parameter der säulenchromatographischen Trennung:

Säule: Innendurchmesser von 30 mm und einer Länge von 260 mm.

Kieselgel: KG 60 TSC mit 10 cm Füllung in der Säule (verdichtet).

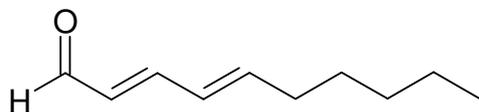
Laufmittel: n-Pentan : Diethylether 90:10

Pilzmasse: 650 g

### 7.3.1.3        **Isolierung weiterer Verbindungen aus dem Wasserdampfdestillat**

Die aus der säulenchromatographischen Trennung Nr. 3 erhaltene Fraktion 4 wurde unter gleichen Bedingung, wie bei der Trennung 2 beschrieben, am präparativen Kapillar-GC aufgetrennt. Hierbei konnten zwei Verbindungen isoliert werden:

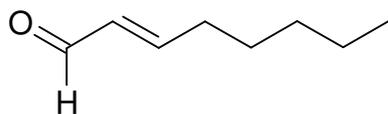
#### **(E,E)-2,4-Decadienal (H-25)**



**H-25**

*EI-MS m/z (rel. Int.):*

152 [M]<sup>+</sup> (8 %), 95 (9), 81 (100), 67 (14), 55 (13), 41 (25)

**E-2-Octenal (H-15)****H-15**El-MS m/z (rel. Int.):

126 [M]<sup>+</sup> (4), 123 (8), 97 (15), 83 (56), 70 (85), 55 (96), 41 (100)

Trennung 4:

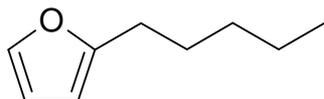
Die aus der säulenchromatographischen Trennung 3 erhaltenen Fraktionen 1, 2 und 5, die für eine Isolierung am präparativen Kapillar-GC nicht besonders geeignet erschienen, wurden vereinigt und erneut an Kieselgel (30 g) säulenchromatographisch mit Fließmittelsystemen steigender Polarität aufgetrennt (LM 1 : n-Pentan [140 mL], LM 2: n-Pentan : Diethylether 95% : 5% [200 mL], 90% : 10% [100 mL]). Hierbei wurden sieben Fraktionen erhalten.

Eine GC-Untersuchung ergab jedoch, dass nur die Fraktion 5 ausreichende Substanzmengen für eine präparative GC-Analyse enthielt. Diese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule : FFAP

Programm : 80 °C bis 190 °C; Heizrate: 3 °C/min, dann mit 7 °/min auf 210 °(10 min. isotherm).

Auf diese Weise konnte 2-Pentylfuran (**H-9**) isoliert und in der Struktur aufgeklärt werden.

**2-Pentylfuran (H-9)****H-9**<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ 0.89 (3H, t, CH<sub>3</sub>, *J* = 6.9 Hz, H-5'), 1.32 (2H, m, CH<sub>2</sub>, H-3'), 1.32 (2H, m, CH<sub>2</sub>, H-4'), 1.62 (2H, m, CH<sub>2</sub>, H-2'), 2.61 (2H, t, CH<sub>2</sub>, *J* = 7.6 Hz, H-1'), 5.96 (1H, dd, CH, *J* = 3 Hz

+ 0.6 Hz, H-3), 6.27 (1H, dd, CH,  $J= 3 \text{ Hz} + 1.9 \text{ Hz}$ , H-4), 7.29 (1H, br d, CH,  $J= 1.9 \text{ Hz} + 0.6 \text{ Hz}$ , H-5)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  14.2 (q, C-5'), 22.9 (t, C-4'), 28.1 (t, C-2'), 28.4 (t, C-1'), 31.8 (t, C-3'), 104.7 (d, C-3), 109.9 (d, C-4), 141.0 (s, C-2), 157.1 (d, C-5)

El-MS  $m/z$  (rel. Int.):

138 [M]<sup>+</sup> (24), 123 (2), 109 (2), 95 (8), 81 (100), 67 (4), 53 (24), 41 (15)

Trennung 5:

Das ätherische Öl der *Heterobasidion-annosum*-Fruchtkörper, wurde säulen-chromatographisch an Kieselgel in zwei Fraktionen aufgetrennt.

Fraktion 1: LM : n-Pentan [100 mL] ,

Fraktion 2: LM : Diethylether [100 mL].

Die Fraktion 1 wurde ausschließlich am GC mit gepackter präparativer Säule aufgetrennt. Die Isolierung von Substanzen aus der Fraktion 2 erfolgte am präparativen Kapillar-GC und an dem Gerät mit der gepackten Säule .

Auftrennung der ersten Fraktion an der gepackten präparativen GC-Säule.

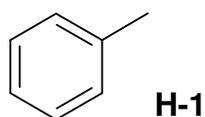
Säule : SE-52

Starttemperatur : 50 °C

Verlauf : Alle 5 min. wurde die Temperatur manuell um 5° erhöht, bis die Endtemperatur von 140 °C erreicht war. Vor dem Start der neuen Analyse wurde die Säule bei 180 °C ausgeheizt.

Auf diese Weise konnte folgende Verbindung als Pilzinhaltsstoff isoliert werden:

**Toluol (H-1)**



El-MS m/z (rel. Int.):

91 [M]<sup>+</sup> (100 %), 65 (28), 51 (18), 39 (31)

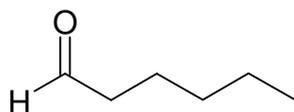
<sup>1</sup>H-NMR (400.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ 2.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>, H-7), 7.13 – 7.29 (5H, m, CH, H-2 bis H-6)

Auftrennung der zweiten Fraktion am manuellen präparativen GC.

Unter den gleichen Bedingungen wie Fraktion 1, wurde auch Fraktion 2 aufgetrennt.

Daraus resultierte die Isolierung der Komponente **H-2**.

**Hexanal (H-2)****H-2**<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ 0.91 (3H, t, CH<sub>3</sub>, *J* = 6.9 Hz, H-6), 1.33 (2H, m, CH<sub>2</sub>, H-4), 1.33 (2H, m, CH<sub>2</sub>, H-5), 1.63 (2H, m, CH<sub>2</sub>, H-3), 2.42 (2H, dt, CH<sub>2</sub>, *J* = 7.4 Hz + 1.8 Hz, H-2), 9.77 (1H, t, CHO, *J* = 1.8 Hz, H-1)

<sup>13</sup>C-NMR (125.77 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ 14.5 (q, C-6), 22.3 (t, C-3), 23.2 (t, C-5), 31.9 (t, C-4), 44.2 (t, C-2), 203.3 (d, C-1)

El-MS m/z (rel. Int.):

100 [M]<sup>+</sup> (5), 82 (13), 72 (15), 67 (10), 56 (74), 44 (100)

Auftrennung der zweiten Fraktion am präparativen Kapillar-GC.

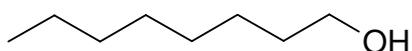
Die durch die säulenchromatographische Trennung erhaltene Fraktion 2 wurde am präparativen Kapillar-GC aufgetrennt, um Substanzen zu isolieren, deren Konzentration für den Einsatz der präparativen gepackten GC-Säule zu klein waren, bzw. deren Abtrennung eine höhere Trennleistung erforderte.

Säule : FFAP

Programm : 100 °C bis 190 °C; Heizrate: 3 °C/min, dann mit 7 °/min auf 210 °C (14 min. isotherm).

Durch diese Auftrennung konnten drei Verbindungen isoliert werden, wobei allerdings nur die Verbindung **H-8-1** in ausreichender Menge und Reinheit für eine NMR-Strukturaufklärung gewonnen werden konnte. Die Substanzen 1-Octanol (**H-8-2**) und 3-Octanon (**H-17**) konnten nur auf Basis des Massenspektrums und ihrer Retentionszeit identifiziert werden.

### 1-Octanol (H-17)

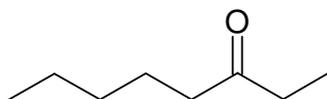


**H-17**

El-MS m/z (rel. Int.):

100 [M]<sup>+</sup> (4 %), 84 (48), 70 (58), 56 (100)

### 3-Octanon (H-8-2)

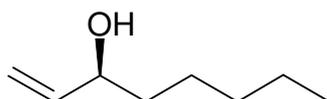


**H-8-2**

El-MS m/z (rel. Int.):

128 [M]<sup>+</sup> (10 %), 99 (50), 85 (8), 72 (56), 57 (82)

### R(-)-1-Octen-3-ol (H-8-1)



**H-8-1**

El-MS m/z (rel. Int.):

128 [M]<sup>+</sup> (1,5%), 99 (11,5), 85 (12), 72 (32), 57 (100), 43 (70)

### 7.3.1.4 Bestimmung der absoluten Konfiguration von 1-Octen-3-ol

Diese Bestimmung erfolgte durch enantioselektive Gaschromatographie. Zur Trennung der Enantiomere vom 1-Octen-3-ol, wurden die Proben der isolierten Substanz und der beiden, als Vergleichssubstanzen zur Verfügung stehenden, Enantiomere in Dichlormethan gelöst und in einem 7 mL Vial mit 0.1 mL einer 0.05 M Triethylamin-Lösung, sowie 10  $\mu$ L Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Danach wurde die Probe eine Minute geschüttelt und nach 30 min. die organische Phase abgetrennt. Die Trocknung der organischen Phase erfolgte über wasserfreiem Natriumsulfat. Nach anschließender Filtration gelangten die Trifluoressigsäureester von R-(-)- und S-(+)-1-Octen-3-ol an einer Oktakis(3-O-butyryl-2,6-di-O-pentyl)- $\gamma$ -CD-Säule bei 60 °C (isotherm) zur Analyse.

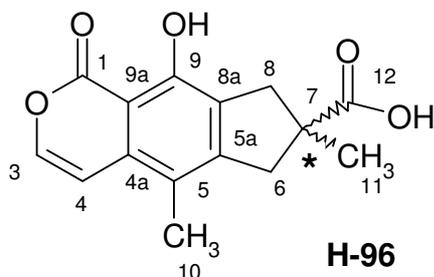
Als Vergleichssubstanzen dienten Enantiomere, die bei früheren Arbeiten von Mitgliedern des Arbeitskreis Prof. Dr. W. A. König isoliert wurden.

### 7.3.1.5 Isolierung von Fomajorin S aus *Heterobasidion annosum*

Das zerkleinerte Pilzmaterial (350g) wurde mit Methanol am Ultraschall extrahiert und der erhaltene Extrakt an Sephadex-LH20 säulenchromatographisch vorgetrennt (LM: Methanol : Chloroform 1 : 1).

Hierbei wurden drei Fraktionen erhalten. Die dritte Fraktion wurde an 30g Kieselgel weiter aufgetrennt (LM: Ethylacetat [500 mL]). Bei dieser Trennung konnte die Komponente **H-96** als Reinsubstanz (10,5 mg) gewonnen werden.

### Fomajorin S (H-96)



El-MS m/z (rel. Int.):

[M+] 274 (100%), 246 (20), 233 (8), 229 (52), 200 (10), 185 (12), 128 (7), 115 (5), 91 (3), 40 (45)

## 7.4 Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Fomitopsis pinicola*

### 7.4.1 Dichlormethanextrakt der Kruste von *Fomitopsis pinicola*

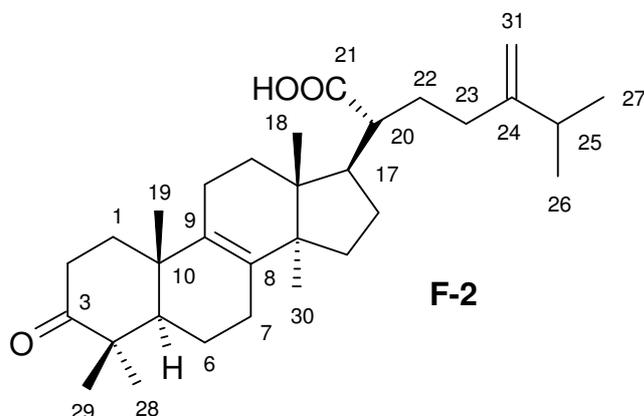
Als Vorversuch wurde von einer kleineren Menge dieses Baumpilzes ein Dichlormethan-Extrakt der Kruste hergestellt und säulenchromatographisch an Kieselgel mittels eines Stufengradienten aufgetrennt: LM : Petrolether : Ethylac. 4:1 [500 mL], 3:1 [1000 mL], 2:1 [500 mL], 1:1 [500 mL], 1:2 [500 mL], 0:1 [500 mL] und Methanol [500 mL]. Bei dieser Trennung konnten acht Fraktionen gewonnen werden (Gradient in Anlehnung an <sup>155</sup>).

Proben dieser Fraktionen wurden mit MSTFA [N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid] zu Trimethylsilyl-Derivaten derivatisiert (100 µL Probe mit 100 µL Reagenz) und mittels GC-MS analysiert. Weitere Untersuchungen konzentrierten sich auf eine Fraktion, die nur aus zwei Verbindungen bestand, wobei eine als unbekannt anzusehen war, d.h. evtl. einen neuen Naturstoff darstellte.

Einen Teil dieser Fraktion wurde als Vergleich für die Dünnschicht-chromatographie zurückgehalten, um bei den anschließenden chromatographischen Trennungen die betreffende Fraktion zu lokalisieren. Dabei erfolgte jeweils nur die Abtrennung der Fraktion, in der die unbekannte Substanz enthalten war.

Im Einzelnen wurde folgendermaßen verfahren: 12.2 g Dichlormethanextrakt (aus 500 g Pilzmaterial) gelangte an 70 g Kieselgel mit folgenden Lösungsmittelgradienten säulenchromatographisch zur Auftrennung: n-Hexan : Ethylac. 4:1 [250 mL], 2:1 [100 mL], 1:1 [100 mL]. Die durch DC-Vergleich ermittelte Fraktion mit der zu isolierenden unbekanntem Komponente wurde erneut an der gleichen Menge Kieselgel mit einem anderen Laufmittelsystem chromatographiert (LM: n-Hexan : Ethylac. 9:2 [220 mL], 8:3 [110 mL], 7:4 [110 mL]). Bei dieser Auftrennung konnte eine Mischung aus der bekannten Pinicolsäure A (**F-1**) und dem neuen Naturstoff 23-Methylen-3-oxolanosta-8-en-21-carbonsäure (vorgeschlagener Name: Pinicolsäure F) (**F-2**) isoliert werden.

### 24-Methylen-3-oxolanosta-8-en-21-carbonsäure (Fomeffinsäure A) (F-2)



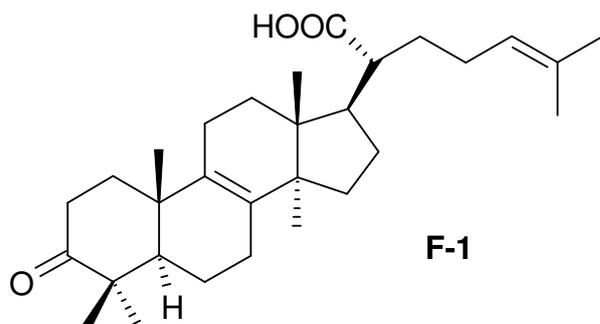
$^{13}\text{C-NMR}$  (100.13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):

Siehe Tab. 36

EI-MS  $m/z$  (rel. Int.):(TMS-Ester)

540  $[\text{M}]^+$  (16 %), 525 (64), 497 (3), 450 (1), 444 (2), 435 (13), 429 (7), 417 (2), 407 (65), 389 (2), 379 (2), 373 (1), 365 (1), 354 (5), 339 (9), 323 (5), 311 (17), 297 (41), 281 (14), 271 (13), 255 (10), 145 (13), 227 (9), 213 (9), 207 (42), 199 (9), 187 (12), 171 (15), 159 (23), 145 (27), 133 (24), 119 (30), 107 (27), 95 (32), 81 (28), 73 (100), 55 (45), 43 (39)

### 3-Oxolanosta-8,24-dien-21-carbonsäure (Pinicolsäure A) (F-1)



$^{13}\text{C}$ -NMR (100.13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):

Siehe Tab. 36

EI-MS m/z (rel. Int.):(TMS-Ester)

526 [M]<sup>+</sup> (9 %), 511 (39), 481 (1), 444 (37), 429 (12), 421 (11), 409 (1), 403 (1), 396 (63), 375 (1), 354 (17), 339 (9), 321 (9), 311 (16), 297 (41), 281 (21), 271 (13), 255 (9), 245 (12), 226 (23), 207 (75), 201 (10), 187 (15), 171 (26), 158 (41), 145 (26), 133 (29), 119 (30), 108 (32), 95 (39), 81 (29), 73 (100), 55 (35), 41 (41)

$^{13}\text{C}$ -Verschiebungen der aus <i>Fomitopsis pinicola</i> isolierten Steroide		
C-Atom	Pinicolsäure A $\text{CDCl}_3$ (F-1)	Fomeffinsäure A $\text{CDCl}_3$ (F-2)
1	36.18 t	36.18 t
2	34.58 t	34.58 t
3	217.61 s	217.61 s
4	47.4 s	47.4 s
5	51.25 d	51.25 d
6	19.4 t	19.4 t
7	25.9 t	25.9 t
8	133.18 s	133.18 s
9	135.04 s	135.04 s
10	36.96 s	36.96 s
11	20.95 t	20.95 t
12	28.87 t	28.87 t
13	44.3 s	44.3 s
14	49.64 s	49.64 s
15	30.45 t	30.45 t
16	27.06 t	27.06 t
17	47.16 d	47.16 d
18	16.09 q	16.09 q
19	18.68 q	18.68 q
20	47.68 d	47.68 d
21	181.58 s	181.58 s
22	32.46 t	32.53 t
23	26.32 t	32.74 t
24	123.54 d	155.17 s
25	132.29 s	34.48 d
26	17.65 q	22.33 q
27	25.7 q	22.33 q
28	21.28 q	21.28 q
29	26.22 q	26.22 q
30	24.41 q	24.41 q
31		106.88 t

Tab. 36:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der aus *Fomitopsis pinicola* isolierten Steroide.

## 7.5 Herstellung und Fraktionierung des Wasserdampfdestillates von *Inonotus obliquus*

Frische Fruchtkörper (450g) von *Inonotus obliquus* wurde zerkleinert und vier Stunden einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Die flüchtigen Verbindungen wurden in n-Pentan als Vorlage aufgefangen und der größte Teil davon säulenchromatographisch an Kieselgel in fünf Fraktionen aufgetrennt. Als Laufmittel-Gradient dienten n-Pentan [100 mL], n-Pentan / Diethylether 8:2 [165 mL] und Diethylether [50 mL]. Die so erhaltenen Fraktionen wurden, ebenso wie das Gesamtöl, mittels GC und GC-MS untersucht.

Zur Bestimmung des Gehalts an flüchtigen Verbindungen wurden 350 g Fruchtkörper dreieinhalb Stunden destilliert. Die hier verwendete Methode entspricht der Gehaltsbestimmung von ätherischen Ölen in Drogen nach dem europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.)<sup>92</sup>. Bei dieser Bestimmung konnte ein Gehalt von 0,02 mL an flüchtigen Verbindungen ermittelt werden. Dieser Wert entspricht einen Massenanteil von 0,006 % an flüchtigen Verbindungen im Pilz.

Zur Identifizierung wurden die Massenspektren mit den Angaben der unter Kap. 7.1.9 genannten Datenbanken abgeglichen.

Soweit es möglich war, wurden Vergleichssubstanzen verwendet, um die Identifizierung anhand von authentischen MS- und RI-Daten abzusichern. Im einzelne wurden die in Tab. 37 aufgeführten Verbindungen verwendet.

Die Identifizierung von  $\alpha$ -Bisabolol im Öl erfolgte über den GC und GC-MS-Vergleich dieser Komponente mit der entsprechenden Verbindung aus dem etherischen Öl von *Matricaria recutita*. Es stand frisches Öl der Kamille aus dem Praktikum der pharmazeutischen Biologie zur Verfügung.

Vergleichssubstanz	Herkunft
1-Methoxy-4-methylbenzen (4-Methylanisol)	Lancaster 5857
2-Methylbenzaldehyd	Fluka 89830
3-Methylbenzaldehyd	Fluka 89840
4-Methylbenzaldehyd	Fluka 89850
4-Phenyl-3-buten-2-on	Herstellung Grundpraktikum
Methylpalmitat	Sigma P0750
Linolsäuremethylester	Fluka 62280
Hexadecanol	Fluka 52250
Pentadecansäure	Roth 4674905

**Tab. 37: Verwendete Vergleichssubstanzen für *Inonotus obliquus*.**

## 8 Gefahrstoffanhang

Substanz	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Methanol	F, T	11-23/25	7-16-24-45
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Ethylacetat	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33
Petrolether 60-70 °C	F	11	9-16-29-33
n-Hexan	Xn, F, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	9-16-29-33-36/37-61-62
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
2-Propanol	F	11	7-16
Essigsäure 100%	C	10-35	23-26-45
Dichlormethan	Xn	20-40	24
Wasserstoff	F	12	9-16-33
d-Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Salzsäure 37%	C	34-37	26-36/37/39-45
Diazomethan	T	45	45-53
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Kaliumhydroxid	C	35	26-37/39-45
n-Pentan	F+, Xn, N	12-51/53-65-66-67	9-16-29-33-61-62
d-Benzol	F, T	45-11-48/23/24/25	53-45
Schwefelsäure 96%	C	35	26-30-45
Anisaldehyd	Xn	22	-
Isovaleriansäurechlorid	F, C	11-34	16-23-9
Phenol	T	24/25 34	28A 45
Aluminiumchlorid, wasserfrei	C	34	28A 45-7/8
Paraformaldehyd	Xn	20/22-36/37/38-40-43	24-26-36/37/39-45
Phosphorpentoxid	C	35	22-26-45
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Salicylaldehyd	Xn	21/22-36/38	26-36/37/39
1,4-Dimethoxybenzol	Xi	36/37/38	24/25

## 9 Spektrenanhang

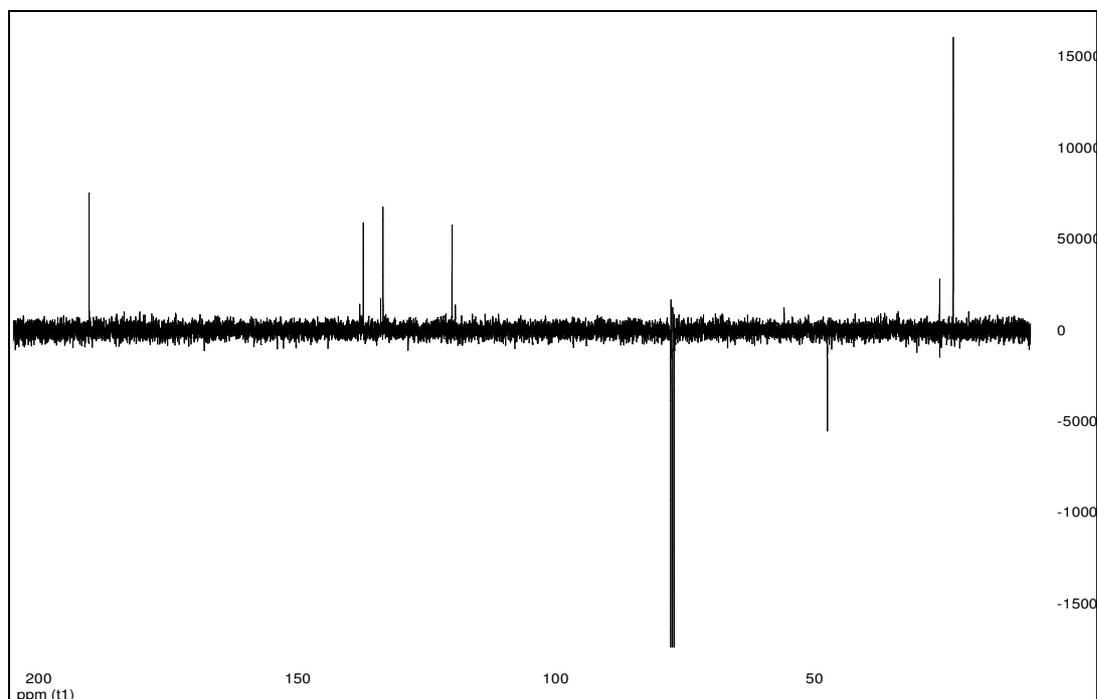


Abb. 69:  $^{13}\text{C-NMR}$  (100,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von 4-Hydroxy-3-(3-methyl-1-oxobutyl)benzaldehyd (P-4).

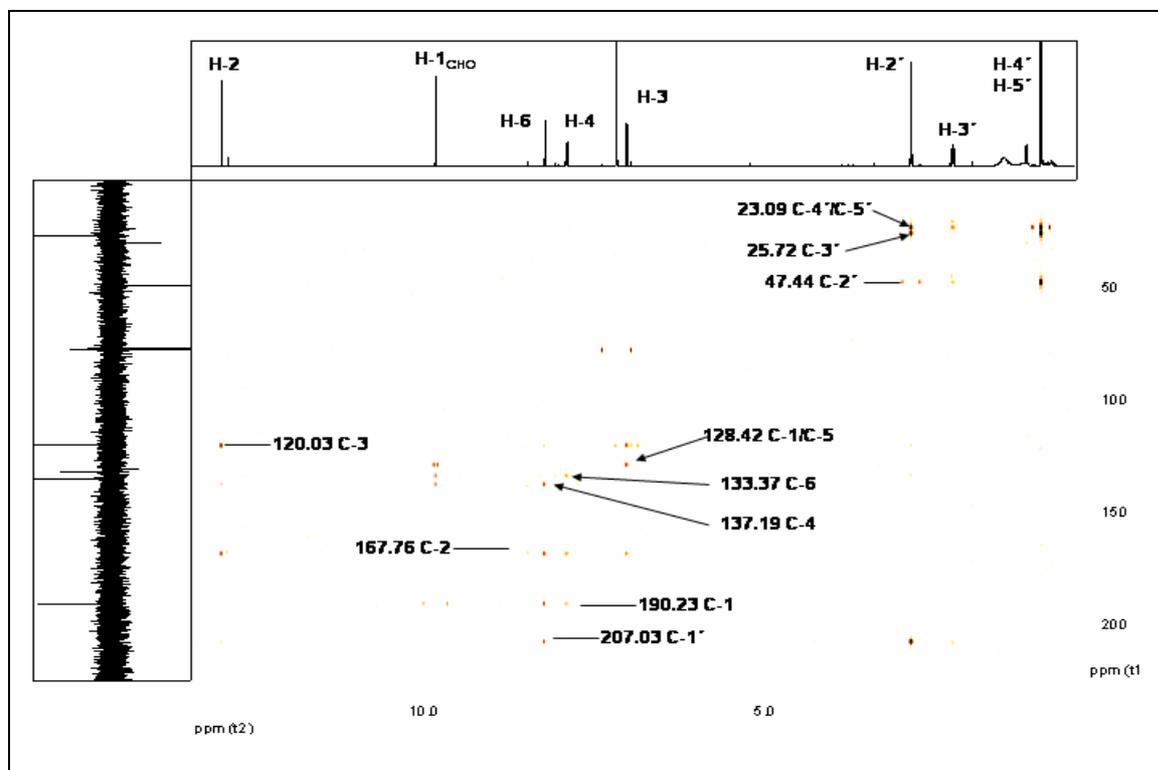


Abb. 70: HMBC (500,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von 4-Hydroxy-3-(3-methyl-1-oxobutyl)benzaldehyd (P-4).

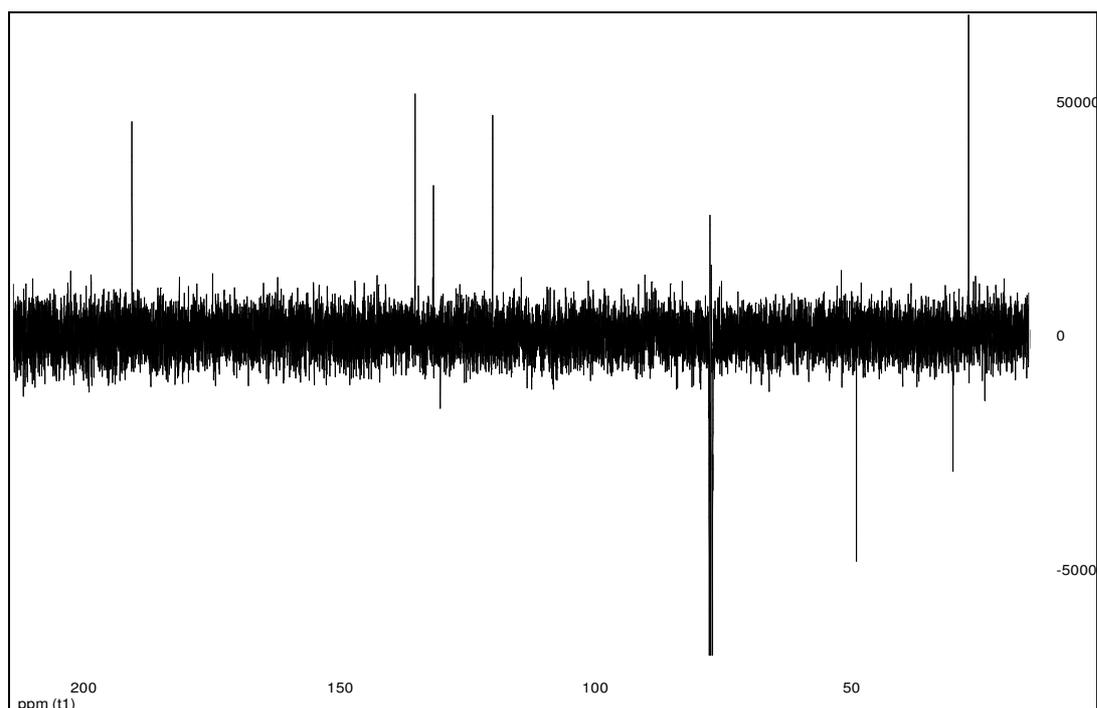


Abb. 71:  $^{13}\text{C-NMR}$  (100,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von 2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd (P-5).

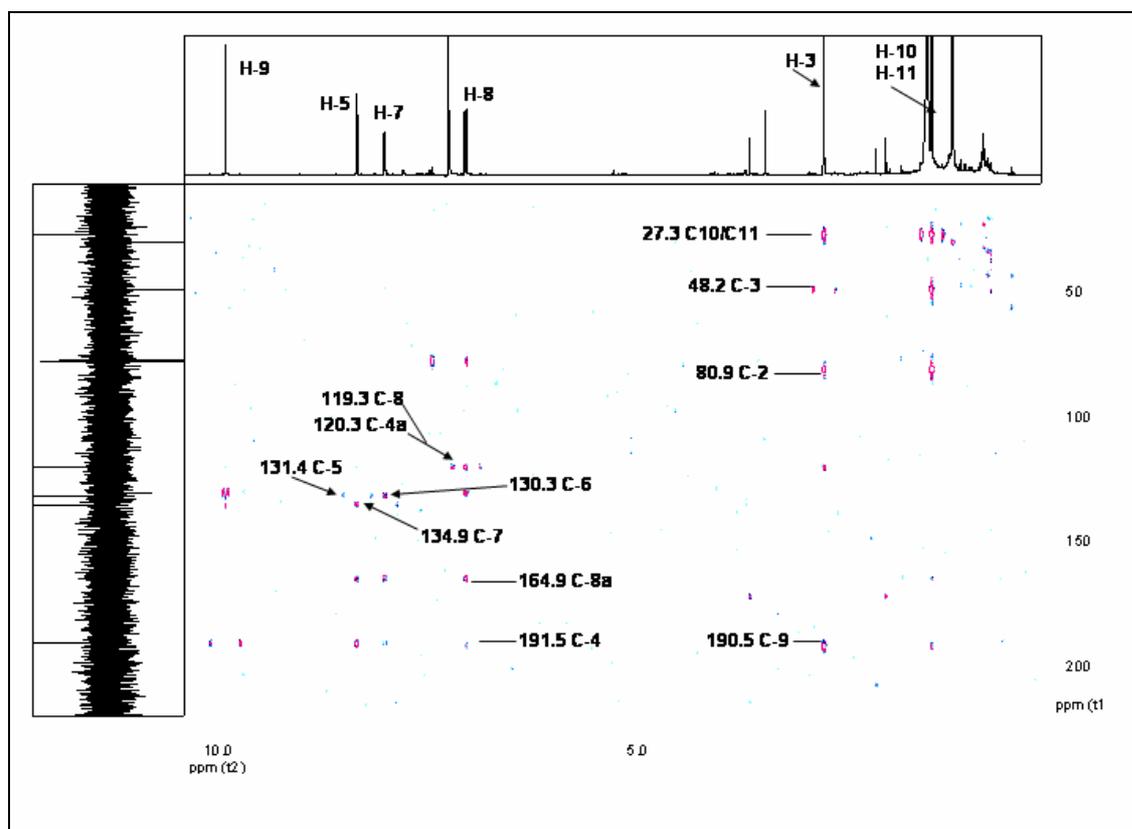


Abb. 72: HMBC (500,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von 2,2-Dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyd (P-5).

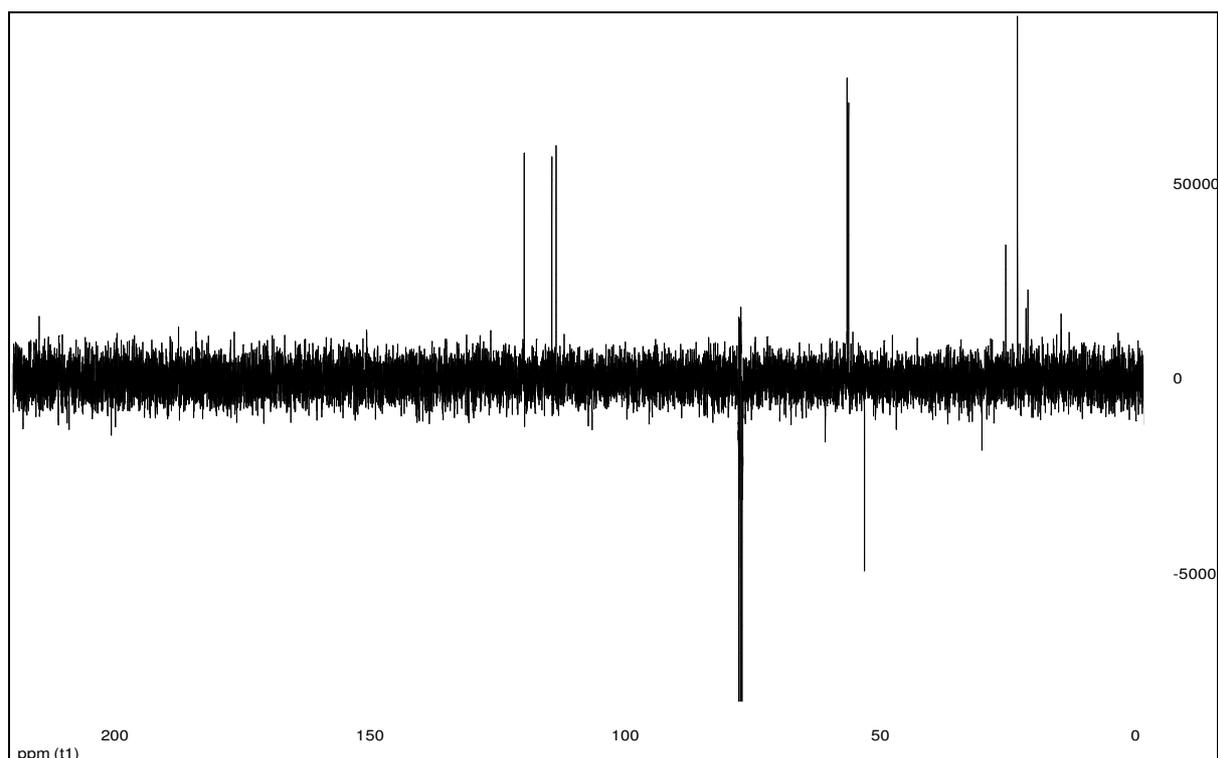


Abb. 73:  $^{13}\text{C-NMR}$  (100,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (P-6).

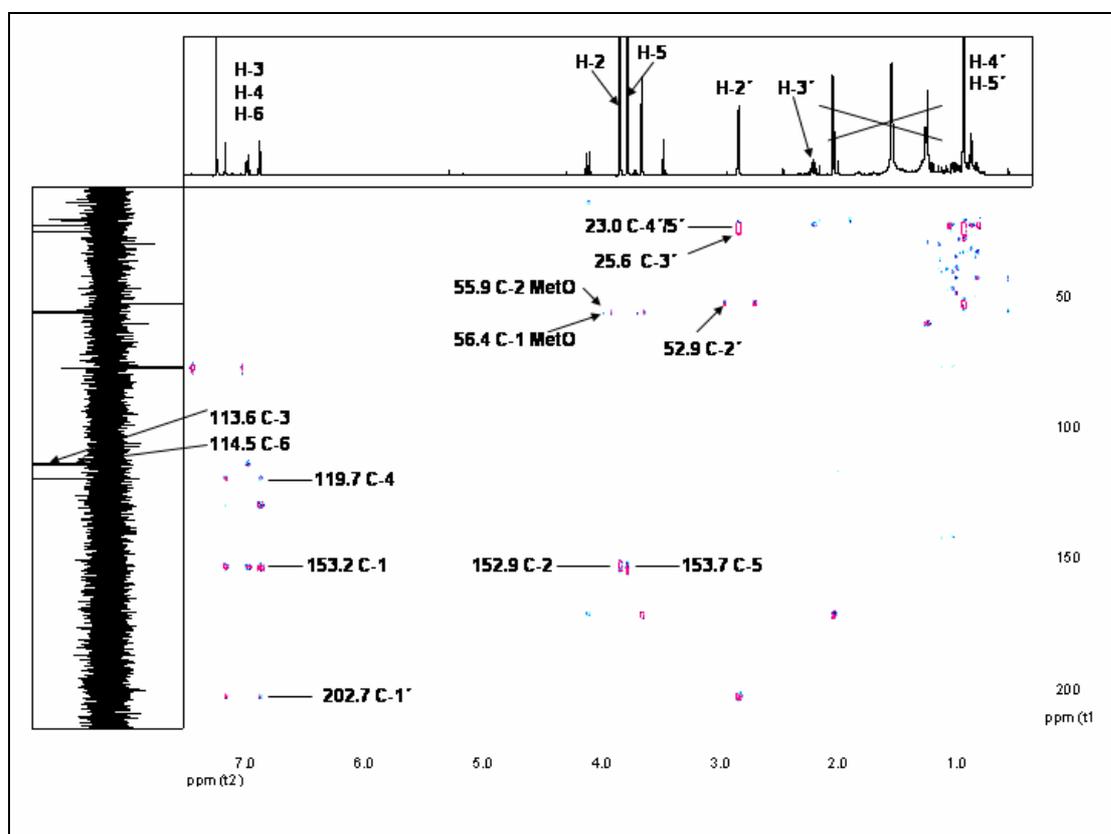


Abb. 74: HMBC (500,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3-methylbutan-1-on (P-6).

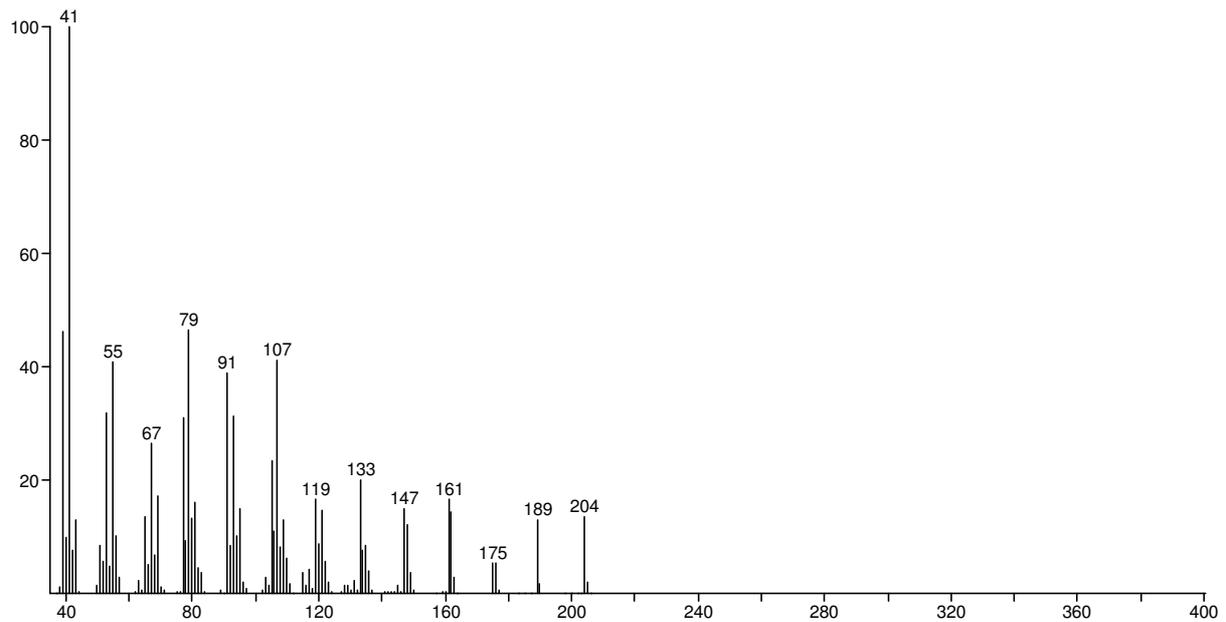


Abb. 75: EI-Massenspektrum von  $(1R^*, 4aS^*, 7aS^*, 7bR^*)$ -3,3,7b-Trimethyl-5-methylen-decahydrocyclopropa[e]azulen (P-7).

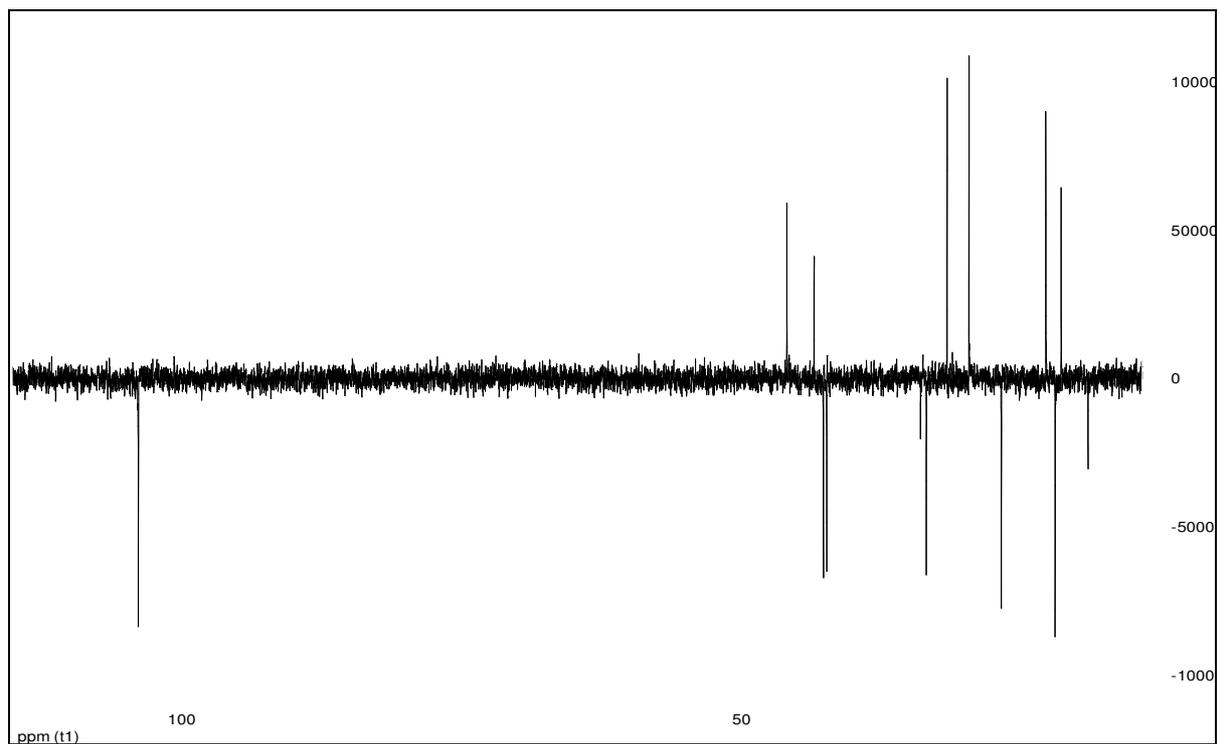


Abb. 76:  $^{13}\text{C}$ -NMR (100,13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) von  $(1R^*, 4aS^*, 7aS^*, 7bR^*)$ -3,3,7b-Trimethyl-5-methylen-decahydrocyclopropa[e]azulen (P-7).

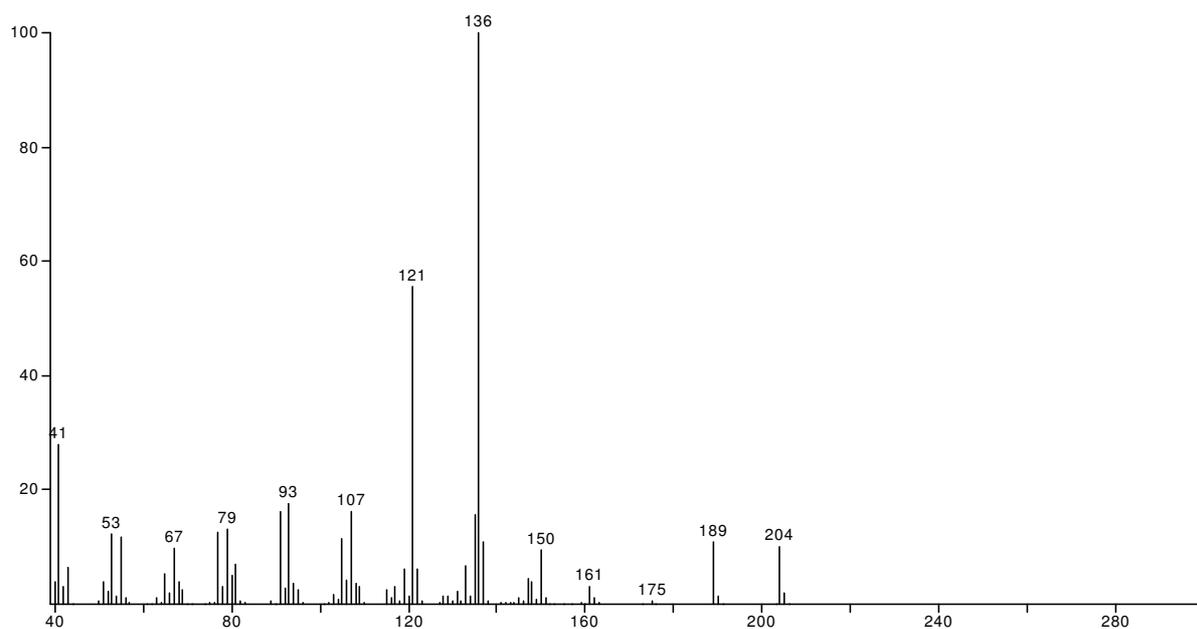


Abb. 77: EI-Massenspektrum von Precapnelladien (P-8).

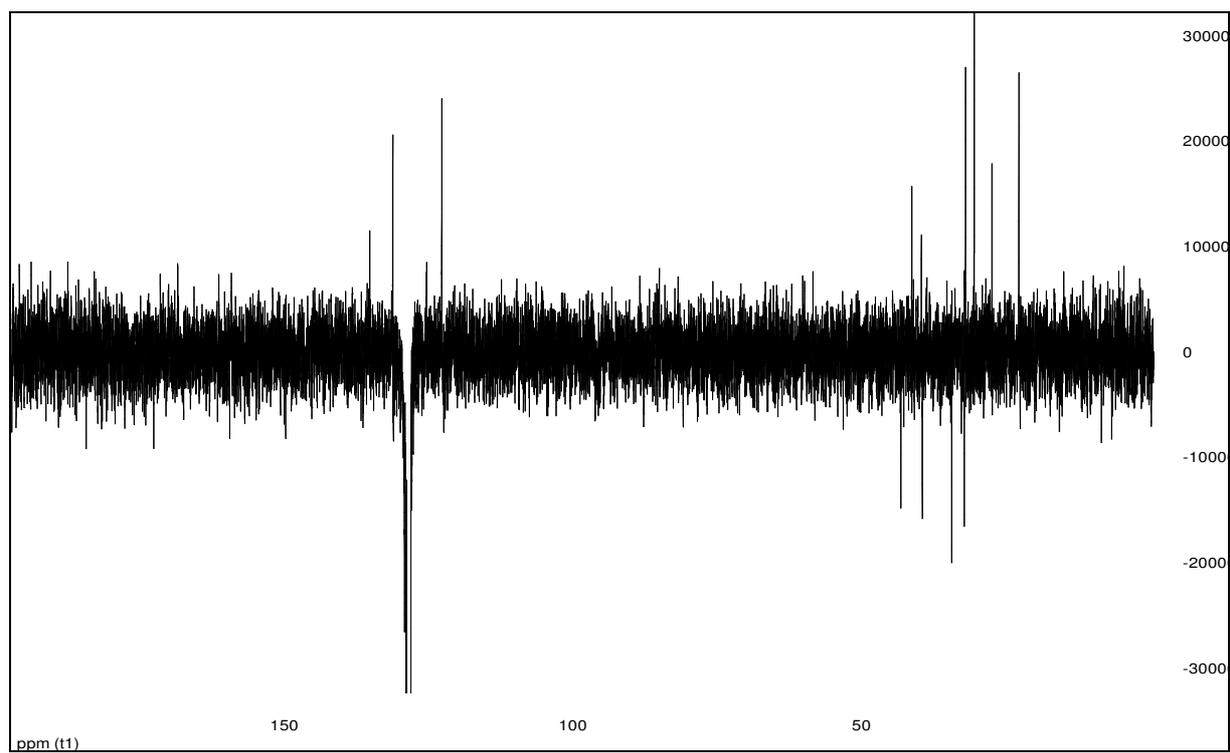


Abb. 78:  $^{13}\text{C}$ -NMR (100,13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) von Precapnelladien (P-8).

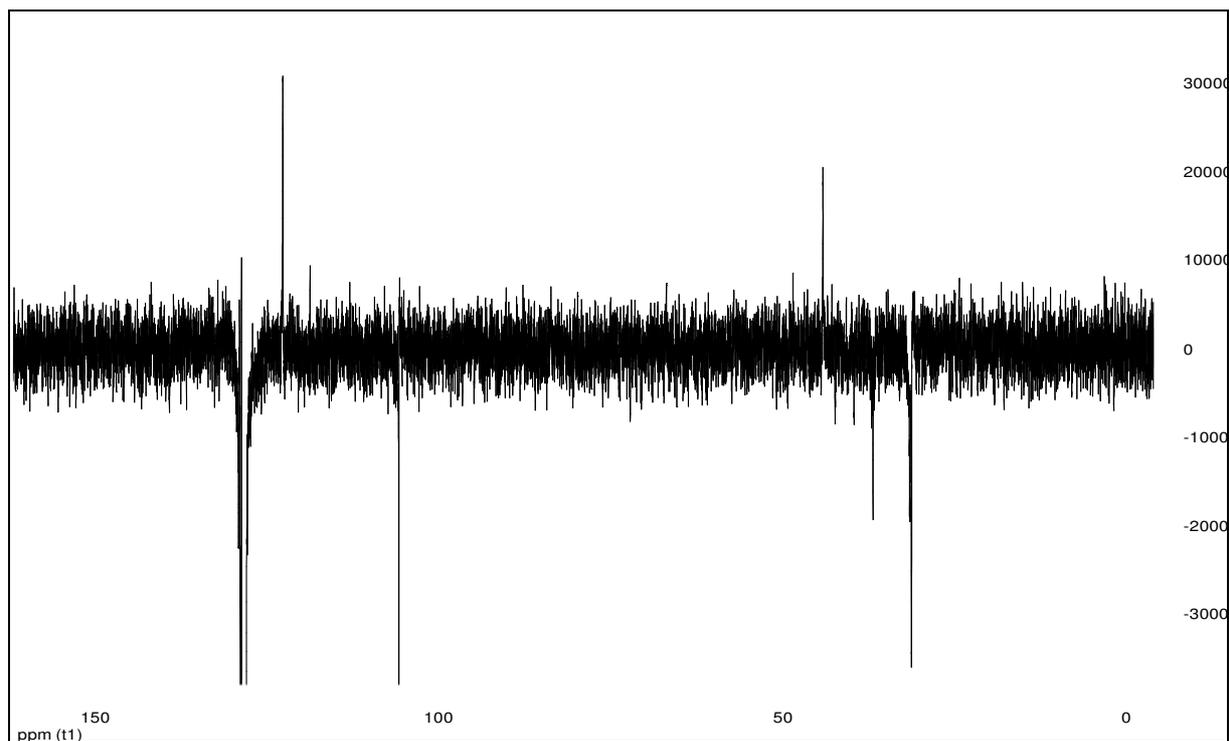


Abb. 79:  $^{13}\text{C-NMR}$  (100,13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) von 4,5,5-Trimethyl-8-methylenbicyclo[5.4.0]undec-3-en (P-9).

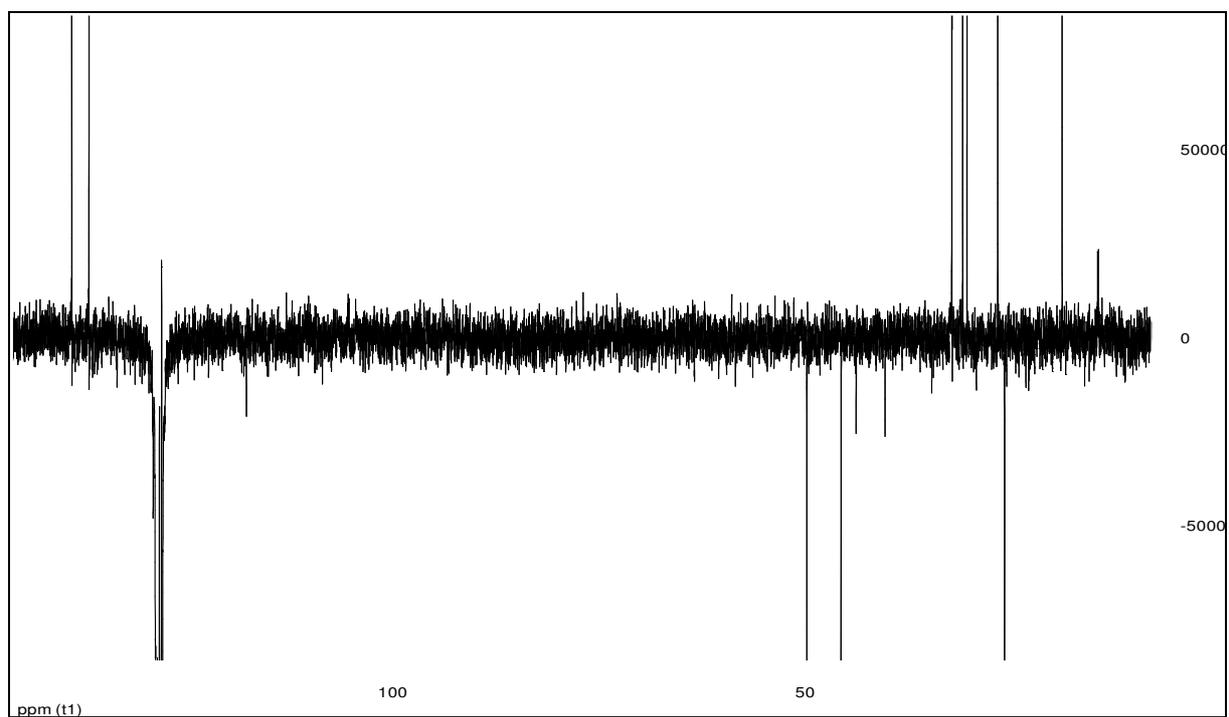


Abb. 80:  $^{13}\text{C-NMR}$  (100,13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) von 9,12,12-Trimethyl-5-oxatetracyclo[8.3.0.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,7</sup>]-trideca-3,6-dien (H-30).

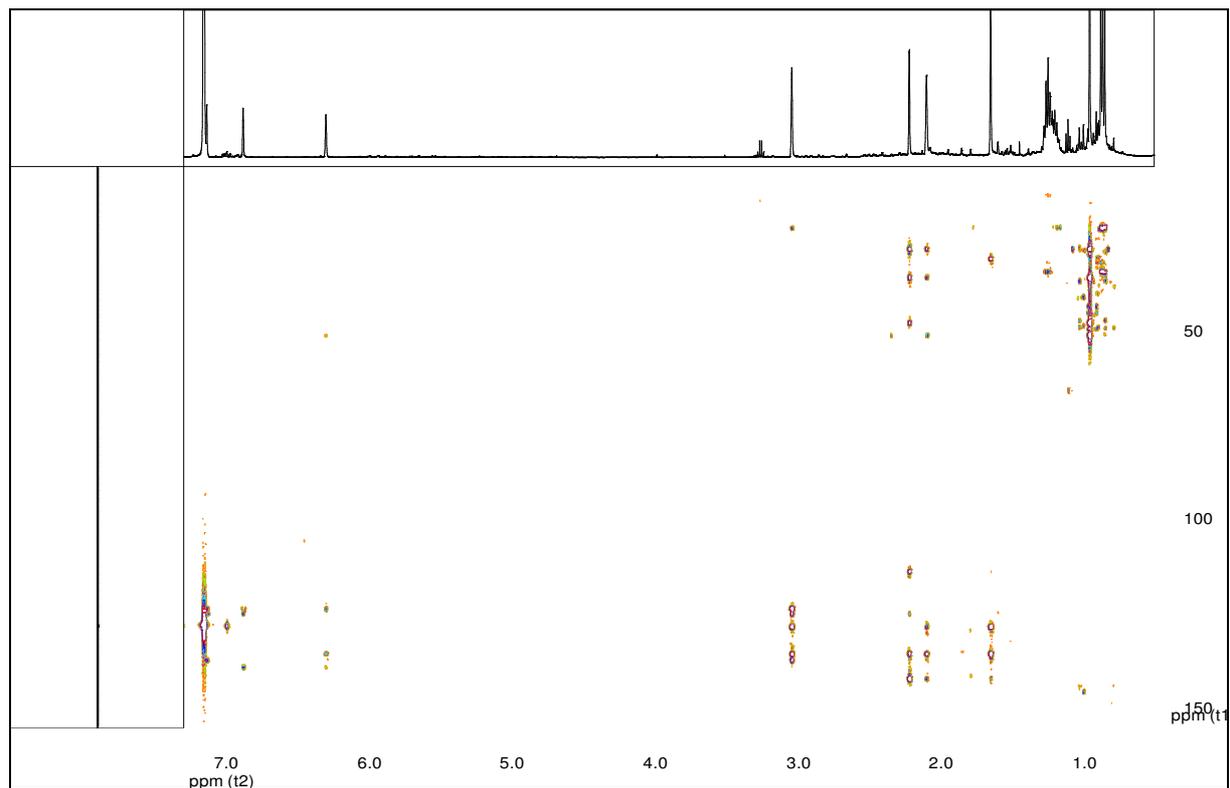


Abb. 81: *HMBC* (500,13 MHz,  $C_6D_6$ ) von 9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-1,3,6,9-tetraen (H-34).

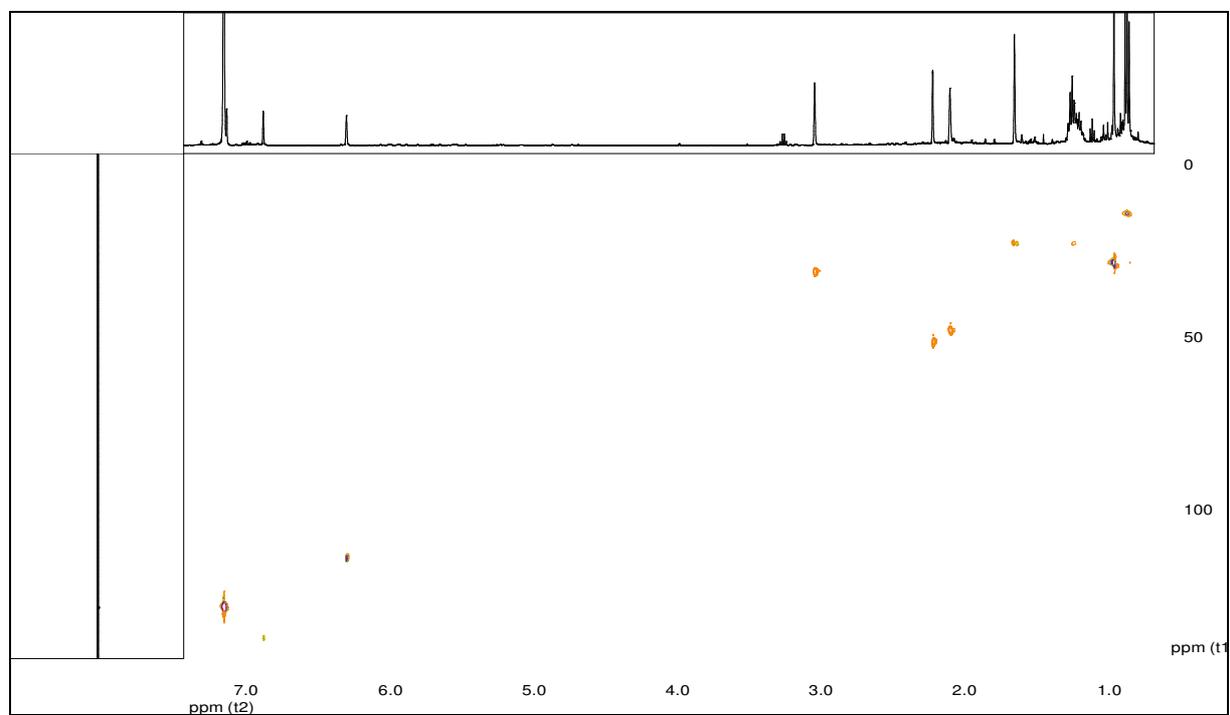


Abb. 82: *HMQC* (500,13 MHz,  $C_6D_6$ ) von 9,12,12-Trimethyl-5-oxatricyclo[8.3.0.0<sup>3,7</sup>]trideca-1,3,6,9-tetraen (H-34).

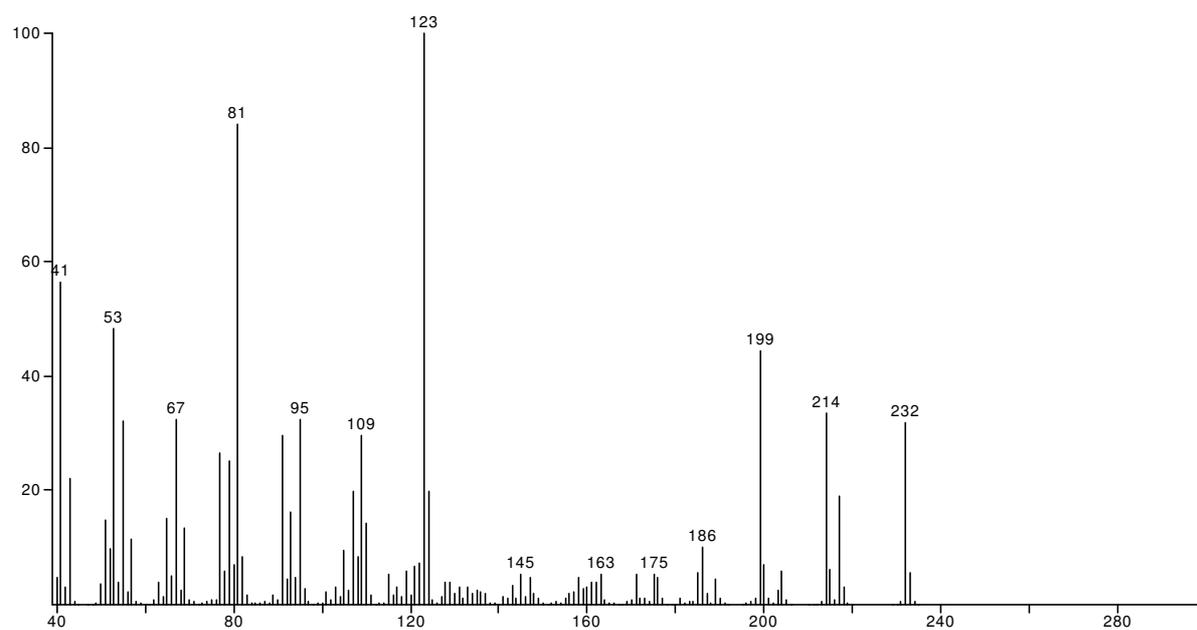


Abb. 83: EI-Massenspektrum von Lactaral (H-33).

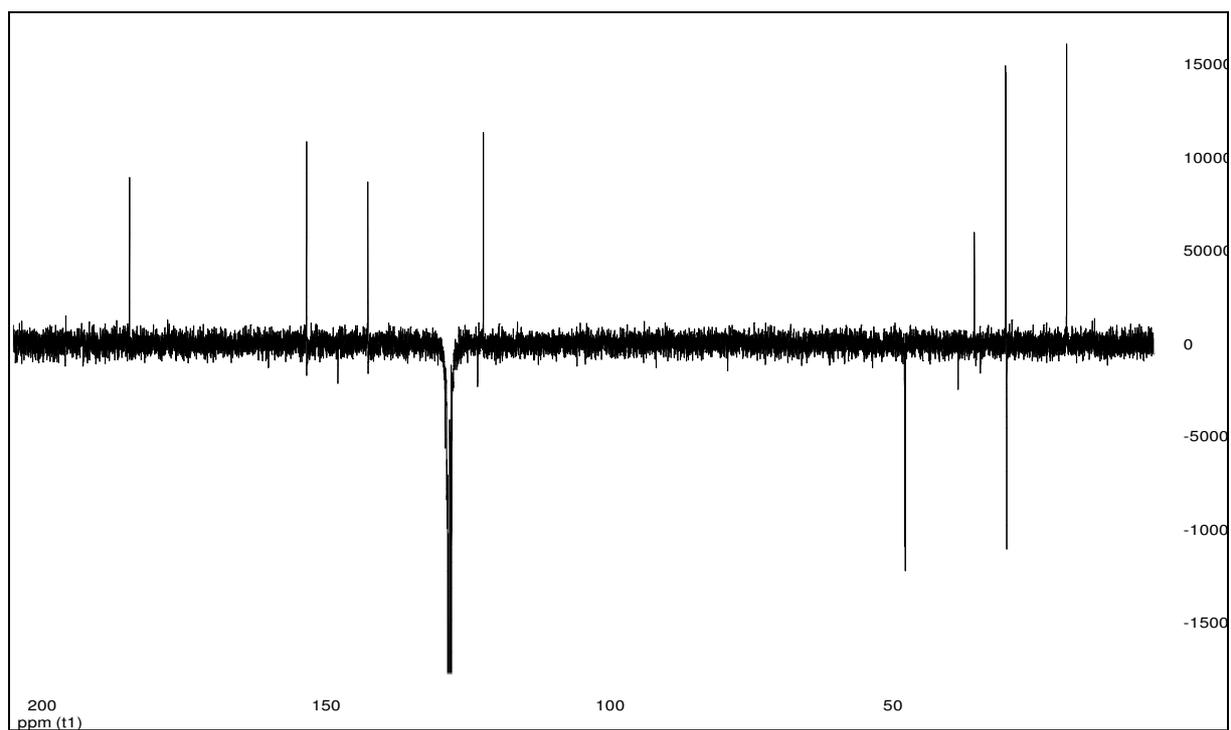


Abb. 84:  $^{13}\text{C}$ -NMR (100,13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) von Lactaral (H-33).

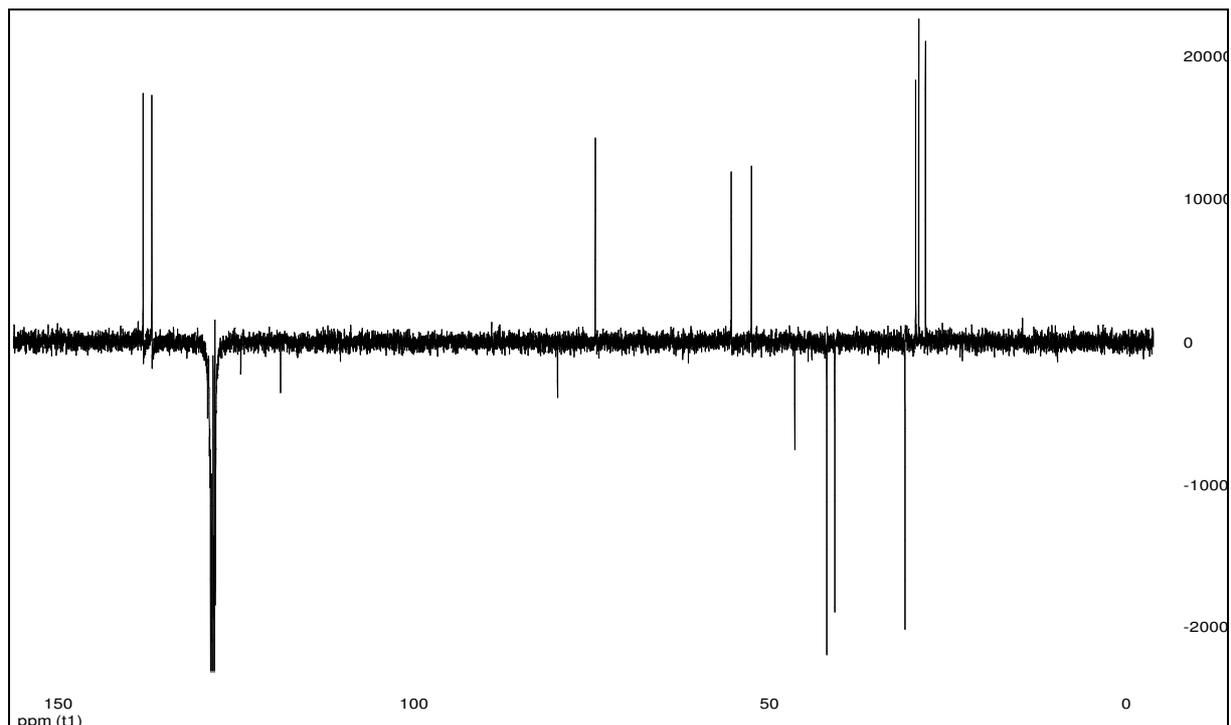


Abb. 85:  $^{13}\text{C}$ -NMR (400,13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) von Furanether A (H-32).

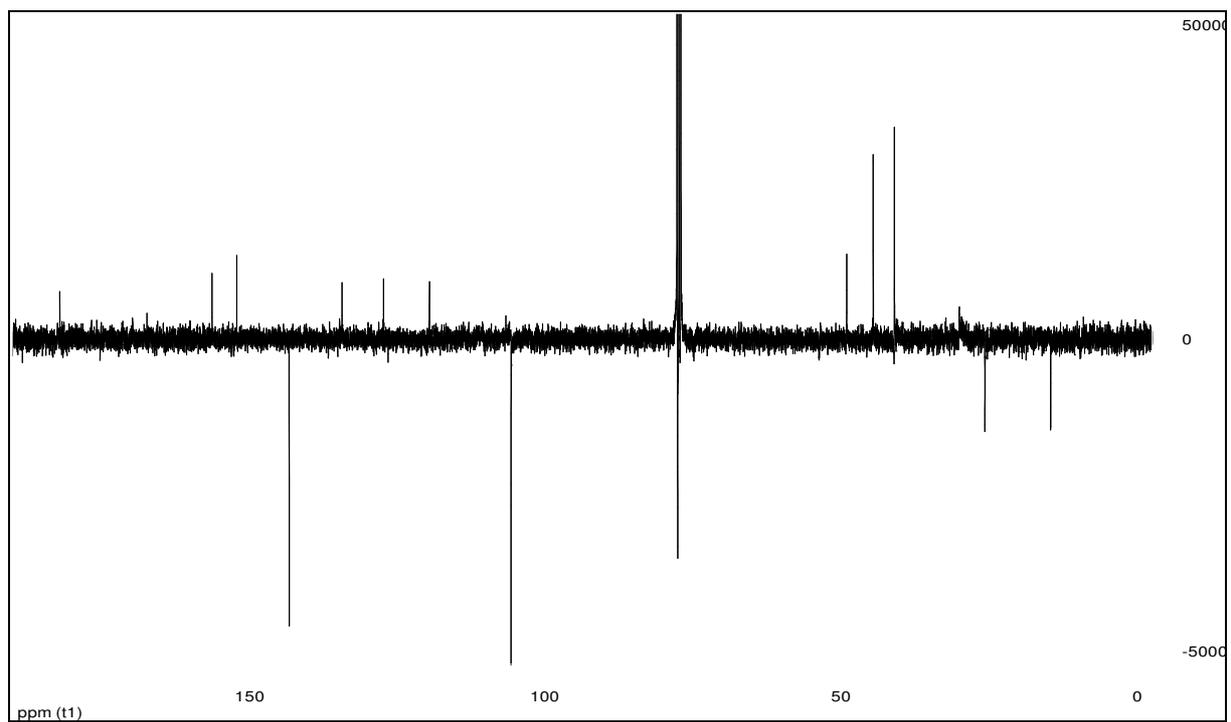
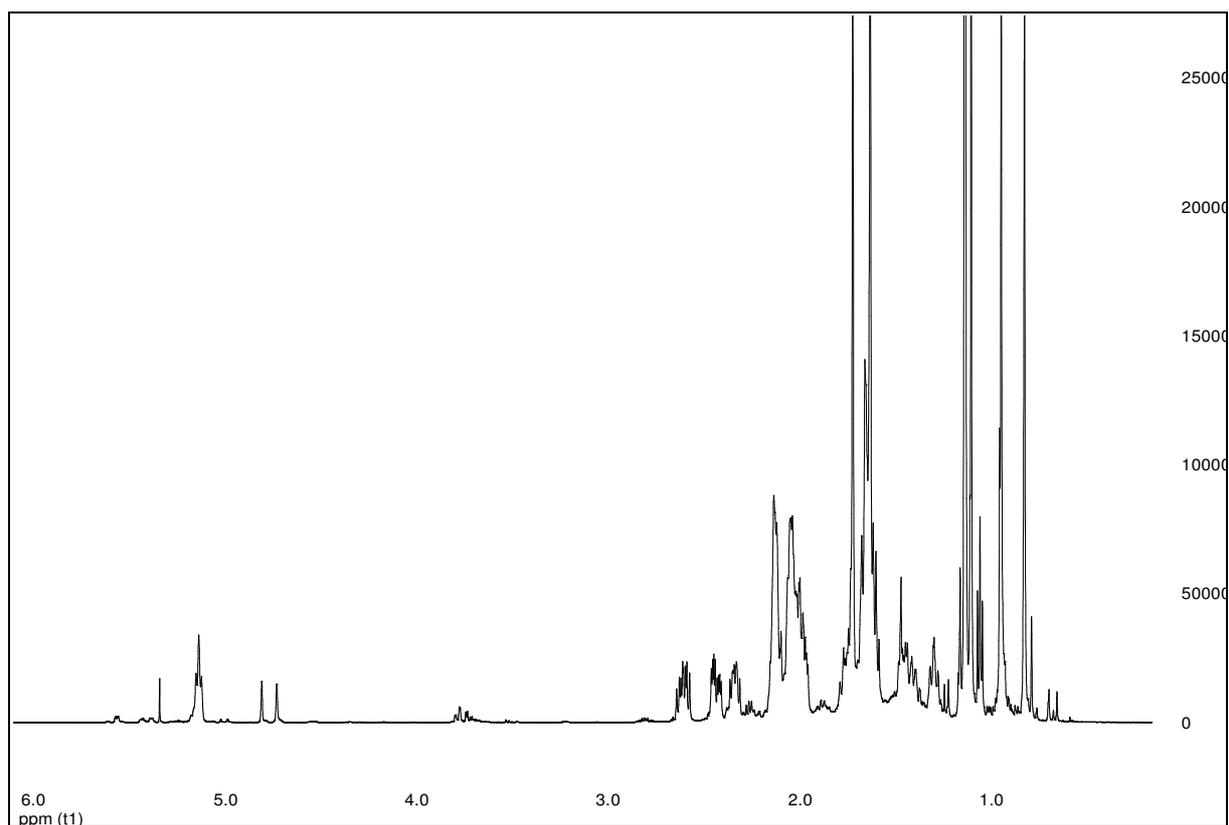
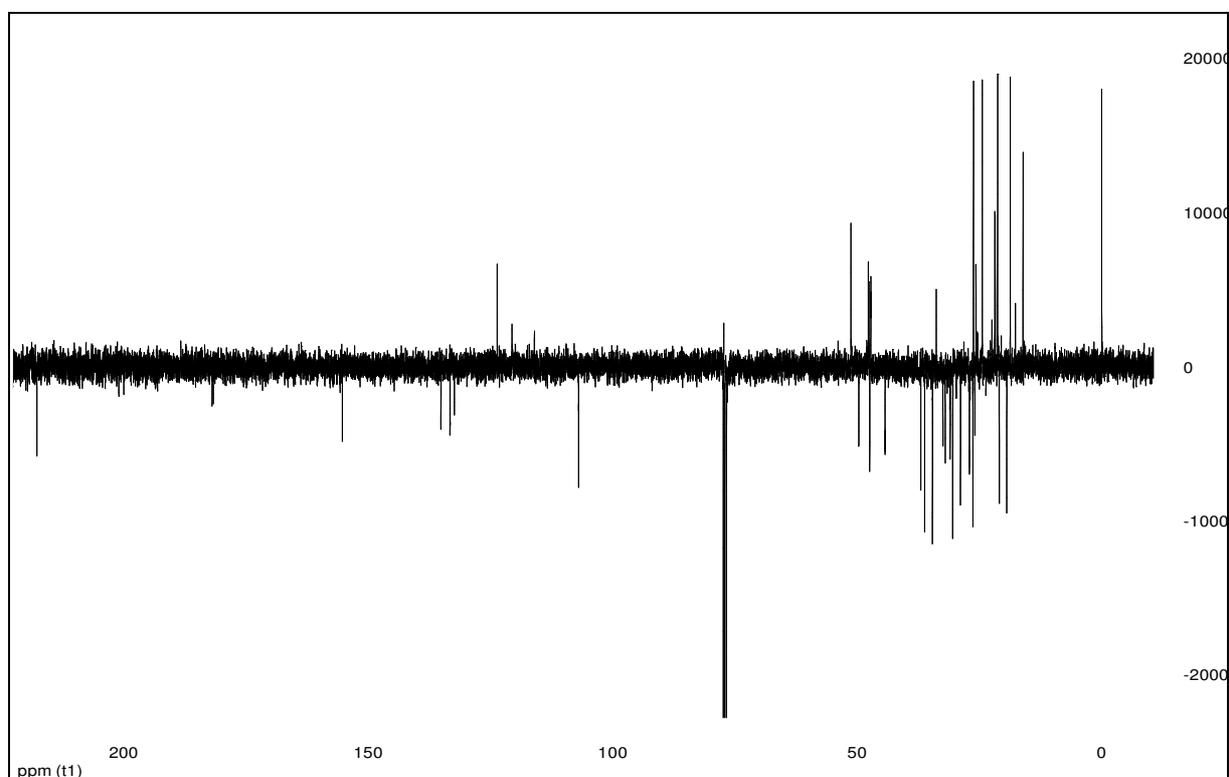


Abb. 86:  $^{13}\text{C}$ -NMR (100,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von Fomajorin S (H-96).



**Abb. 87:**  $^1\text{H-NMR}$  (500,13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) von 24-Methylen-3-oxo-lanosta-8-en-21-carbonsäure (Fomifinsäure A) (F-2).



**Abb. 88:**  $^{13}\text{C-NMR}$  (100,13 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) von 24-Methylen-3-oxo-lanosta-8-en-21-carbonsäure (Fomifinsäure A) (F-2).

## 10 Literaturverzeichnis

- 
- <sup>1</sup> Schwantes, H. O.  
*Biologie der Pilze - Eine Einführung in die angewandte Mykologie*  
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (1996)
- <sup>2</sup> Weber, H.  
*Allgemeine Mykologie*  
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart (1993)
- <sup>3</sup> Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday G.W.  
*The Fungi*  
2. Ed., Academic Press, San Diego (2001)
- <sup>4</sup> Agerer, R.  
*Mykologie – warum ? - Ein Plädoyer*  
Deutsche Gesellschaft für Mykologie, München (2006)  
[www.dgfm-ev.de](http://www.dgfm-ev.de)
- <sup>5</sup> Frohme, D., Jensen, U.  
*Systematik des Pflanzenreichs*  
5. Auflage, Wissenschaftliche Verlags GmbH, Stuttgart (1998)
- <sup>6</sup> Schultze, W.  
*Vorlesung Systematik niederer Pflanzen – Nutz- und Schadpilze*
- <sup>7</sup> Hänsel, R., Sticher, O.  
*Pharmakognosie – Phytopharmazie*  
8. Auflage, Springer Medizinverlag, Heidelberg (2007)
- <sup>8</sup> Molitoris, H.P.  
*Feddes Repertorium* 113 (1-2) (2002) 165-182  
Pilze in Medizin, Folklore und Religion
- <sup>9</sup> Singh, H.  
*Mycoremediation, Fungal Bioremediation*  
Wiley Interscience, Hoboken, NJ (2006)
- <sup>10</sup> Webb, M. D., Ewbank, G., Perkins, J., McCarthy  
*Soil Biol. Biochem.* 33 (2001) 1903-1916  
Metabolismus of Pentachlorophenol by *Saccharomonospora viridis* Strains Isolated from Mushroom Compost
- <sup>11</sup> Sitte, P., Weiler, E. W., Kadereit, J. W., Bresinsky, A., Körner, C.  
*Strasburger - Lehrbuch der Botanik*  
35. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin (2002), 640

- 
- <sup>12</sup> Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., Stalpers, J. A.  
*Dictionary of the Fungi*  
9<sup>th</sup>. Edition, CAB International, Wallingford (2001) 234
- <sup>13</sup> Stalpers, J. A.  
*The Aphyllophoraceous Fungi II, Keys to the Species of the Hericiales*  
Studies in Mycology, No. 40, 31. Oct. 1996,  
Inst. of the Royal Netherlands, Academy of Arts and Sciences, 82 - 84
- <sup>14</sup> Breitenbach, J., Kränzlin, F.  
*Pilze der Schweiz, Beitrag zur Kenntnis der Pilzflora der Schweiz*  
*Band 2, Heterobasidiomycetes, Aphyllophorales, Gastromycetes*  
Mycologische Gesellschaft Luzern  
1. Auflage, Verlag Mykologia, Luzern (1986)
- <sup>15</sup> Hrsg. Krieglsteiner, G. J.  
*Die Großpilze Baden-Württembergs*  
*Band 1: Allgemeiner Teil Ständerpilze: Gallert-, Stachel- und Porenpilze*  
Verlag Eugen Ulmer GmbH + Co., Stuttgart (Hohenheim) (2000)
- <sup>16</sup> Koch, J., Witt, S., Lindequist, U.  
*Int. J. Med. Mushrooms* 4 (2002) 229-235  
The influence of Selected Basidiomycetes on the Binding of Lipopolysaccharide to its Receptor
- <sup>17</sup> Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., Jülich, W.D.  
*eCAM* 2 (3) (2005) 285-299  
The Pharmacological Potential of Mushrooms
- <sup>18</sup> Sonnenbichler, J., Lamm, V., Gieren, A., Holdenrieder, O., Lotter, H.  
*Phytochemistry* 22 (6) (1983) 1489-1491  
A Cyclopentabenzopyranone Produced by the Fungus *Heterobasidion annosum* in Dual Cultures
- <sup>19</sup> Sonnenbichler, J., Bliestle, I.M., Peipp, H., Holdenrieder, O.  
*Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370 (1989) 1295-1303  
Secondary Fungal Metabolites and Their Biological Activities, I. Isolation of Antibiotic Compounds from Cultures of *Heterobasidion annosum* Synthesized in the Presence of Antagonistic Fungi or Host Plant Cells
- <sup>20</sup> Sonnenbichler, J., Peipp, H., Dietrich, J.  
*Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374 (1993) 467-473  
Further Metabolites from Dual Cultures of the Antagonistic Basidiomycetes *Heterobasidion annosum* and *Gloeophyllum abietinum*
- <sup>21</sup> Keppler, J.A., Wall, M.E., Mason, J.E., Basset, C., McPhail, A.T., Sim, G.-A.  
*J.Amer. Chem. Soc.* 89 (1967) 1260-1261  
The Structure of Fomannosin - a Novel Sesquiterpene Metabolite of the Fungus *Fomes annosus*

- 
- <sup>22</sup> Hirotani, M., O'Reilly, J., Donnelly, D.M.X.  
*Tetrahedron Letters* 7 (1977) 651-652  
Fomannoxin – A toxic Metabolite of *Fomes annosus*
- <sup>23</sup> Donnelly, D.M.X., O'Reilly, J., Polonsky, J., van Eijk, G.W.  
*Tetrahedron Letters* 23 (51) (1982) 5451-5452  
Fomajorin S and D from *Fomes annosus*
- <sup>24</sup> Larsen, M. J., Cobb-Pouille, L. A.  
*Synopsis Fung.* 3 (1992) 1-206  
Phellinus (Hymenochaetales). A survey of the world taxa
- <sup>25</sup> Ryvarde, L., Gilbertson, R. L.  
*European Polypores Part 2*  
Fungiflora, Oslo (1994)
- <sup>26</sup> Pereverzev, V.A., Perevezeva, E.V., Shadurskaya, S.K., Kotov, Y.A.  
*Agents Actions* 38, Special Conference Issue (1993)  
The Role of APUD-System Cells and Their Mediators in the Biological Effects of Adaptogenes
- <sup>27</sup> Brekhman, B.I.I., Dardymov, I.V.  
*Annu. Rev. Pharmacol.* 9 (1969) 419-430  
New Substances of Plant Origin Which Increase Nonspecific Resistance
- <sup>28</sup> Walker, M.  
*Townsend Lett. Doctors* (1994) 751-755  
Adaptogens: Nature's Answer to Stress
- <sup>29</sup> Shcherba, V. V., Babitskaya, V. G., Kurchenko, V. P., Ikonnikova, N. V., Kukulyanskaya, T. A.  
*Appl. Biochem. And Microbiology* 36 (5) (2000) 564-568  
Antioxidant Properties of Fungal Melanin Pigments
- <sup>30</sup> Babitskaya, V.G., Shscherba, V.V.  
*Applied Biochemistry and Microbiology* 38 (3) (2002) 286-291  
The Nature of Melanin Pigments of Several Micro- and Macromycetes
- <sup>31</sup> Müller, H.W., Trösch, W.  
*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24 (1986) 180-185  
Screening of White-Rot Fungi for Pretreatment of Wheat Straw for Biogas Production
- <sup>32</sup> Scheibner, K., Hofrichter, M., Herre, A., Michels, J., Fritsche, W.  
*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 (1997) 452-457  
Screening for Fungi Intensively Mineralizing 2,4,6-Trinitrotoluene
- <sup>33</sup> Ryvarde, L., Gilbertson, R. L.  
*European Polypores Part 1*  
Fungiflora, Oslo (1993) 307 - 309

- 
- <sup>34</sup> Hansen, L., Knudsen, H.  
*Nordic Macromycetes Vol. 3, Heterobasidioid, Aphyllorphoid and Gastromycetoid Basidiomycetes*  
Nordsvamp, Copenhagen (1997)
- <sup>35</sup> Schmid, H., Helfer, W.  
*Pilze -, Wissenswertes aus Ökologie, Geschichte und Mythos*  
IHW-Verlag, Eching bei München (1995)
- <sup>36</sup> Huhn, E.S., Turner, N.J., French, D.H.  
*Plateau 1998 – cfr.washington.edu*  
Ethnobiology and Subsistance
- <sup>37</sup> Hobbs, C.  
*Medicinal Mushrooms - An Exploration of Tradition, Healing and Culture*  
2. Ed., Botanica Press, Santa Cruz (1995)
- <sup>38</sup> Hrsg. Blaschek  
*Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe* (Hager ROM 2002)  
Springer, electronic media, 2002
- <sup>39</sup> Keller, A., Maillard, M.P., Hostettmann, K.  
*Phytochemistry* 41 (4) (1996) 1041-1046  
Antimicrobial Steroids from the Fungus *Fomitopsis pinicola*
- <sup>40</sup> Zrimec, M.B., Zrimec, A., Slanc, P., Kac, J., Kreft, S.  
*J. Basic Microbiol.* 44 (5) (2004) 407-412  
Screening for Antibacterial Activity in 72 Species of Wood-Colonizing Fungi by *Vibrio fischeri* Bioluminescence Method
- <sup>41</sup> Guider, J.M., Halsall, T.G., Jones, E.R.H  
*J. Chem. Soc.*, (1954) 4471-4475  
The Chemistry of the Triterpenes and Related Compounds - Part XXVII. Pinicolic Acid A
- <sup>42</sup> Rösecke, J., König, W.A.  
*Phytochemistry* 52 (1999) 1621-1627  
Steroids from the Fungus *Fomitopsis pinicola*
- <sup>43</sup> Rösecke, J., König, W.A.  
*Phytochemistry* 54 (2000) 603-610  
Constituents of Various Wood-Rotting Basidiomycetes
- <sup>44</sup> Beereboom, J.J., Fazakerley, H., Halsall, T.G.  
*J. Chem. Soc.*, (1957) 3437-3441  
The Chemistry of the Triterpenes and Related Compounds - Part XXXI. The Isolation of Further Triterpene Acids from *Polyporus pinicola* Fr.

- 
- <sup>45</sup> Bowers, A., Halsall, T.G., Sayer, G.C.  
*J. Chem. Soc.*, (1954) 3070-3084  
The Chemistry of the Triterpenes and Related Compounds - Part XXV. Some Stereochemical Problems Concerning Polyporenic Acid A
- <sup>46</sup> Seth, K., Catalfomo, P., Sciuchetti, L.A.  
*J. Pharm. Sci.*, 56 (12) (1967) 1656-1658  
Isolation of Eburicoic Acid from *Fomes pinicola*
- <sup>47</sup> Halsall, T.G., Sayer, G.C.  
*J. Chem. Soc.*, (1959) 2031-2036  
The Chemistry of the Triterpenes and Related Compounds - Part XXXV. Some Non-acidic Constituents of *Polyporus pinicola*, Fr.
- <sup>48</sup> Yoshikawa, K., Inoue, M., Matsumoto, Y., Sakakibara, C., Miyataka, H., Matsumoto, H., Arihara, S.  
*Journ. Nat. Prod.* 68 (2005) 69-73  
Lanostane Triterpenoids and Triterpene Glycosides from the Fruit Body of *Fomitopsis pinicola* and Their Inhibitory Activity against COX-1 and COX-2
- <sup>49</sup> Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A.  
*Taschenbuch der Pharmakologie*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1996)
- <sup>50</sup> Striegler, S., Haslinger, E.  
*Monatshett für Chemie* 127 (1996) 755-761  
Cerebrosides from *Fomitopsis pinicola* (Sw. Ex Fr.) Kast.
- <sup>51</sup> Rösecke, J., Pietsch, M., König, W.A.  
*Phytochemistry* 54 (2000) 747-750  
Volatile Constituents of Wood-Rotting Basidiomycetes
- <sup>52</sup> Shin, Y., Tamai, Y., Terazawa, M.  
*J. Wood Sci.* 47 (2001) 313-316  
Chemical Constituents of *Inonotus obliquus* II - a New Triterpene, 21,24-Cyclolanosta-3 $\beta$ -,21,25-triol-8-ene from *Sclerotium*
- <sup>53</sup> KR 2006025652 A (Pat.)
- <sup>54</sup> KR 2006023227 A (Pat.)
- <sup>55</sup> KR 2006021011 A (Pat.)
- <sup>56</sup> KR 2006009529 A (Pat.)
- <sup>57</sup> Shashkina, M.Y., Shashkin, P.N., Sergeev, A.V.  
*Pharmaceutical Chemistry Journal* 40 (10) (2006) 560-568  
Medicinal Plants - Chemical and Medicobiological Properties of Chaga (Review)

- <sup>58</sup> Gavrilov, A.S., Shchegolev, A.A., Guseľnikova, E.V., Larionov, L.P., Bredneva, N.D.  
*Pharmaceutical Chemistry Journal* 37 (2) (2003) 95-98  
Adaptogen Action of Preparations from *Inonotus obliquus*
- <sup>59</sup> Golovko, V.A.  
*Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 9 (1999) 888-889  
Effects of Bioglycans Isolated from Birch Fungi *Inonotus obliquus* on Elektric Activity of Venous Sinus Cells in Frog Heart
- <sup>60</sup> Cui, Y., Kim, D. S., Park, K. C.  
*Journ. of Ethnopharmacology* 96 (1-2) (2005) 79 – 85  
Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*
- <sup>61</sup> Lee, I. K., Kim, Y. S., Jang, Y. W., Jung, J. Y., Yun, B. S.  
*Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 17 (2007) 6678 – 81  
New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*
- <sup>62</sup> Dischendorfer, O.  
*Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* 44 (3-4)(1923)123-139  
Untersuchungen auf dem Gebiete der Phytochemie - I. Mitteilung über das Betulin
- <sup>63</sup> Hänsel, R., Sticher, O.  
*Pharmakognosie – Phytopharmazie*  
7. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg (2004), 481 – 482
- <sup>64</sup> Kahlos, K., Kangas, L., Hiltunen, R.  
*Acta Pharmaceutica Fennica* 95 (1986) 173-177  
Antitumour Tests of Inotodiol from the Fungus *Inonotus obliquus*
- <sup>65</sup> Kahlos, K., Hiltunen, R.  
*Acta Pharmaceutica Fennica* 97 (1988) 45-49  
Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Identification of Some Lanostanes from *Inonotus obliquus*
- <sup>66</sup> Kahlos, K., Hiltunen, R., Schanz, M.  
*Planta Medica* (1984) 197-198  
3 $\beta$ -Hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al - a New Triterpene from *Inonotus obliquus*
- <sup>67</sup> Kahlos, K., Hiltunen, R.  
*Acta Pharmaceutica Fennica* 96 (1987) 85-89  
Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Study of Some Sterols and Lupanes from *Inonotus obliquus*
- <sup>68</sup> Kahlos, K., Kangas, L., Hiltunen, R.  
*Acta Pharmaceutica Fennica* 96 (1987) 33-40  
Antitumour Activity of Some Compounds and Fractions from an n-Hexane Extract of *Inonotus Obliquus*
- <sup>69</sup> Kahlos, K., Hiltunen, R.  
*Acta Pharmaceutica Fennica* 95 (2) (1986) 71-76  
Two New Oxygenated Lanostane Type Triterpenes from *Inonotus obliquus*

- 
- <sup>70</sup> Kahlos, K.  
*Acta Pharmaceutica Fennica* 95 (1986) 113-117  
3 $\beta$ ,22-Dihydroxy-lanosta-8,24-dien-7-one - a New 7-Keto Compound from  
*Inonotus obliquus*
- <sup>71</sup> Yusoo, S., Yutaka, T., Minoru, T.  
*Int. J. Med. Mushrooms* 4 (2002) 77-84  
Triterpenoids, Steroids, and a New Sesquiterpen from *Inonotus obliquus* (Pers.:  
Fr.) Pilát
- <sup>72</sup> Teuscher, E.  
*Biogene Arzneimittel*  
5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1997)
- <sup>73</sup> Wallach, O.  
*Justus Liebig's Annalen der Chemie* 225 (1884) 314-319  
Über die Bestandteile einiger ätherischer Öle
- <sup>74</sup> Ruzicka, L.  
*Experientia* 9 (10) (1953) 357-367  
The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds
- <sup>75</sup> Thiele, O.W.  
*Lipide, Isoprenoide mit Steroiden*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1979)
- <sup>76</sup> Nuhn, P.  
*Naturstoffchemie – Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*  
3. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, Leipzig (1997)
- <sup>77</sup> Rösecke, J.  
*Isolierung und Identifizierung von leichtflüchtigen und nichtflüchtigen  
Komponenten aus Basidiomyceten*  
Diplomarbeit, Hamburg (1998)
- <sup>78</sup> De Jong, E., Field, J.A., Spinnler, H.E., Wijnberg, J.B.P.A., De Bont, J.A.M.  
*Appl. and Envir. Microbiology* 60 (1) (1994) 264-270  
Significant Biogenesis of Chlorinated Aromatics by Fungi in Natural Environments
- <sup>79</sup> Shao, C., She, Z., Guo, Z., Peng, H., Cai, X., Zhou, S., Gu, Y.  
*Magn. Reson. Chem.* 45 (2007) 434-438  
Spectral Assignments and Reference Data: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments for two  
anthraquinones and two xanthenes from the mangrove fungus (ZSUH-36)
- <sup>80</sup> Hrsg. Steglich, W., Fugmann, B., Lang-Fugmann, S.  
*Römpp Lexikon Naturstoffe*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997)

- 
- <sup>81</sup> Lendle, L.  
*Archives of Toxic.* 12 (1) (1943) 101-104  
Vergiftungen durch russischen Fliegenpilz, Perlpilz oder Pantherpilz?
- <sup>82</sup> Teunissen, P.J.M., Swarts, H.J., Field, J.A.  
*Appl. Microb. Biotech.* 47 (1997) 695-700  
The de novo Production of Drosophilin A (tetrachloro-4-methoxyphenol) and Drosophilin A Methylether (tetrachloro-1,4-dimethoxybenzene) by Ligninolytic Basidiomycetes
- <sup>83</sup> Bunyapaiboonsri, T., Yoiprommarat, S., Intereya, K., Kocharin, K.  
*Chem. Pharm. Bull.* 55 (2) (2007) 304-307  
New Diphenyl Ethers from the Insect Pathogenic Fungus *Cordyceps* sp. BCC 1861
- <sup>84</sup> Shimada, M., Nakatsubo, F., Kirk, T.K., Higuchi, T.  
*Arch. Microbiol* 129 (1981) 321-324  
Biosynthesis of the Secondary Metabolite Veratryl Alcohol in Relation to Lignin Degradation in *Phanerochaete chrysosporium*
- <sup>85</sup> Paszczyński, A., Crawford, R.L.  
*Biochem. and Biophys. Res. Com.* 178 (3) (1991) 1056-1063  
Degradation of Azo Compounds by Ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of Veratryl Alcohol
- <sup>86</sup> Zhiqiang An  
*Handbook of Industrial Mycology, Mycology, Vol.22*  
Marcel Dekker, New York (2005)
- <sup>87</sup> Stahl, E., Willing, E.  
*Mikrochimica Acta* 2 (1980) 465 – 474  
Extraktion von Naturstoffen mit überkritischen und verflüssigten Gasen
- <sup>88</sup> [www.gerstel.com/produkt\\_sbse.htm](http://www.gerstel.com/produkt_sbse.htm)
- <sup>89</sup> Hopp, V.  
*Grundlagen der chemischen Technologie -: Für Studium und Berufsbildung*  
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1993)
- <sup>90</sup> Gmehlin, J., Brehm, A.  
*Grundoperationen*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1996)
- <sup>91</sup> Koedam, A.  
*Ätherische Öle - Analytik, Physiologie, Zusammensetzung.*  
Kubeczka, K. H. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1982), 188-197  
Über den Einfluß der Hydrodestillation auf die Zusammensetzung einiger Koniferenöle

- 
- <sup>92</sup> 5.0/2.08.12.00  
*Europäisches Arzneibuch 5.Ausgabe Grundwerk(Stand: 2005), Band 1*  
Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart (2005)
- <sup>93</sup> Otto, M.  
*Analytische Chemie*  
Verlag Chemie, Weinheim, New York (1995)
- <sup>94</sup> Breitmaier, E.  
*Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen – Ein kurzes  
Praktikum der NMR-Spektroskopie*  
2. Auflage, B.G. Teubner, Stuttgart (1992)
- <sup>95</sup> Friebolin, H.  
*Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie – Eine Einführung*  
3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim (1999)
- <sup>96</sup> NIST / EPA / NIH  
*mass spectral database*, 1998
- <sup>97</sup> Orcutt, D. M., Richardson, B.  
*Steroids* 16 (4) (1970) 429-446  
Sterols of *Oocystis polymorpha*, a green alga
- <sup>98</sup> Musgrave, O. C., Munro, H. D.,  
*Journ.of Chem Soc. Sect. C* (4) (1971)  
Extractives from sporophores of *Fomes* species
- <sup>99</sup> Smania Junior, A., Delle Monache, F., Smania, E. F. A., Cuneo, R. S.  
*Int. Journ. of Med. Mushrooms* 1 (4) (1999) 325-330  
Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma  
applanatum* fruit body
- <sup>100</sup> Pretsch, E., Clerc, T., Seibel, J., Simon, W.  
*Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen  
Methoden, 13C-NMR, 1H-NMR, IR, MS, UV-VIS*  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1976)
- <sup>101</sup> Schröder, E.  
*Massenspektrometrie, Begriffe und Definitionen*  
Springer-Verlag, Berlin (1991)
- <sup>102</sup> Gunatilaka, A.A.L., Gopichand, Y., Schmitz, F.J., Djerassi, C.  
*J. Org. Chem.* 46 (1981) 3860-3866  
Minor and Trace Sterols in Marine Invertebrates - 26. Isolation and Struktur  
Elucidation of Nine New 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxy Sterols from Four Marine Organisms
- <sup>103</sup> Campos Ziegenbein, F.  
*Isolierung und Identifizierung von Naturstoffen aus Baumpilzen (Basidiomycetes)*  
Dissertation, Univ. Hamburg, FB Chemie (2006)

- 
- <sup>104</sup> Kobori, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M., Takei, T., Shinmoto, H.  
*Biol. Pharm. Bull.* 29 (4) (2006) 755-759  
5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epoxy-22E-ergosta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol from an Edible Mushroom  
Suppresses Growth of HL60 Leukemia and HT29 Colon Adenocarcinoma Cells
- <sup>105</sup> Ponce, M.A., Ramirez, J.A., Galagovsky, L.R., Gros, E.G., Erra-Balsells, R.  
*Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (2002) 749-756  
A New Look into the Reaction between Ergosterol and Singlet Oxygen in vitro
- <sup>106</sup> Lobo, A.M., De Abreu, P.M., Prabhakar, S., Godinho, L.S., Jones, R., Rzepa, H.S., Williams, D.J.  
*Phytochemistry* 27 (11) (1988) 3569-3574  
Triterpenoids of the Fungus *Pisolithus tinctorius*
- <sup>107</sup> Cateni, F., Doljak, B., Zacchigna, M., Anderluh, M., Piltaver, A., Scialino, G., Banfi, E.  
*Bioorg. & Med. Chem. Lett.* (17) (2007) 6330-6334  
New biologically active epidioxysterols from *Sterum hirsutum*
- <sup>108</sup> Tanahashi, Y., Takahashi, T.  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.* 39 (1966) 848-849  
Sterol Constituents of *Daedalea quercina* L. (Fr.)
- <sup>109</sup> Abraham, R. J., Loftus  
*Proton and Carbon-13 NMR Spectroscopy, an integrated Approach*  
Heyden & Son Ltd, London (1978)
- <sup>110</sup> Cardillo, G., Cricchio, R., Merlini, L.  
*Tetrahedron* (27) (1971) 1875-1833  
Reaction of *ortho* Alkenyl- and Alkylphenols with 2,3-Dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ), Syntheses of 2,2-Dialkylchromenes
- <sup>111</sup> Ayer, W.A., Trifonov, Latchezar S.  
*J. of Natural Products* 57 (6) (1994) 839-841  
Aromatic Compounds from Liquid Cultures of *Lactarius deliciosus*
- <sup>112</sup> Tabacchi, R., Fryer, A., Pollart, C., Dubin, G.M.  
*Phytopathologia Mediterranea* (39) (2000) 156-161  
Phytotoxins from Fungi of Esca of Grapevine
- <sup>113</sup> Bringmann, G., Künkel, G., Geuder, T.  
*Synlett* 5 (1990) 253-255  
Enantiomerically Pure N-Boc Protected  $\beta$ -Keto- $\gamma$ -Amino Acid Esters from Keto Precursors - A Novel, Stereocontrolled Approach to Statine Derivatives with Any Desired Configuration
- <sup>114</sup> Walter, W.  
*Beyer, Walther, Lehrbuch der Organischen Chemie*  
21. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart (1988)

- 
- <sup>115</sup> Bartram, C.A., Battye, D.A., Worthing, C.R.  
*J. of of the Chem. Soc.* (1963) 4691-4693  
Some 2,5-Dialkoxyphenols
- <sup>116</sup> Kashman, Y., Bodner, M., Finer-Moore, J.S., Clardy, J.  
*Experientia* 36 (8) (1980) 891-1016 i.e. 891-892  
 $\Delta^9(15)$ -Africanene - A New Sesquiterpene Hydrocarbon from the Soft Coral  
*Sinularia erecta*
- <sup>117</sup> Joulain, D., König, W.A.  
*The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*  
EB-Verlag, Hamburg (1998)
- <sup>118</sup> Kinney, W. A., Coghlan, M. J., Paquette, L. A.  
*J. Am. Chem. Soc.* (107) (1985) 7352-7360  
General Approach to annulated 4-Cyclooctenones by aliphatic Claisen  
Rearrangement. Strerespecific total synthesis of (+/-)-Precapnelladien
- <sup>119</sup> Birch, A.M., Pattenden, G.  
*J. Chem. Soc. Trans.1* (8) (1983) 1913-1917  
Capnellane Sesquiterpenes - Total Synthesis of Epiprecapnelladiene and  
Capnellene
- <sup>120</sup> Ayanoglu, E., Gebreyesus, T., Beechan, C.M., Djerassi, C.  
*Tetrahedron* 35 (9) (1979) 1035-1039  
Terpenoids-LXXVI, Precapnelladien, a Possible Biosynthetic Precursor of the  
Capnellane Skeleton
- <sup>121</sup> Kalinowski, H. O., Berger, S., Braun, S.  
*<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1984)
- <sup>122</sup> Froborg, J., Magnusson, G., Thorén, S.  
*J. of Org. Chem* 40 (11) (1975) 1595-1601  
Fungal Extractives - IX. Synthesis of the Valleral Skeleton and a Total Synthesis  
of Pyrovellerolactone
- <sup>123</sup> Sterner, O., Bergman, R., Kihlberg, J., Oluwadiya, J., Wickberg, B.  
*J. Org. Chem.* 50 (1985) 950-953  
Basidiomycetes Sesquiterpenes - The Silica Gel Induced Degradation of Velutinal  
Derivatives
- <sup>124</sup> Magnusson, G., Thorén, S.  
*Tetrahedron* 30 (1974) 1431-1435  
Fungal Extractives VI, Structure of Lactaral - A new Sesquiterpene Furan-3-  
aldehyde from *Lactarius*, by Spectroscopic Methods
- <sup>125</sup> Battaglia, R., De Bernadi, M., Fronza, G., Mellerio, G., Vidari, G., Vita-Finsi, P.  
*J. Nat. Prod.* 43 (3) (1980) 319 – 328  
Fungal metabolites VIII: Structures of new sesquiterpenes from *Lactarius*  
*scrobiculatus*

- 
- <sup>126</sup> De Bernardi, M., Fronza, G., Mellerio, G., Vidari, G., Vita-Finzi, P.  
*Symp. Chem. Nat. Prod.* 11th (2) (1978) 90 – 92  
Isolation and structure of some new sesquiterpenes from *Lactarius scrobiculatus* Scop. and *Lactarius blennius* Fries (Basidiomycetes)
- <sup>127</sup> Andina, D., De Bernardi, M., Del Vecchio, A., Fronza, G., Mellerio, G., Vidari, G., Vita-Finzi, P.  
*Phytochemistry* 19 (1980) 93-97  
Sesquiterpenes from *Russula sardonia*
- <sup>128</sup> Molander, G. A., Carey, J. S.  
*J. Org. Chem.* 60 (1995) 4845-4849  
Total Synthesis of Furanether B. An Application of [3+4] Annulation Strategy
- <sup>129</sup> Sterner, O., Bergman, R., Kesler, E., Nilsson, L., Oluwadiya, J., Wickberg, B.  
*Tetrahedron Lett.* 24 (13) (1983) 1415-1418  
Velutinal Esters of *Lactarius vellereus* and *L. necator*. The preparation of free Velutinal
- <sup>130</sup> Sterner, O.  
*The Russulaceae Sesquiterpenes*  
Dissertation, Univ. Lund (1985)
- <sup>131</sup> [www.riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre list.cgi](http://www.riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre list.cgi)
- <sup>132</sup> Campos Ziegenbein, F., Hanssen, H.P., König, W.A.  
*Flavour Fragr. J.* 21 (2006) 813 – 816  
Chemical constituents of the essential oils of three wood-rotting fungi
- <sup>133</sup> König, W.A., Krebber, R., Evers, P., Bruhn, G.  
*J. High Resolut. Chromatogr.* 13 (1990) 328-332  
Stereochemical Analysis of Essential Oils and Flavor Compounds by Enantioselective Capillary Gas Chromatography
- <sup>134</sup> Knapp, D.R.  
*Handbook of Analytical Derivatization Reaction*  
Wiley, New York (1979) 171
- <sup>135</sup> Buchbauer, G., Jirovetz, L., Wasichy, M., Nikiforov, A.  
*Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 197 (1993) 429-433  
Zum Aroma von Speisepilzen - Kopfraum-Analyse mittels GC/FID und GC/FTIR/MS
- <sup>136</sup> Wurzenberger, M., Grosch, W.  
*Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 176 (1983) 16-19  
Bestimmung von 1-Octen-3-ol in Pilzen und Pilzprodukten
- <sup>137</sup> Gessner, M., Deger, W., Mosandl, A.  
*Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 186 (1988) 417-421  
Stereoisomere Aromastoffe - XXI. Chirale Aromastoffe einiger Lebensmittel

- 
- <sup>138</sup> Falbe, J. (Hrsg.)  
*Römpp-Lexikon Chemie*  
10. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart (1998)
- <sup>139</sup> Bliestle, I.M.  
*Wissenschaftliche Forschungsbeiträge Biologie, Biochemie, Chemie* 23 (1988)  
Intelmann, München (1988)  
Phytotoxine aus *Fomes annosus* und ihr Einfluß auf die Biochemie der Wirtszelle
- <sup>140</sup> Sonnenbichler, J., Dietrich, J., Schäfer, W., Zetl, I.  
*Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 374 (11) (1993) 1047-55  
Secondary Fungal Metabolites and Their Biological Activities - IV. Synthesis of Structural Similarities to the Toxic Metabolites of the Pathogenic Fungus *Heterobasidion annosum* and Investigation of Their Antibiotic Activities
- <sup>141</sup> Sievers, A.  
*Screening einheimischer Pflanzen und Pilze mittels dünnschichtchromatographischer Bioassays und Hochdurchsatz-Screening auf pharmakologisch wirksame Inhaltsstoffe unter besonderer Berücksichtigung des Wurzelschwammes Heterobasidion annosum (Fr.) Bref.*  
Dissertation, Univ. Hamburg, FB Chemie (2004)
- <sup>142</sup> Xia Wu, J. Y., Liang, Z., YueSheng, D.  
*Chem. Pharm. Bull.* 52 (11) (2004) 1375 – 1377  
New Lanostane-Type Triterpenes from *Fomes officinalis*
- <sup>143</sup> Raina, V. K., Srivasta, S. K., Jain, N., Ahmad, A., Syamasundar, K. V., Aggarwal, K. K.  
*Flavour Fragr. J.* 17 (2002) 99-102  
Essential oil composition of *Curcuma longa* L. cv. Roma from the plains of northern India
- <sup>144</sup> Ferrari, B., Tomi, F., Casanova, J.  
*Flavour Fragr. J.* 20 (2005) 180-185  
Composition and chemical variability of *Ferula communis* essential oil from Corsica
- <sup>145</sup> Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mühlheim (Germany)  
*MassLib Software* (1996 – 2008)  
Distributed by MPS Kofel (Zollikofen, Schweiz)
- <sup>146</sup> Adam, H. K., Campbell, I. M., McCorkindale, N. J.  
*Natur* 216 (1967) 397  
Ergosterol Peroxide: A Fungal Artefact
- <sup>147</sup> König, W. A., Bülow, N., Saritas, Y.  
*Flavour Fragr. J.* 14 (1999) 367 – 378  
Identification of sesquiterpene hydrocarbons by gas phase analytical methods

- 
- <sup>148</sup> Thakeow, P., Angeli, S., Weissbecker, B., Schütz, S.  
*Chemical Series* 33 (4) 379 – 387  
Antennal and behavioral responses of *Cis boleti* to fungal odor of *Trametes gibbosa*
- <sup>149</sup> Ayoub, N., Lass, D., Schultze, W.  
*Int. Journ. Med. Mush.*, im Druck  
Volatile Constituents of the Medicinal Fungus *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilát
- <sup>150</sup> Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M.  
*Drogenanalyse, Dünnschichtchromatographische Analyse von Azneidrogen*  
Springer Verlag, Berlin (1983)
- <sup>151</sup> König, W. A., Julain, D., Hochmuth, D. H.  
*Terpenoids and related constituents of essential oils*  
MassFinder 3.5 (2006), Hochmuth Scientific Software, Hamburg, Germany
- <sup>152</sup> Sprecher, E.  
*Deutsche Apothekerzeitung* 103 (1963) 213  
Rücklaufapparat zur erschöpfenden Wasserdampfdestillation ätherischen Öls aus Voluminösem Destillationsgut
- <sup>153</sup> E. Gerhardt  
*BLV Handbuch - Pilze*  
2. Auflage, BLV Verlagsgesellschaft mbH, München (1996)
- <sup>154</sup> Ryman, S. ; Holmåsen, I.  
*Svampar - En Fälthandbok*  
3. Auflage, Stenströms Bokförlag AB, Interpublishing, Stockholm (1992)
- <sup>155</sup> Rösecke, J.  
*Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen aus Holz zersetzenden Basidiomyceten*  
Dissertation, Univ. Hamburg, FB Chemie (2000)

## Publikationen

Ayoub N., Lass, D., Schultze, W.

*International Journal of Medicinal Mushrooms* 11(1) (2009) 55 – 60

Volatile Constituents of the Medicinal Fungus Chaga *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.)

Pilát (Aphylophoromycetideae)

# **Eidesstattliche Versicherung über die selbständige Anfertigung der Arbeit und Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Dennis Lass

Hamburg, den 22.05.2009

## **Erklärung über Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass es sich um meinen ersten Promotionsversuch handelt.

Dennis Lass

Hamburg, den 22.05.2009