

6. Experimenteller Teil

6.1. Geräte

NMR

1D-NMR-Spektren (^1H , ^{13}C) wurden an einem Varian Unity 400 bzw. einem Varian Unity 500 aufgenommen, 2D (HSQC, HMBC, COSY, NOESY) NMR-Spektren an einem Varian Unity 500. Chemische Verschiebungen wurden bezüglich internem TMS ($\delta = 0.000$, ^1H) bzw. des Lösungsmittels CDCl_3 ($\delta = 77.000$, ^{13}C) referenziert und in ppm angegeben. Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

IR, UV, CD

IR-Spektren wurden an einem Bruker IFS 28, CD- und UV-Spektren an einem Jasco J-710 und der spezifische Drehwert an einem JASCO DIP-1000 Polarimeter gemessen.

HPLC-ESI-MS und tandem-massenspektroskopische Untersuchungen

Die Elektrospray-Massenspektren (ESI-MS) positiver und negativer Ionen wurden mit einem Finnigan MAT TSQ 7000 System aufgenommen (Elektrospray-Spannung für positive Ionen 4.5 kV, für negative Ionen 4.0 kV; Spraygas: Stickstoff). Die Temperatur der beheizten Kapillare betrug 220°C . Das MS-System ist mit einer Surveyor Micro-HPLC (ThermoFinnigan) gekoppelt. Für die HPLC wurde Säule MS1 mit dem Gradienten MS1 benutzt.

Die CID-Massenspektren der entsprechenden $[\text{M}+\text{H}]^+$ bzw. $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ionen wurden während des HPLC-Laufes gemessen. Die Kollisionsenergie ist angegeben. Als Kollisionsgas diente Argon, der Kollisionsdruck betrug ca. 1.8×10^{-3} Torr. Die negativen SRM-Messungen wurden während des HPLC-Laufes durchgeführt, die gemessenen Übergänge sind in Tabelle 6.4 angegeben, die Kollisionsenergie betrug 20 eV. Alle Massenspektren sind gemittelt und untergrundkorrigiert.

HPLC-APPI-Massenspektren

HPLC-APPI-MS wurden mit einem API-150EX Massenspektrometer (Fa. Applied Biosystems), ausgestattet mit einer Sciex-APPI-Quelle gemessen. Das System ist mit einer Agilent HPLC (Serie 1100) gekoppelt. Durch Austausch der Ionenquelle gegen eine Sciex-Turbo-Ionspray konnten mit diesem Gerät auch ESI-Massenspektren generiert werden.

HR-ESI-CID-QqTOF-Massenspektren

Hochaufgelöste Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung (CID) der durch Elektrospray-Ionisierung (ESI) erhaltenen $[\text{M}+\text{H}]^+$ bzw. $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ionen wurden mit einem API QSTAR Pulsar Quadrupol Gerät mit orthogonal angeordnetem Flugzeit-Massenspektrometer (TOF-MS, Applied Biosystems / MDS Sciex) aufgenommen. Die Proben wurden

in Methanol mit 1% Ameisensäure gelöst und mittels integrierter Harvard-Spritzenpumpe bei einem Fluss von $15 \mu\text{l min}^{-1}$ injiziert. Die Ionen-Spray-Spannung betrug $\pm 5.5 \text{ kV}$ im positiven sowie negativen Modus. Stickstoff diente als Stoßgas. Die Massenskala wurde mit den Standardverfahren und -verbindungen des Instrumentenherstellers kalibriert. Produkt-Ionen-Spektren wurden intern mit dem unfragmentierten Vorgänger-Ion recalibriert (Single Lock Mass).

HR-FT-ICR-MS

Die exakte Massenbestimmungen wurden an einem Bruker Apex III 70e Fourier Transformation Ionen Cyclotron Resonanz (FT-ICR) Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Billerica, USA) durchgeführt, welches mit einer InfinityTM-Zelle, einem 7.0 Tesla Tieftemperatur-supraleitungsmagneten (Bruker, Karlsruhe, Deutschland), einer Apollo-Ionenquelle und einem Agilent-Sprayer ausgestattet ist. Die Probelösungen wurden mittels Spritzenpumpe bei einem gleichbleibenden Fluss von $120 \mu\text{l h}^{-1}$ injiziert.

Gaschromatographie gekoppelt mit massenselektiven Detektor (GC-MS)

Gaschromatographie wurde an einem direkt gekoppeltem GC-MS-System (Voyager, ThermoQuest) durchgeführt mit: 70 eV EI, Quelltemp. $200 \text{ }^\circ\text{C}$; Säule DB-5MS (J&W, 30 m x 0.25 mm, $0.25 \mu\text{m}$ Filmdicke), Injektionstemp. $250 \text{ }^\circ\text{C}$, Interfacetemp. $300 \text{ }^\circ\text{C}$, Trägergas He, Flussrate 1.0 ml/min , konstanter Fluss, splittlose Injektion, Säulentemperaturprogramm: $60 \text{ }^\circ\text{C}$ für 1 min, dann Anstieg auf $300 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 10 K/min , isothermisch bei $300 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min.

Analytische Dünnschichtchromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden auf DC-Aluminiumfolien, Kieselgel 60 F254 (Fa. Merck) verwendet. die Detektion der Spots erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm sowie durch Eintauchen der DC-Folie in methanolische KOH-Lösung (10%) oder Erhitzen im Heißluftstrom. Angegeben werden die R_f -Werte und das entsprechende Laufmittel. Folgende Laufmittelgemische wurden benutzt:

LM1: $\text{CH}_3\text{Cl} / \text{MeOH} : 95/5 \text{ (v/v)}$

LM2: Toluol / Ethylformiat / Ameisensäure : $10/5/3 \text{ (v/v/v)}$

Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde in zylindrischen Glassäulen mit Frittenboden an RP18-Material (Fa. Merck) oder Lichroprep Diol (Fa. Macherey & Nagel) durchgeführt.

Festphasenextraktion - Kartusche

Festphasenextraktion wurde an Chromabond Diol-Kartuschen (500 mg, Fa. Macherey & Nagel) durchgeführt. Zur Konditionierung der Kartuschen wurde sie mit leichtem Druck beginnend mit MeOH und anschließend mit MeOH-H₂O-Gemischen mit ansteigendem H₂O-Gehalt gespült. Die Probe wurde im 1. Elutionslösungsmittel gelöst oder suspendiert und auf die Kartusche gegeben. Anschließend wurde mit MeOH-H₂O-Gemischen mit ansteigendem MeOH-Gehalt eluiert.

HPLC

Präparative HPLC wurde an einer Anlage mit Merck-Hitachi L-6250 Gradientenpumpe und L-4250 UV-Detektor bzw. an einem Varian ProStar 218 System mit PrepStar 330 Photodiodenarraydetektor durchgeführt. Chirale, analytische HPLC wurde an einer Anlage der Firma Agilent Serie 1100 mit Photodiodenarraydetektor und Säulenofen bei 25 °C durchgeführt. Folgende Säulen wurden dabei benutzt:

Säule 1:	LiChrospher 100 RP-18 Säule (10 μm , 250 x 4 mm ID, Fa. Merck)
Säule 2:	Nucleosil 100 RP-18 Säule (7 μm , 250 x 7 mm ID, Fa. Macherey & Nagel)
Säule 3:	Nucleosil 100 RP-18 Säule (7 μm , 250 x 1 mm ID, Fa. Macherey & Nagel)
Säule MS1:	Ultrasep ES RP-18E Säule (5 μm , 100 x 1 mm ID, Fa. SepServ)
Säule MS2:	Ultrasep ES RP-18E Säule (5 μm , 150 x 2 mm ID, Fa. SepServ)
AD-H:	Chiralpak AD-H (5 μm , 250 x 4.6 mm ID, Fa. Daicel)
AS-H:	Chiralpak AS-H (5 μm , 250 x 4.6 mm ID, Fa. Daicel)
OB-H:	Chiralcel OB-H (5 μm , 250 x 4.6 mm ID, Fa. Daicel)
OD-H:	Chiralcel OD-H (5 μm , 250 x 4.6 mm ID, Fa. Daicel)

Es wurden folgende Gradienten verwendet:

Gradient 1:	Start: 70% B, 40 min: 100% B, A = H ₂ O/MeOH (70/30, v/v), B = MeOH, Flussrate (FR) = 5.0 ml/min.
Gradient 2:	Start: 75% B, isokratisch, A = H ₂ O, B = MeOH, FR = 1.0 ml/min.
Gradient 3:	Start: 75% B, isokratisch, A = H ₂ O, B = MeOH, FR = 27.6 ml/min.
Gradient 4:	Start: 80% B, 20 min: 100% B, A = H ₂ O, B = MeOH, FR = 27.6 ml/min.
Gradient 5:	Start: 90% B, 20 min: 100% B, A = H ₂ O, B = MeOH, FR = 27.6 ml/min.
Gradient 6:	Start: 60% B, 45 min: 100% B, A = H ₂ O/MeOH (70/30, v/v), B = MeOH, FR = 5.0 ml/min.
Gradient 7:	Start: 70% B, 50 min: 75% B, 55 min: 100% B, A = H ₂ O/MeOH (70/30, v/v), B = MeOH, FR = 5.0 ml/min.
Gradient 8:	Start: 60% B, 15 min: 100% B, 25 min: 100% B, A = H ₂ O, B = MeOH.
Gradient 9:	Start: 50% B, 20 min: 100% B, 35 min: 100% B, A = H ₂ O, B = MeOH, FR = 27.6 ml/min.
Gradient 10:	Start: 20% B, 15 min: 60% B, 25 min: 60% B, 35 min: 100% B, A = H ₂ O, B = MeOH.
Gradient 11:	Start: 75% B, isokratisch, A = n-Hexan, B = i-Propanol, FR = 0.5 ml/min, Säulenofen 25 °C.
Gradient MS1	Start: 20% B, 15 min: 90% B, 25 min: 90% B, A = H ₂ O + 0.2% HOAc, B = CH ₃ CN + 0.2% HOAc, FR = 70 $\mu\text{l}/\text{min}$
Gradient MS2	Start: 2% B, 25 min: 100% B, 35 min: 100% B, A = H ₂ O + 0.2% HOAc, B = CH ₃ CN + 0.2% HOAc, FR = 400 $\mu\text{l}/\text{min}$.

6.2. Chemikalien

Alle benutzten Lösungsmittel wurden vor Benutzung destilliert. [2-¹³C]-D-Glucose wurde von der Deutero GmbH, ¹³C markiertes Lipidgemisch aus Algen (Algal Lipid Mixture) von Cambridge Isotope Laboratories, Inc. und 2-¹³C-Essigsäure von Euriso-top bezogen. Die markierte Essigsäure wurde mit Natronlauge neutralisiert und lyophilisiert um 2-¹³C markiertes Natriumacetat zu erhalten.

6.2.1. Kulturmedien

Für die Stammhaltung und die Kultivierung der Pilzkulturen wurden folgende Medien wurden benutzt. Diese wurden 15 min bei bei 1.1 bar Überdruck bei 121°C im Autoklaven mit Wasserdampf sterilisiert.

Sojabohnenmehl-Medium

lösliche Stärke	20 g
Glycerol	30 g
Glucose	30 g
Soyamehl	10 g
Hefeextrakt	2.5 g
NH ₄ NO ₃	2.5 g
Leitungswasser	auf 1 000 ml

pH-Wert vor dem Autoklavieren 6.5

Moser B

Maltose	20 g
Glucose	10 g
Pepton	2 g
Inosit	50 mg
Hefeextrakt	0.2 mg
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g
ZnSO ₄ (0.2% Lsg.)	0.5 ml
FeCl ₃ (1% Lsg.)	1 ml
CaCl ₂ (0.1 M Lsg.)	5 ml
MnSO ₄ (1% Lsg.)	0.5 ml
Thiamin	50 µg
Biotin	1 µg
Agar	20 g
destilliertes Wasser	auf 1 000 ml

Malz-Pepton-Medium

Malz	10 g
Pepton	2.5 g
Agar	15 g
destilliertes Wasser	auf 1 000 ml

Hefelösung und Hefeagar für *C. cucumerium*

Mannitol	50 g
Saccharose	50 g
Bernsteinsäure	5.4 g
Hefe-Extrakt	3.0 g
KH ₂ PO ₄	100 mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	300 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	10 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	4.4 mg
H ₂ O (bidest.)	auf 1 000 ml

Vor dem Autoklavieren muss der pH-Wert auf 5.4 eingestellt werden. Für festes Medium (Hefeagar) werden noch 10 g Agar zugegeben.

Hafer-Bohnen-Medium

Bohnenmehl	34.0 g
Hafermehl	17.0 g
Saccharose	8.5 g
Agar	15 g
destilliertes Wasser	auf 1 000 ml

6.3. Pilzmaterial

Das Pilzmaterial für die Isolierung von Hygrophoronen (siehe Tabelle 6.1), für das Screening auf Hygrophorone mittels $^1\text{H-NMR}$ (Tabelle 6.2) bzw. SRM (Tabelle 6.3) wurde bei -20°C im Tiefkühlschrank bis zur Aufarbeitung aufbewahrt. *H. korhonenii* wurde in Methanol eingelegt. Herbarbelege sind im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale) hinterlegt.

Kulturen von *Hygrophorus pustulatus* (Pers.: Fr.) Fr. Stamm CBS 375.89 sowie *Rigidoporus lineatus* (Pers.) Ryvarden Stamm CBS 109425 wurden vom Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Niederlande erhalten.

Tabelle 6.1. Für die Isolierung von Hygrophoronen benutztes Pilzmaterial.

Pilz	Fundort	Datum	Koll.	Habitat	leg. / det.
<i>H. latitabundus</i>	Bad Bibra, Sachsen-Anhalt	4. 11. 2002	68/02	<i>Pinus</i>	M. Huth / M. Huth
<i>H. olivaceoalbus</i>	Kelheim, Bayern	24. 09. 2001	18/01	<i>Picea</i>	N. Arnold / N. Arnold
<i>H. persoonii</i>	Ingolstadt, Bayern	Sept. 2000	28/00	<i>Quercus</i>	N. Arnold / N. Arnold
<i>H. pustulatus</i>	Harzgerode Sachsen-Anhalt	29. 11. 2001	93/01	<i>Picea</i>	T. Lübken / N. Arnold

6.4. Extraktion und Reinigung

6.4.1. Gewinnung der Petrolether-Rohextrakte

Die bei -20°C gelagerten, tiefgefrorenen Fruchtkörper werden grob mit einer Schere oder fein mit einem Mixer zerkleinert und anschließend dreimal mit Petrolether ($40 - 60^\circ\text{C}$) extrahiert. Die leicht gelbe Lösung wird *in vacuo* bei max. 40°C zu einem gelblichen Öl eingengt.

6.4.2. *Hygrophorus persoonii*

Der Petroletherextrakt (1.45 g) von *H. persoonii* Arnolds (229 g) wurde mittels Festphasenextraktion an einer Diolkartusche (50%, 70% *aq.* MeOH, 100% MeOH) fraktioniert. Das 70%-Eluat (337 mg) wurde weiter mit präparativer HPLC (Säule 1, Gradient 1) aufgetrennt, um 51.1 mg 4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron A¹² (**31**, $R_t = 32.8$ min) und 12.6 mg 4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron A¹⁴ (**34**, $R_t = 38.7$ min) zu erhalten. Fraktionen von 28.0 – 31.0 min enthielten 1.3 mg 4-*O*-Acetylhygrophoron A¹² (**32**) und 1.7 mg 6-*O*-Acetylhygrophoron A¹² (**33**), welche durch wiederholende HPLC (Säule 3, Gradient 2) voneinander

Tabelle 6.2. Für das $^1\text{H-NMR}$ -Screening auf Hygrophorone benutztes Pilzmaterial

Pilz	Fundort	Datum	Kollektion	leg./det.
Sektion Hygrophorus				
Subsektion Chrysodonti				
<i>H. chrysodon</i>	Freyburg (Alte Probstei)	26.08.02	15/02	Lübken/Arnold
Subsektion Pallidini				
<i>H. penarius</i>	Freyburg (Alte Probstei)	26.08.02	14/02	Lübken/Arnold
Subsektion Hygrophorus				
<i>H. eburneus</i>	Freyburg (Frankenhohle)	13.10.03	25/03	Lübken/Arnold
<i>H. cossus</i>	Freyburg (Frankenhohle)	26.08.02	13/02	Lübken/Arnold
<i>H. hedrychii</i>	Freyburg (Frankenhohle)	23.10.03	31/03	Lübken/Arnold
<i>H. glyocyclus</i>	Bad Bibra	04.11.02	70/02	Lübken/Arnold
<i>H. carpini</i>	Freyburg	23.10.03	27/03	Lübken/Arnold
<i>H. chrysaspis</i>	Schwaighauser Forst	19.09.94	09/94	Arnold/Arnold
Sektion Pudorini				
Subsektion Erubescentes				
<i>H. erubescens</i>	München / Pupplinger Au	25.09.01	16/01	Arnold/Arnold
<i>H. russula</i>	Karlstadt / Main	26.10.01	81/01	Arnold/Arnold
<i>H. capreolarius</i>	Pilzausstellung München	05.10.02	30/02	
Subsektion Pudorini				
<i>H. poetarum</i>	Pilzausstellung München	05.10.02	26/02	
<i>H. nemoreus</i>	Freyburg (Alte Probstei)	17.10.02	33/02	Lübken/Arnold
<i>H. pudorinus</i>	Pilzausstellung München	05.10.02	27/02	
Sektion Discoidei				
<i>H. discoideus</i>	Pilzausstellung München	05.10.02	24/02	
<i>H. unicolor</i>	Freyburg (Frankenhohle)	02.11.02	61/02	Lübken/Arnold
<i>H. lucorum</i>	Freyburg (Frankenhohle)	02.11.02	65/02	Lübken/Arnold
<i>H. hypothejus</i>	Eberswalde	25.11.01	97/02	Lübken/Arnold
Sektion Olivaceoumbrini				
Subsektion Olivaceoumbrini				
<i>H. olivaceoalbus</i>	Neudorf / Harz	30.09.03	07/03	Lübken/Arnold
<i>H. persoonii</i>	Karlstadt / Main	26.10.01	76/01	Arnold/Arnold
<i>H. latitabundus</i>	Bad Bibra	13.11.02	87/02	Lübken/Arnold
Subsektion Tephroleuci				
<i>H. pustulatus</i>	Neudorf / Harz	06.11.02	84/02	Lübken/Arnold
<i>H. agathosmus</i>	Ingolstadt	06.10.00	72/00	Arnold/Arnold

Die Einteilung der Arten in Sektionen und Untersektionen erfolgte nach [Arnolds \(1990\)](#)

Tabelle 6.3. Für das SRM-Screening benutztes Pilzmaterial.

Pilz	Fundort	Datum	Koll.	Habitat	leg. / det.
<i>H. agathosmus</i>	Ingolstadt, Bayern	6. 10. 2000	72/00	<i>Picea</i>	N. Arnold
<i>H. discoideus</i>	Andechs, Bayern	16. 10. 05	42/05	<i>Fagus</i>	N. Arnold
<i>H. korhonenii</i> *	Trollhätten, Schweden	17. 09. 2005	35/05	<i>Picea</i>	L. & A. Stridvall
<i>H. nemoreus</i>	Ansberg, Bayern	26. 08. 2002	12/02	<i>Fagus</i>	N. Arnold
<i>H. poetarum</i>	Andechs, Bayern	27. 10. 2004	88/04	<i>Fagus</i>	N. Arnold
<i>H. pustulatus</i>	Harzgerode Sachsen-Anhalt	06. 11. 2004	93/04	<i>Picea</i>	N. Arnold

* *H. korhonenii* wurde direkt nach dem Sammeln in Methanol überführt und darin 7 Tage bis zur Aufarbeitung gelagert.

getrennt wurden. Fraktionen von 34.0 – 37.0 min enthielten 1.2 mg eines Gemisches von 4-*O*-Acetylhygrophoron A¹⁴ (**35**) und 6-*O*-Acetylhygrophoron A¹⁴ (**36**), welches nicht weiter fraktioniert wurde. Fraktionen von 33.0 – 34.0 min enthielten Hygrophoron F¹² (**40**) gemeinsam mit Hygrophoron G¹² (**41**). Weitere Fraktionierung durch Säulenchromatographie an Lichroprep Diol mit CHCl₃ als Laufmittel ergaben 0.9 mg **40** und Spuren von **41**.

Semisynthetische Derivate: 10 Tropfen einer methanolischen NaOH-Lösung (ca. 0.1%) wurden zu einer Lösung von 9.7 mg **31** in MeOH (2 ml) gegeben und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde mit 8 ml Wasser verdünnt und mit Festphasenextraktion an einer Diol-Kartusche (50% *aqu.* MeOH, 100% MeOH) vorgereinigt. Das 100%-MeOH-Eluat wurde mittels HPLC (Säule 2, Gradient 3) fraktioniert, um ein Gemisch (18.45 – 21.00 min, 2.6 mg) von Hygrophoron A¹² (**37**) und seinem Methanol-Addukt **38** zu erhalten. Dieses wurde nicht weiter gereinigt.

Zu einer Lösung von 13.6 mg **31** in Pyridin (1.5 ml) wurden einige Tropfen Essigsäureanhydrid gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck, wurde das peracetylierte Derivat **39** quantitativ erhalten.

6.4.3. *Hygrophorus olivaceoalbus*

Mit Festphasenextraktion an Diol-Kartusche (70% *aqu.* MeOH und 100% MeOH) wurde der Petroletherextrakt (451 mg) von *H. olivaceoalbus* (Fr.) Fr. (570 g) fraktioniert. Das 70%-Eluat (76.6 mg) wurde weiter mit HPLC (Säule 2, Gradient 4) gereinigt, um 17.3 mg Hygrophoron B¹⁴ (**44**, R_t = 10.5 min) und 6.4 mg Hygrophoron B¹⁶ (**45**, R_t = 13.8 min) zu erhalten.

Semisynthetische Derivate: Drei Tropfen Essigsäureanhydrid wurden zu einer Lösung von 2.8 mg **44** in Pyridin (1 ml) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels HPLC (Säule 2, Gradient 5) in zwei Fraktionen getrennt. Fraktion I (6.8 – 7.8 min) enthielt 2.4 mg **48**, welches mit **46** verunreinigt war (ca. 10%, bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$). Fraktion II (8.0 – 9.0 min) enthielt 0.9 mg **49**. Fraktion I wurde nicht weiter gereinigt.

Zu einer Lösung von 1 mg **44** in Pyridin (1 ml) wurde ein Tropfen Essigsäureanhydrid gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Rückstand (1.1 mg) enthielt nach Entfernen des Lösungsmittels **47** und **48** im Verhältnis 2:1 (bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$) und wurde nicht weiter separiert.

6.4.4. *Hygrophorus pustulatus*

Der Petroletherextrakt (62.6 mg) von *H. pustulatus* (Pers.) Fr. (280 g) wurde mittels semi-präparativer HPLC (Säule 1, Gradient 6) fraktioniert um 1.0 mg 4-*O*-Acetylhygrophoron C¹² (**50**, R_t = 24.8 min) und 1.5 mg Hygrophoron C¹² (**51**, R_t = 27.1 min) zu erhalten.

6.4.5. *Hygrophorus latitabundus*

Der Petroletherextrakt (187 mg) von *H. latitabundus* Britz. (697 g) wurde zunächst mittels Festphasenextraktion (50%, 70% *aq.* MeOH, 100% MeOH) fraktioniert. Das 70%-Eluat wurde mit präparativer HPLC (Säule 1, Gradient 7) fraktioniert. Fraktionen von 18.0 – 22.5 min enthielten 1.0 mg Hygrophoron D¹² (**53**), 26.0 – 30.0 min 10.9 mg 4-*O*-Acetylhygrophoron D¹² (**52**), 31.0 – 40.0 min 7.6 mg 1,4-Di-*O*-acetylhygrophoron E¹² (**56**), 51.0 – 55.0 min 9.7 mg 4-*O*-Acetylhygrophoron D¹⁴ (**54**).

Ein weiterer Petroletherextrakt (486 mg, erhalten durch erschöpfende Extraktion von 490 g Fruchtkörpern) wurde mittels Säulenchromatographie (RP18, H₂O/MeOH = 15/85) in drei Hauptfraktionen fraktioniert. Fraktion I: 540 – 750 ml (12.1 mg), Fraktion II: 1 300 – 1 900 ml (31.0 mg) und Fraktion III: 2 170 – 2 490 ml (30.6 mg). Fraktion I erwies sich als ein Gemisch aus 1,4-Di-*O*-acetylhygrophoron E¹⁰ (**57**) und 1-*O*-Acetylhygrophoron E¹⁰ (**60**), welches nicht weiter getrennt wurde. Fraktion II wurde weiter mittels HPLC (Säule 1, Gradient 7) fraktioniert um ein Gemisch (2.2 mg) aus 1,4-Di-*O*-acetylhygrophoron E¹² (**56**) und 1-*O*-Acetylhygrophoron E¹² (**59**) zu erhalten, welches nicht weiter getrennt wurde. Fraktion III wurde mittels HPLC (Säule 1, Gradient 7) fraktioniert um 4.5 mg 1,4-Di-*O*-acetylhygrophoron E¹⁴ (**58**) zu erhalten.

6.5. Screening auf Hygrophrone - Gewinnung der Rohextrakte

Für das Screening auf Hygrophrone in verschiedenen *Hygrophorus*-Arten mittels $^1\text{H-NMR}$ und mittels SRM wurden jeweils 1 – 2 tiefgefrorene Pilzfruchtkörper ($^1\text{H-NMR}$: Tabelle 6.2, SRM: Tabelle 6.3) mit einer Schere zerkleinert und zweimal mit ca. 200 ml Petrolether (40

Tabelle 6.4. Messergebnisse SRM-Screening (angegeben sind R_t und Intensität).

gemessener Übergang	aga	disc	korho	nemo	poet	pustu
311 ($[M-H]^-$) \rightarrow	15.6 min	–	–	15.6 min	15.6 min	15.5 min
213 ($[M-H-C_5H_6O_2]^-$)	100%			100%	97%	100%
227 ($[M-H-C_4H_4O_2]^-$)	34%			97%	100%	42%
249 ($[M-H-H_2O-CO_2]^-$)	36%			33%	30%	51%
255 ($[M-H-C_3H_4O]^-$)	23%			37%	33%	28%
311 ($[M-H]^-$) \rightarrow	–	–	–	–	16.2 min	16.2 min
213 ($[M-H-C_5H_6O_2]^-$)					64%	31%
227 ($[M-H-C_4H_4O_2]^-$)					69%	45%
249 ($[M-H-H_2O-CO_2]^-$)					100%	13%
255 ($[M-H-C_3H_4O]^-$)					39%	100%
339 ($[M-H]^-$) \rightarrow	18.2 min	18.7 min	18.8 min	–	18.2 min	18.2 min
241 ($[M-H-C_5H_6O_2]^-$)	100%	100%	100%		100%	100%
255 ($[M-H-C_4H_4O_2]^-$)	29%	27%	25%		31%	n. a.
277 ($[M-H-H_2O-CO_2]^-$)	45%	43%	44%		46%	53%
283 ($[M-H-C_3H_4O]^-$)	23%	19%	22%		21%	30%
339 ($[M-H]^-$) \rightarrow	–	–	–	–	19.1 min	19.1 min
241 ($[M-H-C_5H_6O_2]^-$)					35%	37%
255 ($[M-H-C_4H_4O_2]^-$)					45%	48%
277 ($[M-H-H_2O-CO_2]^-$)					18%	21%
283 ($[M-H-C_3H_4O]^-$)					100%	100%
353 ($[M-H]^-$) \rightarrow	–	–	–	–	17.8 min	–
139 ($[C_7H_7O_3]^-$)					0%	
265 ($[M-H-HOAc-CO]^-$)					28%	
293 ($[M-H-HOAc]^-$)					100%	
309 ($[M-H]^-$) \rightarrow	17.6 min	17.2 min	17.6 min	17.6 min	18.0 min	17.6 min
263 ($[M-H-H_2O-CO]^-$)	68%	61%	70%	64%	67%	73%
265 ($[M-H-CO_2]^-$)	100%	100%	100%	100%	100%	100%
281 ($[M-H-CO]^-$)	53%	51%	56%	49%	51%	55%
337 ($[M-H]^-$) \rightarrow	20.5 min	20.1 min	–	20.5 min	20.5 min	20.4 min
291 ($[M-H-H_2O-CO]^-$)	56%	45%		53%	53%	59%
293 ($[M-H-CO_2]^-$)	100%	100%		100%	100%	100%
309 ($[M-H-CO]^-$)	56%	43%		59%	55%	55%
337 ($[M-H]^-$) \rightarrow	–	–	–	–	21.4 min	21.3 min
291 ($[M-H-H_2O-CO]^-$)					27%	34%
293 ($[M-H-CO_2]^-$)					100%	100%
309 ($[M-H-CO]^-$)					38%	47%

Tabelle 6.4. Fortsetzung: Messergebnisse SRM-Screening.

gemessener Übergang	aga	disc	korho	nemo	poet	pustu
351 ($[M-H]^- \rightarrow$	–	–	–	19.2 min	19.2 min	19.1 min
139 ($[C_7H_7O_3]^-$)				6%	1%	1%
265 ($[M-H-CO_2-CH_2CO]^-$)				72%	71%	100%
309 ($[M-H-CH_2CO]^-$)				100%	100%	79%
379 ($[M-H]^- \rightarrow$	22.2 min	–	–	–	22.1 min	22.0 min
139 ($[C_7H_7O_3]^-$)	0%				0%	0%
291 ($[M-H-HOAc-CO]^-$)	19%				17%	15%
293 ($[M-H-CO_2-CH_2CO]^-$)	47%				52%	51%
337 ($[M-H-CH_2CO]^-$)	100%				100%	100%

aga = *H. agathosmus*; disc = *H. discoideus*; korho = *H. korhonenii*; nemo = *H. nemoreus*; poet = *H. poetarum*; pustu = *H. pustulatus*; n. a. = nicht auswertbar

– 60 °C) unter Schütteln ca. 1 Stunden extrahiert. Die leicht gelbe Lösung wurde *in vacuo* zu einem öligen Rückstand eingengt und entweder in 0.6 ml deuteriertem Chloroform aufgenommen und von dieser Lösung ein 1H -NMR (400 MHz) mit 256 Scans gemessen (vergl. Teichert (2004) und Bačiniović (2006)) oder in Methanol aufgenommen und für die massenspektrometrische Untersuchung benutzt. *H. korhonenii* wurde in Methanol 7 Tage gelagert. Für die MS-Untersuchung wurde diese Lösung *in vacuo* zur Trockene eingengt und der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen.

6.6. Submerskulturen von *Rigidoporus lineatus*

Standkultur: Von *R. lineatus* wurden in 1l-Erlenmeyerkolben, bestückt mit je 100 ml Malz-Pepton-Flüssigmedium Submerskulturen angelegt und 14 Tage bei Raumtemperatur gehalten. Das weiße Myzel hatte die gesamte Oberfläche überwuchert. Mit einem Sieb wurde es vom Medium getrennt. Sowohl das Myzel als auch das Medium wurden mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingengt (Ausbeute: 87.7 mg). **Schüttelkultur:** 15 Kulturen á 100 ml (Malz-Pepton) wurden bei 37 °C in einem Kreisschüttler bei 150 rpm 13 Tage wachsen gelassen. Aufarbeitung wie Standkultur (Ausbeute 78.2 mg). **Fraktionierung:** Die beiden Rohextrakte wurden nach DC- und 1H -NMR-Kontrolle vereinigt, an Diol-Kartusche (40% aqu. MeOH und 100% MeOH) vorgereinigt, die 40%-Fraktion mittels HPLC (Säule 2, Gradient 10) getrennt, um drei Fraktionen zu erhalten. Fraktion I (3.5 – 5.0 min, 1.3 mg) enthielt **88**, Fraktion II (9.0 – 11.5 min, 2.9 mg) enthielt **87**, Fraktion III (19.0 – 20.0 min, 2.7 mg) enthielt F-15784 (**86**).

6.7. Verimpfungsexperimente

6.7.1. Fruchtkörper von *Hygrophorus* spp.

Junge Fruchtkörper von *H. personii*, *H. pustulatus* und *H. latitabundus* wurden mit je 3 mg [2-¹³C]-Natriumacetat (gelöst in je 100 µl Leitungswasser) oder je 3 mg [2-¹³C]-D-Glucose (gelöst in je 100 µl Leitungswasser) beimpft, indem die Lösung mit einer Spritze von oben durch den Hut in den Stiel sowie seitlich in den Stiel injiziert wurde. Die Fruchtkörper wurden nach 3 – 5 Tagen geerntet und mit Petrolether extrahiert. Unmarkierte Fruchtkörper dienten als Kontrolle.

6.7.2. Kulturen von *Rigidoporus lineatus*

Zu insgesamt dreißig 11-Erlenmeyerkolben, bestückt mit je 100 ml Malz-Pepton-Flüssigmedium, wurden entweder je 10 mg [2-¹³C]-Natriumacetat (gelöst in Wasser), 10 mg [2-¹³C]-D-Glucose (gelöst in Wasser) oder 10 mg eines ¹³C markierten Lipidgemisches (gelöst in Methanol) gegeben und mit einem Inokulum von *R. lineatus* beimpft. Als unmarkierte Kontrolle dienten zehn weitere Submerskulturen. Die Kulturen wurden nach 14 Tagen Wachstum wie oben beschrieben aufgearbeitet.

6.8. Biotest

6.8.1. Bestimmung der antifungischen Aktivität

Die antifungische Aktivität wurde mit der Methode nach [Gottstein et al. \(1982\)](#) bestimmt. Hierzu wurden die in Methanol gelösten Reinsubstanzen mittels Mikroliterspritze auf handgezogene DC-Platten (Glasplatte, 20 x 20 cm, Kieselgel 60 HF₂₅₄ für DC (Fa. Merck), Schichtdicke 0.5 mm, Aktivierung: 30 min bei 120 °C im Trockenschrank) auf eine kreisrunde Fläche mit einem Durchmesser von 1 cm (entspricht einer Fläche von 79 mm²) aufgetragen. Anschließend wurden die Platten im Luftstrom getrocknet, um Lösungsmittelreste zu entfernen. Jede Platte wurde im liegenden Zustand gleichmäßig mit ca. 10 ml einer wässrigen, nährstoffhaltigen Sporensuspension des Phytopathogens *C. cucumerinum* Ell. et Arth (Sporendichte ca. 2.5x10⁶ Sporen/ml) besprüht. Danach wurden die Platten bei Raumtemperatur einige Minuten getrocknet und anschließend in eine DC-Kammer gestellt, die mit wassergetränktem Filterpapier ausgekleidet worden war. Die DC-Kammer wurde mit einem Deckel verschlossen und bei 25 °C in einem Brutschrank aufbewahrt. Nach etwa zwei Tagen Inkubation hatte sich ein dunkelgrauer Myzelbelag entwickelt. Stellen mit antifungisch wirksamen Verbindungen sind als weiße Flecken (Hemmhof) erkennbar.

6.8.2. Bestimmung der antibakteriellen Aktivität *in vitro*

Die minimale Hemmkonzentration (MIC) wurde mit der Mikroverdünnungsmethode nach den Richtlinien der NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) be-

stimmt. Benutzt wurde dazu ein Kationen adjustierter Mueller-Hinton-Bouillon (BBL, Lot 2 218 968). Das Medium wurde entsprechend für schwer kultivierbare Bakterien angepasst. Verdünnungsreihen in 96er Mikrotiterplatten wurden mit Hilfe eines Biomek 2000 Roboters angefertigt. Der pH-Wert des Testmediums lag bei 7.2 – 7.4. Vancomycin, Linezolid und Ciprofloxacin dienten als Referenz-Antibiotika. Getestet wurden gegen Referenz-Stämme der ATCC (American Type Culture Collection) sowie gegen klinische Isolate mit verschiedenen Resistenzmechanismen. Ein zellwandpermeabler Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* diente als eukariotischer Testorganismus. Die klinischen Isolate stammen entweder vom Universitätskrankenhaus Basel, Schweiz, oder aus anderen europäischen oder US-amerikanischen Krankenhäuser und wurden bei -80 °C als Glycerinkulturen gelagert.

6.8.3. Untersuchung der Membranintegrität

Zur Untersuchung des Einflusses der Hygrophorone auf die Membranintegrität wurde der membranundurchgängige, DNA bindende Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green in Anlehnung an Roth et al. (1997) benutzt. Dazu wurde SYTOX Green zu einer Suspension von *S. aureus* in Gegenwart bzw. Abwesenheit der Testsubstanz gegeben. Nach einer Inkubation von 20 min – 3 Stunden wurde die Fluoreszenz in schwarzen Mikrotiterplatten in einem Tecan Spectrafluor Plus Fluoreszenzplattenleser bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen. Als 100% Positivkontrolle dienten mit Detergenzien lysierte Bakterien.

6.8.4. Hämolytische Aktivität

Die zu messenden Verbindungen wurden in Mikrotiterplatten mit 1% Schaf-Erythrocyten im PBS-Puffer (phosphate-buffered saline) 1 Stunde lang inkubiert. Nach Zentrifugation wurde anschließend freies Hämoglobin im Überstand bei 570 nm gemessen. Mit Triton-X-100 lysierte Zellen dienten als Positivkontrolle.

6.8.5. Aktivität gegen *Phytophthora infestans*

Der für die Aktivitätsuntersuchungen benutzte Oomycet *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary Stamm CRA 208 wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Felix Mauch, Fribourg-Universität, Schweiz zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um einen Stamm, der mit einem GFP-Gen transformiert ist, welches unter der Kontrolle eines Ham-Promotors (Si-Ammour et al. 2003) steht. *P. infestans* wurde auf Hafer-Bohnen-Agar kultiviert und alle 11 Tage überimpft. Um die für den Test benötigten Zoosporen zu erhalten, wurde steriles Wasser auf die Kulturen gegeben und anschließend 3 Stunden bei 4 °C ins Dunkle gestellt. Die Sporendichte wurde auf 5×10^4 Zoosporen/ml eingestellt.

Wachstumshemmung

Der Test auf Wachstumshemmung wurde auf festem Hafer-Bohnen-Medium bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ in 96er Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierzu wurden $100 \mu\text{l}$ Medium mit $100 \mu\text{l}$ Sporensuspension (5 000 Sporen) beimpft. Nach 16 Stunden Inkubation bei 18°C im Dunklen wurden $0.5 \mu\text{l}$ Testsubstanz (10 mM in EtOH) dazugegeben. Das Wachstum von *P. infestans* wurde durch Messung der Fluoreszenz des GFP mit einem CytoFluor II Fluoreszenzmesser (Biosearch, Millipore) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm sofort nach Zugabe sowie nach 24 Stunden gemessen. Das Myzelwachstum wurde als Differenz der gemessenen Fluoreszenz (F) nach 24 Stunden bzw. 0 Stunden im Verhältnis zur Negativkontrolle (1% EtOH) angegeben:

$$\text{Myzelwachstum [in \%]} = \frac{F(\text{Testsubstanz})_{24\text{h}} - F(\text{Testsubstanz})_{0\text{h}}}{F(1\% \text{ Ethanol})_{24\text{h}} - F(1\% \text{ Ethanol})_{0\text{h}}} * 100\%$$

Es wurden drei unabhängige Experimente mit je 8 Wiederholungen für jede zu testende Substanz durchgeführt. Benomyl ($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$) diente als Positivkontrolle, reines Lösungsmittel (1% EtOH) als Negativkontrolle. Die äußeren Wells enthielten nur Medium und $100 \mu\text{l}$ Wasser.

Keimungshemmung

Die Untersuchung auf Hemmung der Sporenkeimung wurde in Wasser in 96er Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden die zu testenden Substanzen in EtOH gelöst und derart in die Wells überführt, dass die Konzentration der Testsubstanz im Well hinterher $50 \mu\text{M}$ (1% EtOH) beträgt. Nach Zugabe von $100 \mu\text{l}$ Sporensuspension (5 000 Sporen) wurde die Platte fünf Stunden bei 18°C im Dunklen inkubiert und anschließend mit einem Inversmikroskop (Leitz DM IL, Leica) untersucht. Dazu wurden von jedem Well vier nicht-überlappende Fotos (Vergrößerung 100fach) mit einer CDD-Kamera (Nikon D1x) erstellt, um hinterher den Keimungszustand von 40 – 50 Zoosporen pro Foto visuell zu beurteilen. Sporen mit einem Keimungsschlauch lang oder länger als die Spore wurde als „keimend“ gezählt. Angegeben ist der Anteil der keimenden Sporen zur Gesamtsporenzahl.

