

Hygrophorone

Neue antifungische Cyclopentenonderivate aus *Hygrophorus*-Arten (Basidiomycetes)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dipl.-Chem. Tilo Lübken
geboren am 10. September 1975 in Eberswalde-Finow

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ludger Wessjohann
2. Prof. Dr. Wolfgang Steglich

Halle (Saale), 16. März 2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010474

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010474>]

Argentum atque aurum
facile est laenamque togamque
Mittere, boletos mittere difficile est.

*Leicht ist es Silber und Gold,
Mantel und Toga zu verschenken,
schwer ist es aber, auf Pilze zu verzichten.*

Marcus Valerii Martialis
Epigrammaton Liber XIII; XLVIII
1. Jh. n. Chr.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale) unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. Ludger Wessjohann angefertigt. Sie wurde teilweise vom Land Sachsen-Anhalt im Rahmen des Hochschul- und Wissenschaftsprogramms (HWP) sowie von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, AR 358/3-1) gefördert.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. An erste Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ludger Wessjohann, der mir dieses interessante Thema überlassen hat. Sein permanentes Interesse am Fortschritt meiner Arbeiten, seine Diskussionen und Visionen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Steglich für die Übernahme des Zweitgutachtens, aber auch für die vielen Inspirationen bedanken.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe. So ein gegenseitig befruchtendes und motivierendes Arbeitsklima gibt es nur selten. Es hat großen Spaß gemacht, hier zu arbeiten.

Ein großer Dank gilt meinem zweiten Doktorvater und direkten Betreuer Herrn Dr. Norbert Arnold. Seine Ungeduld, sein Wissensdrang, seine exzellente Betreuung waren Motivation für mich. Viele Stunden haben wir gemeinsam im Wald verbracht um mit vollen Körben heimzukehren. Danke, dass ich so viel über Pilze lernen durfte. Natürlich wäre diese Arbeit ohne ihn, ohne sein mykologisches Wissen nie zustandegekommen. Kann ich eigentlich jemals wieder ohne KOH in einen Wald gehen?

Frau Dr. Andrea Porzel verdient meinen Dank, weil sie mir nicht nur die Kunst des Spektrenlesens beigebracht hat. Ihr kritisches Hinterfragen, ihre wissenschaftliche Ungläubigkeit haben mich sehr beeindruckt. Mit ihr hatte ich viele interessante Diskussionen und einige verlorene Wetten. Auch dafür danke!

Was wäre ich ohne Dr. Jürgen Schmidt, ohne sein Wissen, seine Erfahrungen in der Massenspektrometrie. Wie oft habe ich geflucht, weil mir die MS nicht die von mir gewünschten Ergebnisse erzeugt hat. Obwohl ich mich bei meinen Arbeiten nicht hauptsächlich um die vielen Alkaloide und Terpensäuren gekümmert habe, die statt dessen auftauchten, hatten wir viele Diskussionen, nicht nur um Zerfallsmechanismen. Mit Dr. Christoph Böttcher hatte ich eine schöne Zusammenarbeit auf dem Gebiet der MS. Nur durch die Ergebnisse seine hochaufgelösten MS-MS-Messungen waren wichtige Fragmente erklärbar. Vielen Dank auch an Christine Kuhnt und Martina Lerbst für ihre schnelle und erfolgreiche Hilfe.

Für die Anfertigung dieser Arbeit hatte ich nicht nur fachliche Unterstützung. Ein besonderer Dank geht an meine vielen Doktormütter, an Monika Kummer, Maritta Süße, Angela Schaks und Gisela Schmidt, die sich rührend um mich gekümmert haben.

Bei Herrn Dr. Wolfgang Brandt möchte ich mich für viele Berechnungen bedanken, ohne die ich einige Probleme nicht hätte lösen können.

Mit Gudrun Hahn habe ich viele lehrreiche Bastelstunden an der HPLC verbracht um Fehler zu finden oder um das System zu optimieren. Auch dafür danke.

Bei Elisabeth Kaydamov und Elvira Schotte möchte ich mich für die Hilfe und Unterstützung bedanken. Frank Broda und Holger Bartz waren bei Computerproblemen prompt zur Stelle. Danke!

Bei „meinen“ beiden Diplomanden Axel Teichert und Sanela Baćinović möchte ich mich sehr bedanken. Es hat Spaß gemacht, mit euch zusammenzuarbeiten. Danke für die schönen Ergebnisse.

Mit Herrn Prof. Dr. Bernhard Westermann, Gisela Schmidt und Tobias Dräger hatte ich eine interessante Zusammenarbeit zur Synthese der Hygrophorone. Viel Glück bei weiteren Derivaten!

Eine große Hilfe war Manfred Huth. Durch seine Kenntnisse und Erfahrungen in den Wäldern rund um Freyburg konnten viele *Hygrophorus*-Kollektionen gesammelt werden. Bei Hans Valda möchte ich mich sehr bedanken. Er hat in Österreich Märzschnecklinge für mich gesammelt. Schade, dass ich darin keine Hygrophorone finden konnte.

Bei Dr. Emiko Harada möchte ich mich besonders bedanken. Sie hat wesentliche Teile des japanischen Patents über *Rigidoporus lineatus* übersetzt. Ohne diese Hilfe hätte ich die Arbeiten an *R. lineatus* nicht so erfolgreich durchführen können.

Monika Kummer hat viele Biotests für mich durchgeführt und mich im Labor tatkräftig unterstützt. Danke dafür! Vielen Dank auch an Dr. Grit Rothe und Dr. Sabine Rosahl für Entwicklung und Durchführung der Tests an *Phytophthora infestans*. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Hans Locher sowie der Firma Morphochem für deren Durchführung von Biotests bedanken.

Katja Thiele hat sich die Mühe gemacht, das Manuskript nach orthographischen und grammatikalischen Fehlern zu durchsuchen. Nicht nur, aber auch dafür danke! Alle verbliebenen Fehler gehen natürlich auf meine Kappe.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihre immaterielle und materielle Unterstützung vor, während und nach dem Studium, ohne die diese Arbeit auch nicht möglich gewesen wäre. Danke Jörg! Dank gebührt auch all meinen Freunden. Vor allem die letzte Zeit war sicher nicht einfach. Danke Ernst für all die Jahre, die schöne Zeit in unserer WG.

Bei Herrn Peter Sodann und beim Neuen Theater Halle möchte ich mich herzlich für die schöne Zeit bedanken. Vielen Dank auch allen, mit denen ich Volleyball gespielt habe. Danke liebe Saaleperlen, liebe Weinberg-Hoppers und auch allen vom Uni-Sport.

Noch einmal großen Dank an alle, die auf irgendeine Weise am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren! Danke für die vielen Anregungen, Motivationen und für das Interesse.

Danke.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Zusammenfassung	5
2. Summary	7
3. Einleitung	9
3.1. Inhaltstoffe von Pilzen	11
3.2. Inhaltsstoffe in Pilzen der Gattung <i>Hygrophorus</i>	13
4. Allgemeiner Teil	19
4.1. Die Gattung der Schnecklinge – <i>Hygrophorus</i>	19
4.2. Übersicht über Farbreaktionen	20
5. Spezieller Teil	23
5.1. <i>Hygrophorus persoonii</i> - Olivgestiefelter Schneckling	23
5.2. <i>Hygrophorus olivaceoalbus</i> - Natternstieliger Schneckling	27
5.3. <i>Hygrophorus pustulatus</i> - Schwarzpunktierter Schneckling	29
5.4. <i>Hygrophorus latitabundus</i> - Großer Kiefern-schneckling	30
5.5. Konfiguration der Hygrophorone	35
5.5.1. Hygrophorone A und B	36
5.5.2. Hygrophorone C und D	37
5.6. MS-Untersuchung ausgewählter Hygrophorone	39
5.6.1. Positive Ionisierung	40
5.6.2. Negative Ionisierung	44
5.7. Screening auf Hygrophorone in <i>Hygrophorus</i> spp.	50
5.7.1. Screening mittels Dünnschichtchromatographie	50
5.7.2. ¹ H-NMR-Screening	50
5.7.3. Screening mittels Selected Reaction Monitoring (SRM)	51
5.8. Biosynthese der Hygrophorone	54
5.8.1. Hygrophorone F und G	54
5.8.2. Hygrophorone A – E	54
5.8.3. Verimpfungsexperimente an Pilzfruchtkörpern	58
5.8.4. Verimpfungsexperimente an Myzelkulturen	58
5.9. <i>Rigidoporus lineatus</i>	58
5.9.1. Fragmentierungsverhalten	60

5.9.2. Verfütterungsexperimente	60
5.10. Biotest	61
5.10.1. Antifungische Aktivität	61
5.10.2. Antibakterielle Aktivität	62
5.10.3. Membranintegrität	62
5.10.4. Aktivität gegen <i>Phytophthora infestans</i>	64
5.11. Vergleich der Hygrophorone mit Naturstoffen	65
6. Experimenteller Teil	67
6.1. Geräte	67
6.2. Chemikalien	70
6.2.1. Kulturmedien	70
6.3. Pilzmaterial	71
6.4. Extraktion und Reinigung	71
6.4.1. Gewinnung der Petrolether-Rohextrakte	71
6.4.2. <i>Hygrophorus personii</i>	71
6.4.3. <i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	73
6.4.4. <i>Hygrophorus pustulatus</i>	74
6.4.5. <i>Hygrophorus latitabundus</i>	74
6.5. Screening auf Hygrophorone - Gewinnung der Rohextrakte	74
6.6. Submerskulturen von <i>Rigidoporus lineatus</i>	76
6.7. Verimpfungsexperimente	77
6.7.1. Fruchtkörper von <i>Hygrophorus</i> spp.	77
6.7.2. Kulturen von <i>Rigidoporus lineatus</i>	77
6.8. Biotest	77
6.8.1. Bestimmung der antifungischen Aktivität	77
6.8.2. Bestimmung der antibakteriellen Aktivität <i>in vitro</i>	77
6.8.3. Untersuchung der Membranintegrität	78
6.8.4. Hämolytische Aktivität	78
6.8.5. Aktivität gegen <i>Phytophthora infestans</i>	78
7. Charakterisierung	81
Literaturverzeichnis	105
A. Anhang	115
Lebenslauf	121
Eidesstattliche Erklärung	123

Abkürzungen

allgemein

ber.	berechnet
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
MeOH	Methanol
MIC	Minimale Hemmkonzentration (minimal inhibition concentration)

NMR

APT	Attached Proton Test
COSY	Correlated Spectroscopy
DEPT	Distortionsless Enhancement by Polarisation Transfer
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
NOE	Nuclear Overhauser Effekt
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
δ	Chemische Verschiebung, angegeben in ppm
<i>br</i>	breites Signal
<i>s</i>	Singulett
<i>d</i>	Dublett
<i>dd</i>	Dublett von Dubletts
<i>ddd</i>	Dublett von Dublett von Dubletts
<i>dt</i>	Dublett von Triplett
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante, angegeben in Hz
<i>t</i>	Triplett
<i>m</i>	Multiplett

IR

μ	Wellenzahl in cm^{-1}
<i>br</i>	breites Signal
<i>m</i>	mittel
<i>s</i>	stark
<i>vw</i>	sehr schwach
<i>w</i>	schwach

MS	Massenspektroskopie
<i>m/z</i>	Masse/Ladungszahl
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APPI	Atmospheric Pressure Photoionisation
CID	Collision Induced Dissociation
ESI	Elektrospray Ionization
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz
SRM	Selected Reaction Monitoring

1. Zusammenfassung

Pilze der Gattung *Hygrophorus* (Schnecklinge) leben in Symbiose (als Mykorrhiza) mit verschiedenen Laub- und Nadelbäumen. Die meisten Pilze dieser Gattung sind essbar. Es fällt auf, dass die Fruchtkörper der Schnecklinge im Gegensatz zu Fruchtkörpern der meisten anderen Ständerpilze kaum von parasitischen Pilzen befallen werden. Ziel dieser Dissertation war es, die chemischen Grundlagen hierfür zu finden.

Aus Fruchtkörpern von *Hygrophorus latitabundus*, *H. olivaceoalbus*, *H. persoonii* und *H. pustulatus* konnten zwanzig neue Cyclopentenon-Derivate, die Hygrophorone genannt wurden, isoliert und deren Struktur mit Methoden der Kernresonanzspektroskopie (NMR) und der Massenspektrometrie (MS) aufgeklärt werden. Chemisch sind die Hygrophorone 2-Cyclopentenone mit Hydroxy- oder Acetoxy-Substituenten an C-4 und C-5. Außerdem befindet sich an C-5 eine ungeradzahlige Alkylkette (C₁₁, C₁₃, C₁₅ oder C₁₇), die an C-6 zusätzlich hydroxyliert, acetyliert oder oxidiert ist (siehe Abbildung 1.1). Zusätzlich konnten die neuen γ -Butyrolacton-Derivate 5-(*E*)-2-Hydroxytetradexyliden-5*H*-furan-2-on und 5-(*Z*)-2-Hydroxytetradexyliden-5*H*-furan-2-on isoliert werden.

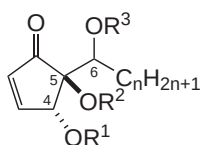
Die relative Konfiguration der Substituenten des Cyclopentenonringes konnte durch Messung des Nuclear Overhauser Effekts (NOE), durch Vergleich von Kopplungskonstanten sowie durch Umsetzung zum cyclischen Methylboronat bestimmt werden. Die Hygrophorone A (aus *H. persoonii*) und D (aus *H. latitabundus*) sind *trans* konfiguriert, die Hygrophorone B (aus *H. olivaceoalbus*) und C (aus *H. pustulatus*) sind *cis* konfiguriert.

Erste Aktivitätsstudien zeigen, dass die Hygrophorone antifungisch und antibakteriell wirksam sind. Die antibakterielle Wirkung ist gegen Gram-positive Bakterien stärker als gegen Gram-negative Bakterien. Die Hygrophorone sind selbst bei Methicillin, Ciprofloxacin und Vancomycin resistenten Bakterienstämmen hoch aktiv. Dabei sind polarere Verbindungen aktiver als unpolarere.

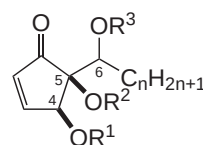
Da über das massenspektrometrische Verhalten von Cyclopentenon-Derivaten wenig bekannt ist, wurde das Fragmentierungsverhalten der Hygrophorone nach Elektrospray-Ionisierung untersucht. Obwohl die Substituentenfragmentierung (Abspaltung von Wasser, Essigsäure, Keten) die dominierende Fragmentierung ist, gibt es einige Schlüsselfragmente, welche die Einteilung der Hygrophorone in zwei Typen erlaubt: Typ I-Hygrophorone haben eine Hydroxy- oder Acetoxy-Gruppe an C-6, während Typ II-Hygrophorone an C-6 zum Keton oxidiert sind. Eine sehr interessante und ungewöhnliche Fragmentierung ist die Abspaltung von CO₂ nach negativer Ionisierung vom Pseudomolekülion [M-H]⁻, welche nur durch vorgelagerte Umlagerung eines Sauerstoffes einer Hydroxygruppe stattfinden kann.

Durch Kenntnis des Fragmentierungsverhaltens konnten mit Selected Reaction Monitoring (SRM, Messung spezifischer Fragmentierungsschritte) Hygrophorone auch in *H. agathosmus*, *H. nemoreus* und *H. poetarum* nachgewiesen werden.

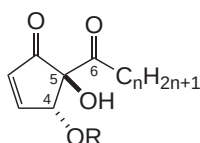
Die Biosynthese der Hygrophorone wurde durch Verimpfung von ^{13}C markiertem Acetat und ^{13}C markierter Glucose untersucht. Ein Einbau konnte nicht festgestellt werden. Parallel dazu wurde die Biosynthese von ähnlichen Verbindungen aus *Rigidoporus lineatus* untersucht. Hier konnte ein statistischer Einbau von ^{13}C markiertem Acetat beobachtet werden.

**Hygrophorone A**

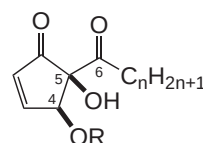
- 37:** $\text{R}^1 = \text{H}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{H}$ $n = 12$
32: $\text{R}^1 = \text{Ac}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{H}$ $n = 12$
33: $\text{R}^1 = \text{H}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{Ac}$ $n = 12$
31: $\text{R}^1 = \text{Ac}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{Ac}$ $n = 12$
39: $\text{R}^1 = \text{Ac}$ $\text{R}^2 = \text{Ac}$ $\text{R}^3 = \text{Ac}$ $n = 12$
35: $\text{R}^1 = \text{Ac}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{H}$ $n = 14$
36: $\text{R}^1 = \text{H}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{Ac}$ $n = 14$
34: $\text{R}^1 = \text{Ac}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{Ac}$ $n = 14$

**Hygrophorone B**

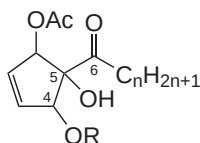
- 44:** $\text{R}^1 = \text{H}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{H}$ $n = 14$
46: $\text{R}^1 = \text{Ac}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{H}$ $n = 14$
47: $\text{R}^1 = \text{H}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{Ac}$ $n = 14$
48: $\text{R}^1 = \text{Ac}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{Ac}$ $n = 14$
49: $\text{R}^1 = \text{Ac}$ $\text{R}^2 = \text{Ac}$ $\text{R}^3 = \text{Ac}$ $n = 14$
45: $\text{R}^1 = \text{H}$ $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^3 = \text{H}$ $n = 16$

**Hygrophorone D**

- 53:** $\text{R} = \text{H}$ $n = 12$
52: $\text{R} = \text{Ac}$ $n = 12$
55: $\text{R} = \text{H}$ $n = 14$
54: $\text{R} = \text{Ac}$ $n = 14$

**Hygrophorone C**

- 51:** $\text{R} = \text{H}$ $n = 12$
50: $\text{R} = \text{Ac}$ $n = 12$

**Hygrophorone E**

- 60:** $\text{R} = \text{H}$ $n = 10$
57: $\text{R} = \text{Ac}$ $n = 10$
59: $\text{R} = \text{H}$ $n = 12$
56: $\text{R} = \text{Ac}$ $n = 12$
58: $\text{R} = \text{Ac}$ $n = 14$

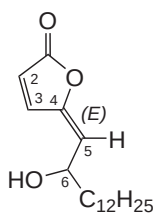
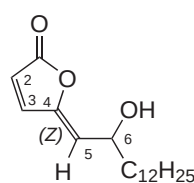
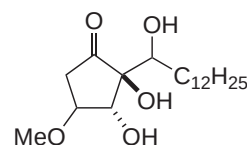
**Hygrophoron F¹²****40****Hygrophoron G¹²****41****39**

Abbildung 1.1. Aus verschiedenen *Hygrophorus*-Arten isolierte Hygrophorone und deren semisynthetische Derivate.

2. Summary

Fungi of the genus *Hygrophorus* are obligate symbionts (as mycorrhiza) with deciduous or coniferous trees. Most of the species in this genus are edible. Contrary to fruit bodies of most other basidiomycetes they are hardly ever attacked by parasitic fungi. The ecological defence observations prompted us to look for the underlying chemical principles.

Twenty new cyclopentenone derivatives (hygrophorones) were isolated from fruitbodies of *Hygrophorus latitabundus*, *H. olivaceoalbus*, *H. persoonii*, and *H. pustulatus*. Their structure was elucidated by NMR and MS. The hygrophorones are 2-cyclopentenones with hydroxy or acetoxy substituents at C-4 and C-5. Furthermore, there is an odd numbered alkyl chain (C₁₁, C₁₃, C₁₅ or C₁₇) at C-5 which is additionally hydroxylated, acetoxyated, or oxidized at C-6 (see figure 1.1). Additionally, two new γ -butyrolactone derivatives 5-(*E*)-2-hydroxytetradecylidene-5*H*-furan-2-one and 5-(*Z*)-2-hydroxytetradecylidene-5*H*-furan-2-one were isolated.

The relative configuration of the substituents of the cyclopentenone ring was assigned based on nuclear overhauser effects (NOE), comparison of coupling constants, and formation of cyclic methylboronates. Hygrophorones A (from *H. persoonii*) and hygrophorones D (from *H. latitabundus*) are *trans* configured, hygrophorones B (from *H. olivaceoalbus*) and hygrophorones C (from *H. pustulatus*) are *cis* configured.

First activity studies showed that hygrophorones have significant antibacterial and antifungal potential. The antibacterial effect against Gram positive bacteria is stronger than against Gram negative bacteria. The hygrophorones are even active against vancomycin, methicillin and ciprofloxacin resistant bacteria. Polar compounds are more active than nonpolar.

Mass spectral studies of cyclopentenone derivative are rarely described in literature. Therefore the mass spectral behaviour of hygrophorones after electrospray ionisation was investigated. Although the substituent fragmentations (loss of water, ketene, acetic acid) are the most dominating processes, there are some key ions allowing an assignment into two types: type I hygrophorones have a hydroxy- or an acetoxygroup at C-6, while type II hygrophorones are oxidized at C-6 to a ketone. An interesting and unusual fragmentation is the loss of CO₂ from the [M-H]⁻ ion which is only possible by a rearrangement including an oxygen of a hydroxyl function.

Knowledge of the MS-fragmentation behaviour of hygrophorones allowed to detect hygrophorones also in *H. agathosmus*, *H. nemoreus*, and *H. poetarum* by selected reaction monitoring (SRM).

The biosynthesis of the hygrophorones was investigated by inoculation of ¹³C marked acetate and ¹³C marked glucose. An incorporation was not observed. In parallel, the biosynthesis of similar compounds from *Rigidoporus lineatus* was investigated. A statistic incorporation of ¹³C marked acetate was observed here.

3. Einleitung

Alexander Fleming hat als Lazarettarzt im Ersten Weltkrieg erleben müssen, wie Soldaten, deren Verletzungen durchaus heilbar gewesen wären, an den Folgen von bakteriellen Wundinfektionen gestorben sind. Ihm waren die Hände gebunden, denn Antibiotika standen ihm nicht zur Verfügung. Bekannt waren nur Antiseptika wie Karbolsäure (Phenol), Iod oder Chlorwasser. Diese zerstören jedoch die Leukozyten, sie sind daher für die innere Anwendung nicht geeignet (Gießen 2003; Friedrich 2005). Deshalb suchte er nach antibakteriellen Substanzen und fand heraus, dass Nasensekret und Tränenflüssigkeit Bakterien auflösen können. Ursache ist das dort enthaltene Enzym Lysozym (Fleming 1922). Leider ist dessen Wirkspektrum nicht sehr groß. Während es die meisten für den Menschen harmlosen Bakterien schnell lysiert, zeigt es gegen gefährliche Krankheitserreger wie *B. typhosus*, *B. pestis* oder *Pneumococci* keinen Effekt (Fleming 1922; Fleming und Allison 1922).

Eine seiner *Staphylokokken*-Kulturen hatte eine Schimmelpilz-Fremdinfektion. Fleming (1929) machte hier die erstaunliche Beobachtung, dass im Umkreis dieses Pilzes die Bakterien ebenso lysiert waren. Es stellte sich heraus, dass der Schimmel *Penicillium notatum* eine Substanz bildet, die gegen eine Reihe von Bakterien, vor allem gegen Gram-positive Bakterien, tödlich wirkt. Er konnte zeigen, dass Penicillin, so nannte er diese Substanz, nicht toxisch gegen Kaninchen oder Mäuse ist. Leukozyten werden von Penicillin nicht geschädigt. Leider war es ihm nicht möglich, Penicillin als Reinsubstanz zu isolieren.

Auch Gerhard Domagk war auf der Suche nach antibakteriellen Substanzen. Dabei baute er auf Arbeiten von Robert Koch und Paul Ehrlich auf, die Bakterien mit Farbstoffen selektiv anfärben und so nachweisen konnten. Domagk postulierte, dass man so die Bakterien nicht nur sichtbar, sondern sogar gezielt zerstören kann. Daher ließ er tausende Farbstoffe synthetisieren und in seinem Labor auf antibakterielle Wirkung testen. Darunter war ein ziegelrotes Sulfonamid, das sich als sehr aktiv gegen Streptokokken erwies. Er nannte es

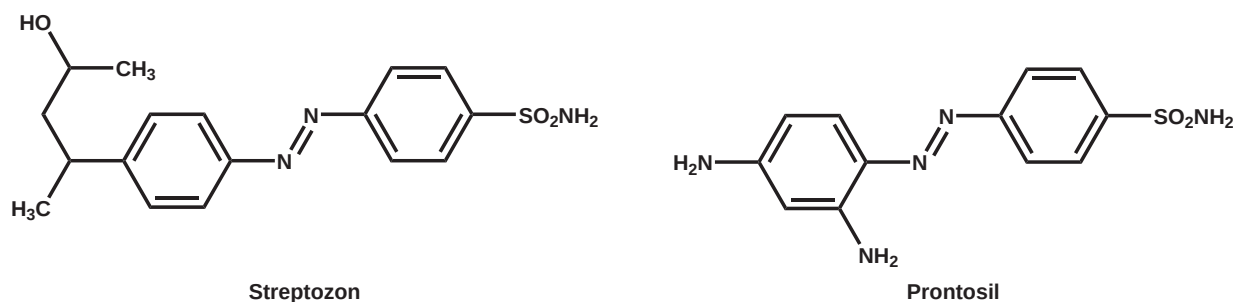


Abbildung 3.1. Die ersten von Domagk 1935 synthetisierten, antibakteriell wirksamen Sulfonamide.

folglich Streptozon. Die zu geringe Wasserlöslichkeit verhinderte aber dessen Einsatz als Medikament. Durch Modifikation konnte das Derivat Prontosil mit besseren Löslicheitseigenschaften erhalten werden (Abb. 3.1). Gemeinsam mit seinen Mitarbeitern zeigte er erfolgreich, dass man Bakterien nicht nur *in vitro*, sondern auch im menschlichen Körper bekämpfen kann (Domagk 1935). Dafür erhielt er 1939 den Medizin-Nobelpreis.

Nachdem die Entdeckung des Penicillins zunächst für einige Zeit unbeachtet blieb, gelang es 1938 Howard W. Florey, Ernst B. Chain und ihren Mitarbeitern es aus dem Kulturfiltrat von *Penicillium*-Kulturen in größeren Mengen zu isolieren und gegen Infektionskrankheiten, anfangs bei Tieren und ab 1941 bei Menschen, erfolgreich anzuwenden. Nachdem die technologischen Schwierigkeiten der Fermentation und Isolation überwunden worden waren, konnte Penicillin ab 1944 im größeren Maßstab hergestellt werden. Für ihre Arbeiten wurde deshalb 1945 der Medizin-Nobelpreis Fleming, Chain und Walter verliehen.

1943 isolierten Selman A. Waksman und seine Mitarbeiter das Aminoglykosid Streptomycin aus *Streptomyces griseus*. Es avancierte erfolgreich zum Heilmittel gegen die gefürchtete Tuberkulose. *Streptomyces*-Arten erwiesen sich als sehr potente Quelle neuer Antibiotika. So wurden in der Folge z. B. auch Chloramphenicol, Tetracyclin und Aureomycin aus *Streptomyces*-Arten isoliert.

Durch diese Entdeckungen änderte sich die Medizin und mit ihr die Naturstoffchemie dramatisch. Das Zeitalter der Antibiotika war geboren. Plötzlich hatte man Substanzen in den Händen, mit denen man wirksam gegen Bakterien vorgehen konnte. Bakterielle Infektionen, die bis dahin zu den Haupttodesursachen zählten, verloren ihre Schrecken.

Sehr schnell wurde die Euphorie über die neuen Wunderwaffen gedämpft, als man erkannte, dass sich die Bakterien wehren. Durch den vermehrten Einsatz von Antibiotika wurden viele Bakterienstämme resistent gegen die eingesetzten Substanzen. Das Wettrüsten hatte begonnen. Immer neue Wirkstoffe wurden gebraucht und gefunden. Die Bakterien hingegen fanden immer wieder eine Möglichkeit, Resistenzen auszubilden. Dieser Kampf gegen die Krankheitserreger ist endlos. Es ist nur eine Frage der Zeit, wann neu auf den Markt gebrachte Medikamente nicht mehr wirksam sind.

Der Bedarf an neuen Substanzen ist daher ungebrochen. Dabei ist die Suche nach Wirkstoffen, nicht nur die Suche nach Antibiotika, immer schwieriger und teurer geworden. Das liegt auch daran, dass die Ansprüche an neue Wirkstoffe gestiegen sind. Erstens sollen sie selbstverständlich besser sein als die etablierten. Das heißt, sie sollen in geringeren Dosen wirken, einen größeren therapeutischen Bereich haben und weniger Nebenwirkungen besitzen. Und zweitens müssen sie sich natürlich auch verkaufen können. Das heißt, die Kosten für den Wirkstoff bzw. für das Medikament dürfen nicht zu hoch sein.

Es gibt mehrere Wege, neue bioaktive Substanzen zu finden. Ein Weg ist die Synthese neuer Verbindungen - klassisch oder kombinatorisch. Wenn man nach neuen Leitstrukturen sucht, ist dieser Weg sehr steinig. Viele Verbindungen müssen synthetisiert und dann getestet werden.

Ein anderer Weg ist der Blick in die Natur. Über Jahrtausende kämpfen dort Arten um ihr Überleben. Viele Verteidigungsstrategien wurden entwickelt und evolutiv angepasst und verbessert. Manche Arten haben mechanische Schutzmechanismen wie Dornen, Stacheln

oder harte Panzer gebildet. Andere bevorzugten chemische Waffen. Letztere gilt es zu isolieren und für den Menschen nutzbar zu machen.

Statt tausende Verbindungen im Labor aufwendig zu synthetisieren, kann man der Natur die Synthese und der Evolution die Auslese der besten Strukturen überlassen. Wenn die Waffen der Natur isoliert und deren Struktur aufgeklärt worden sind, kann eine Synthese entworfen und Derivate oder Mimetika synthetisiert werden, die für eine Nutzung im oder am Menschen geeigneter sind als die ursprüngliche natürliche Leitsubstanz.

3.1. Inhaltstoffe von Pilzen

Neben Stoffen des Primärstoffwechsels wie Zucker, Fettsäuren, Aminosäuren oder Nukleinsäuren stellen Pflanzen und Pilze Sekundärstoffe her, deren Funktion über Energiehaushalt und Lebenserhaltung hinausgeht. Während sich der Primärstoffwechsel von Pilzen und Pflanzen kaum unterscheidet, gibt es doch Unterschiede im Sekundärstoffwechsel. Ergosterol zum Beispiel ist ein typisches Sterol, welches in Pilzen ubiquitär verbreitet ist, während es in Pflanzen bisher nicht nachgewiesen wurde. Dagegen fehlen typische pflanzliche Sterole wie Sitosterol oder Campesterol in Pilzen. Während die Biosynthese der Sterole, ausgehend von Acetyl-CoA über Isopentenylidiphosphat bis zur Bildung von Squalenepoxid, bei allen Eukaryonten gleich ist, unterscheidet sie sich bei Tieren, Pflanzen und Pilzen in weiteren Schritten. Es kommt zur Bildung von typisch pflanzlichen, tierischen oder pilzlichen Sterolen (Benveniste 1986; Benveniste 2004; Darnet und Rahier 2004).

Trotzdem kann man bei der Untersuchung von Naturstoffen immer wieder auch Überraschungen erleben. So konnten Radulovic et al. (2005) aus dem Erdwarzenpilz (*Thelephora terrestris*) die drei Pregnan-Steroide Stizophyllin, Terresteron A und B isolieren. Pregnan-Steroide sind typische Pflanzensteroiden. Bis dato wurden sie in Pilzen nicht nachgewiesen.

Während manche Substanzen ubiquitär verbreitet sind, gibt es auch Substanzen, die spezifisch für die Familie, sogar für die einzelne Art sind. So sind zum Beispiel innerhalb der Ordnung der Röhrlinge (*Boletales*) Hydroxypulvinsäuren weit verbreitet (Gill und Steglich 1987). Bei vielen Boleten verfärbt sich der Schwamm auf Druck oder nach Verletzung mehr oder weniger schnell blau. Dafür verantwortlich sind die Hydroxypulvinsäuren Xerocomsäure (1) bzw. Variegatsäure (2). Sie werden enzymatisch zu blau gefärbten Chinonmethid-Anionen oxidiert (siehe Abbildung 3.2). Die Biosynthese der Pulvinsäuren startet von zwei Molekülen Tyrosin (3), welche nach Desaminierung zu Atromentin (4) verknüpft werden (siehe Abbildung 3.3). Nach enzymatischer oxidativer Ringöffnung und Recyclisierung entsteht Atromentinsäure (5), die weiter zu Xerocom- (1) bzw. Variegatsäure (2) oxidiert wird (Gill und Steglich 1987).

Hydroxypulvinsäuren findet man aber nicht nur in „SchwammPilzen“ wie den Steinpilzen (*Boletus*), Rauhfußröhrlingen (*Leccinum*), Filzröhrlingen (*Xerocomus*) oder Schmiereröhrlingen (*Suillus*), sondern auch in einigen Lamellenpilzen wie den Kremplingen (*Paxillus*), Gelbfüßen (*Chroogomphus*) oder Schmierlingen (*Gomphidius*). Pulvinsäurederivate lassen sich auch in gastroiden Gattungen wie in Trüffeln (*Melanogaster*) oder Wurzeltrüffeln (*Rhizopogon*) nachweisen. (Gill und Steglich 1987, siehe Abbildung 3.3)

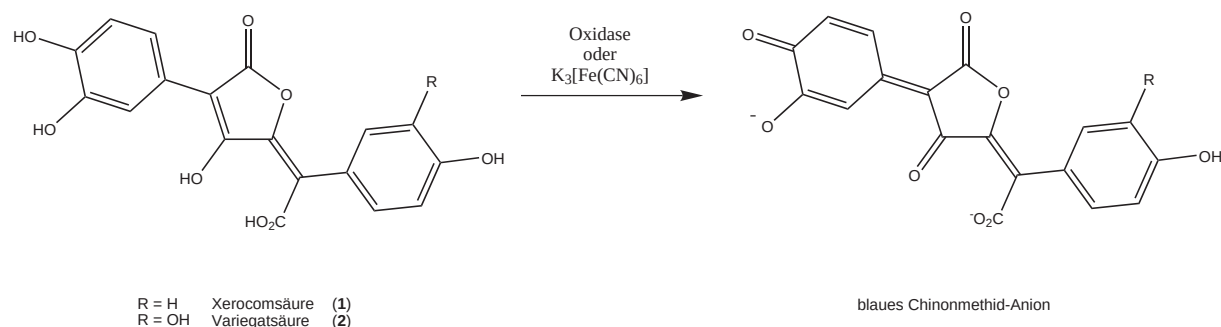


Abbildung 3.2. Die Pulvinsäuren Xerocomsäure (1) und Variegatsäure (2) sind verantwortlich für die Blaufärbung des Fruchtkörper der Röhrlinge nach Druck oder Verletzung.

Biosynthetisch und strukturell sehr ähnliche Substanzen sind die Diarylcyclopentanoide. So enthält z. B. der Kahle Krempling (*Paxillus involutus*) (–)-Involutin (6, Edwards et al. 1967; Edwards und Gill 1973) sowie als Begleitsubstanzen (–)-Chamonixin ((–)-7, Steglich et al. 1977; Feling 2000), Anhydroinvolutin (8, Gill und Steglich 1987) und (+)-Involuton (9, Antkowiak et al. 2003). Aus der Bläuenden Bergtrüffel (*Chamonixia caespitosa*) konnten Gyrocyenin (10), Gyroporin (11) sowie (+)-Chamonixin ((+)-7, Steglich et al. 1977), aus dem Erlengrübling (*Gyrodon lividus*) (–)-Chamonixin ((–)-7) und (–)-Involutin (6) isoliert werden (Besl et al. 1980). Gyrocyenin (10) und Gyroporin (11) waren schon aus dem Kornblumenröhrling (*Gyroporus cyanescens*) bekannt (Besl et al. 1973).

Die Biosynthese der hydroxylierten Diarylcyclopentenone ist noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Sicher scheint aber, dass auch hier Tyrosin der Vorläufer ist (Feling 2000; Gruber 2002). Aufgrund retrobiosynthetischer sowie biomimetischer Überlegungen können drei Wege diskutiert werden (siehe Abbildung 3.3, Gill und Steglich 1987; Gruber 2002; Feling 2000): Entweder Atromentinsäure (5) wird oxidativ zu Gyrocyenin (10) umgelagert oder Gyrocyenin (10) entsteht durch oxidative Ringverengung aus Atromentin (4) oder Gyrocyenin (10) wird direkt aus der dimeren p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (12) gebildet. Die anderen Diarylcyclopentanoide entstehen dann durch selektive Reduktion, Oxidation, Hydratisierung bzw. Dehydratisierung aus Gyrocyenin (10) (Feling 2000).

Eine weitere nah verwandte Substanzgruppe sind die Grevilline. Auch sie leiten sich von Tyrosin ab (siehe Abbildung 3.3). Sie entstehen durch Lactonisierung der dimeren p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (12). Die Grevilline A – D (13 – 16) unterscheiden sich im Hydroxylierungsmuster der aromatischen Ringe. Sie kommen vor allem in den Schmierröhrlingen (*Suillus*) vor (Besl und Bresinsky 1997; Gill und Steglich 1987).

Der Nachweis von Hydroxypulvinsäuren und Diarylcyclopentenoiden nicht nur in boletalen Gattungen, sondern auch in agaricalen und gastroiden Gattungen (Gill und Steglich 1987; Arnold et al. 1996) ließ eine enge Verwandtschaft dieser Gattungen mit den *Boletales* vermuten und führte zu einer Erweiterung dieser Ordnung (Bresinsky 1996). Schaut man sich z. B. die Lamellen der *Paxillus*-Arten unter diesem Aspekt genauer an, kann man die

Querrippen als Ursprung des Schwammgewebes deuten. Auch molekularbiologische Untersuchungen (Fischer et al. 1997; Bruns et al. 1998; Kretzer und Bruns 1999) legen eine verwandtschaftliche Beziehung von *Paxillus* zu den Boletales nahe.

Ein weiteres Beispiel für chemotaxonomische Marker sind substituierte Anthrachinone. Sie kommen in Fruchtkörpern der *Dermocyben* (Hautköpfe) vor und führten zur Eingliederung dieser Gattung als neue Untergattung in *Cortinarius* (Høiland 1983; Arnold et al. 1987).

3.2. Inhaltsstoffe in Pilzen der Gattung *Hygrophorus*

Bisher ist sehr wenig über sekundäre Inhaltsstoffe aus Pilzen der Gattung *Hygrophorus* berichtet worden. Das in Pilzen ubiquitär vorkommende Sterol Ergosterol und seine Derivate wurden in mehreren Hygrophoraceen nachgewiesen (Wakita 1977). In *Hygrophorus hypothejus* und *H. olivaceoalbus* ist Ergosterol das Hauptsterol. Weiterhin konnte Ergost-7-en-3 β -ol (Δ^7 -Campesterol) und Ergosta-7,22-dien-3 β -ol in geringeren Mengen nachgewiesen werden (Morrica et al. 1984). Im Gegensatz dazu ist das Hauptsterol in *H. lucorum* Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol. In geringeren Mengen wurde dort auch Ergosta-5,7-dien-3 β -ol, Ergosta-7,22-dien-3 β -ol und Ergost-7-en-3 β -ol nachgewiesen (Cordella et al. 1982). Aus dem Methanolextrakt von *H. discoideus* konnte Baćinović (2006) 5 α ,8 α -Ergosterolperoxid isolieren.

Einige Arten der Gattung *Hygrophorus* zeichnen sich durch einen intensiven Geruch aus, der beispielsweise für *H. cossus* ss. Mos. als „Geruch nach Weidenbohrraupen“ oder für *H. agathosmus* als „Bittermandel-Geruch“ beschrieben wird (Moser 1983). Im Wasserdampfdestillat von *H. cossus* konnten Steglich und Li (Fugmann 1985) größere Mengen Aceton, 2-Butanon und Phoron (2,6-Dimethyl-2,5-heptadien-4-on) nachweisen und als 2,4-Dintrophenylhydrazon isolieren. Duftstoffanalysen führten in *H. agathosmus* zum Nachweis von Benzaldehyd (Breheret et al. 1997a; Rapior et al. 1997; Talou et al. 2000), Phenylacetaldehyd, Benzylalkohol, Phenylacetonitril, 2-Phenylethanol (Rapior et al. 1997) sowie α -Pinen und β -Phellandren (Breheret et al. 1997b). Weiterhin wurde Tridecanal in größeren Mengen in *H. agathosmus* und *H. eburneus* nachgewiesen (Rapior et al. 1997). Indol und 3-Chlorindol sind die Ursache für den widerlichen Geruch von *Hygrophorus paupertinus* (Wood et al. 2003).

Untersuchungen an *Hygrophorus lucorum* (Fugmann 1985; Gill und Steglich 1987) führten zur Isolierung und Strukturaufklärung des neuen γ -Butyrolactons Hygrophorsäure (17). Dessen Biosynthese verläuft über eine oxidative Spaltung des aromatischen Ringes von Kaffeesäure (18) zwischen C-3 und C-4 und Recyclisierung zum Lacton (Abb. 3.5). Dies konnte durch Synthese und den Einbau von [α - 2 H]-Kaffeesäure in Hygrophorsäure in einem Feldversuch bewiesen werden. In einem Screening von 20 *Hygrophorus*-Arten (siehe Tabelle 3.1) konnte die Hygrophorsäure in zumindest 4 Arten sicher nachgewiesen werden. Parallel dazu wurde Muscaflavin (19) in 3 Arten der Gattung *Hygrophorus* nachgewiesen (Fugmann 1985, siehe Tabelle 3.1). Auffällig ist, dass Muscaflavin nicht in *H. lucorum* nachgewiesen werden konnte, obwohl dort Hygrophorsäure in größeren Mengen enthalten

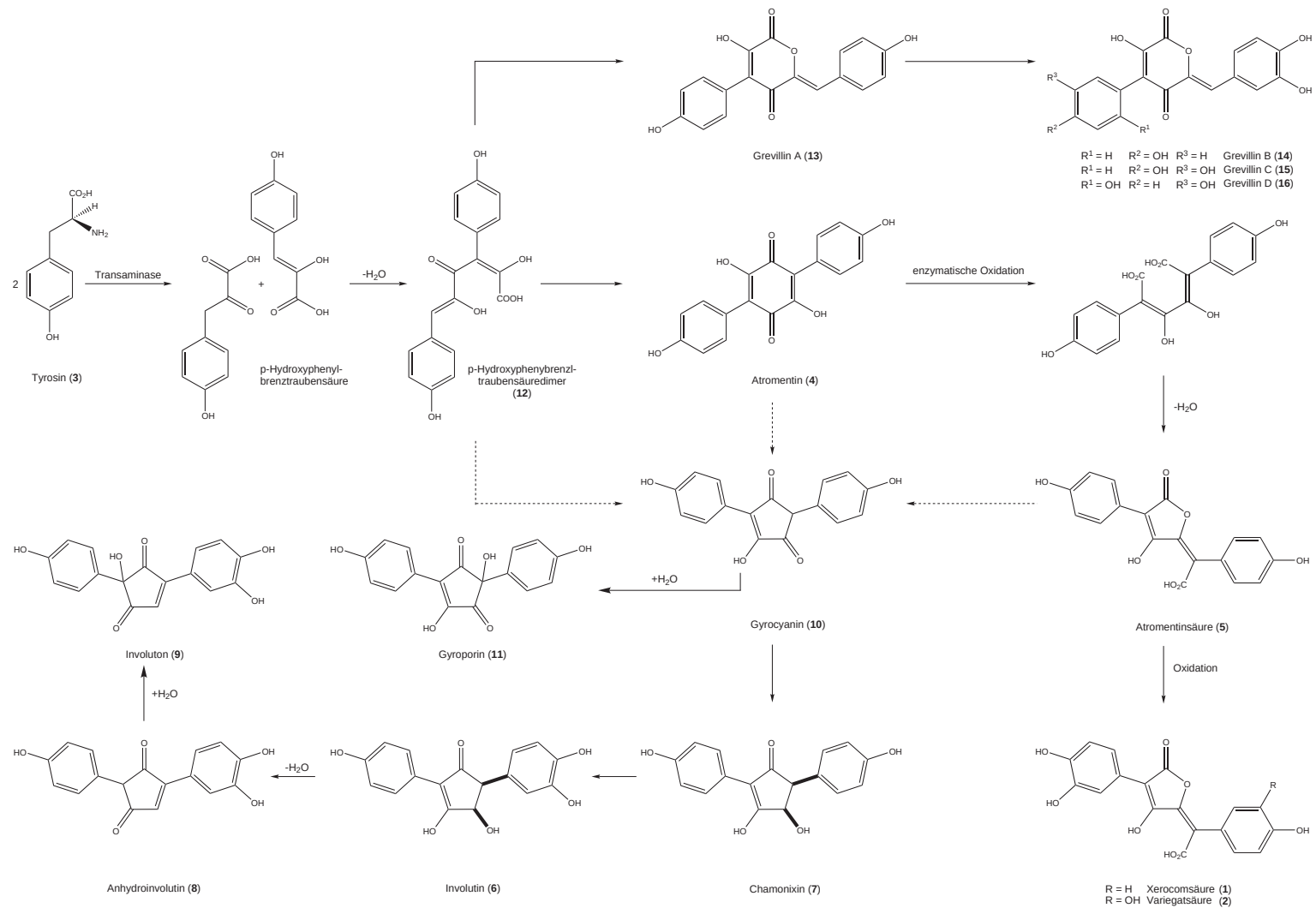


Abbildung 3.3. Biosynthese typischer *Boletus*-Metabolite wie Hydroxypulvinsäuren (1, 2), Diarylcyclopentenone (6, 7, 10) oder Grevilline (13 – 16) ausgehend von Tyrosin (3), verändert nach Feling 2000; Gruber 2002; Gill und Steglich 1987.

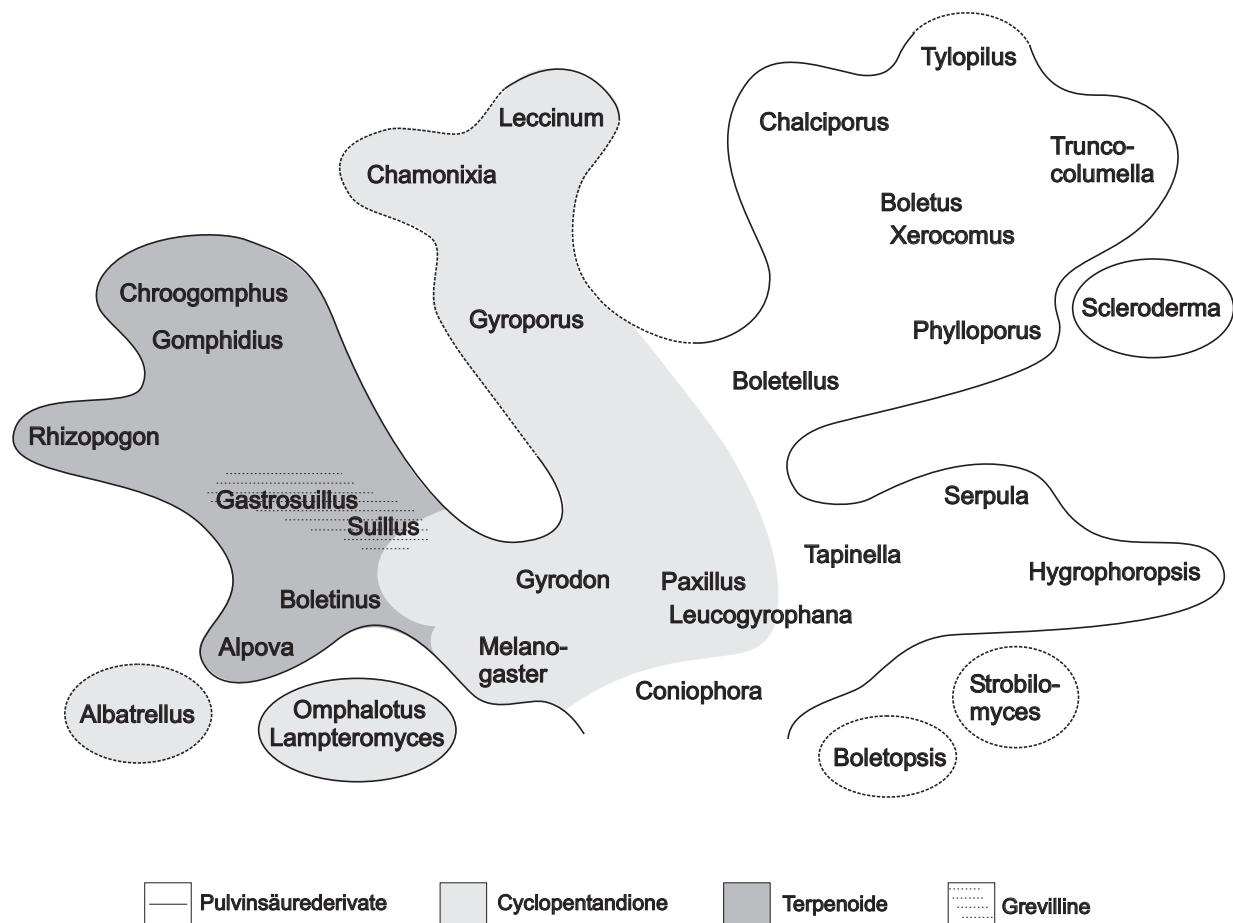


Abbildung 3.4. Verwandtschaftliche Beziehungen der Gattungen innerhalb der Ordnung Boletales bzw. zu Gattungen verwandter Ordnungen aufgrund übereinstimmender Pigmente (Bresinsky 1996).

ist. Muscaflavin (**19**) ist ein gelbes Pigment des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria*) (Döpp et al. 1971; Döpp und Musso 1973a; Döpp und Musso 1973b; Barth et al. 1981). Die Biosynthese von Muscaflavin verläuft über enzymatische Ringöffnung von L-DOPA (L-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-alanin, **20**) zwischen C-2 und C-3 und anschließender Cyclisierung (Abb. 3.5). Weitere Pigmente des Fliegenpilzes sind die orangefarbenen Musca-Aurine und das rotviolette Muscapurpurin (Musso 1979; Gill und Steglich 1987). Musca-Aurine sind Imine der Betalaminsäure (**21**) mit verschiedenen Aminosäuren (Strack et al. 2003). Auch Muscapurpurin soll ein Imin der Betalaminsäure sein (Gill und Steglich 1987; Musso 1979). Die Biosynthese der Betalaminsäure verläuft auch über L-DOPA (**20**), wobei hier der aromatische Ring zwischen C-4 und C-5 enzymatisch gespalten wird (Mueller et al. 1997; Terradas und Wyler 1991).

Auch aus *Hygrocyben* (Saftlinge), die in älterer Literatur mitunter in *Hygrophorus* eingeordnet wurden, konnte Muscaflavin isoliert (Ardenne et al. 1974; Fugmann 1985) bzw. chro-

Tabelle 3.1. Vorkommen von Hygrophorsäure und Muscaflavin in der Gattung *Hygrophorus* (verändert nach Fugmann 1985)

Art	Hygrophorsäure (17)	Muscaflavin (19)
<i>H. agathosmus</i>	–	n.u.
<i>H. atramentosus</i>	–	n.u.
<i>H. aureus</i>	+	+
<i>H. chrysodon</i>	(+)	n.u.
<i>H. cossus</i>	–	n.u.
<i>H. dichrous</i>	–	n.u.
<i>H. eburneus</i>	–	n.u.
<i>H. erubescens</i>	–	n.u.
<i>H. fuscoalbus</i>	–	n.u.
<i>H. gliocyclus</i>	–	n.u.
<i>H. hypothejus</i>	++	++
<i>H. leucophaeus</i>	–	n.u.
<i>H. lucorum</i>	+++	–
<i>H. marzuolus</i>	–	n.u.
<i>H. nemoreus</i>	(+)	n.u.
<i>H. olivaceoalbus</i>	–	n.u.
<i>H. poetarum</i>	–	n.u.
<i>H. pudorinus</i>	–	n.u.
<i>H. russula</i>	–	n.u.
<i>H. speciosus</i>	++	++

+++ = viel isoliert, ++ = isoliert, + = DC-Nachweis, (+) = unsicher, – = nicht nachgewiesen; n.u. = nicht untersucht

matographisch nachgewiesen (Kronawitter 1984; Bresinsky und Kronawitter 1986) werden. Betalaminsäure hingegen konnte in den Saftlingen nicht nachgewiesen werden (Ardenne et al. 1974). Offenbar fehlt den Hygrocyben eine 4,5-Dioxygenase. Es scheint daher die Frage interessant, ob in *Hygrophorus*-Arten Betalaminsäure oder deren Derivate nachweisbar sind.

Im Rahmen chemischer und ökologischer Untersuchungen konnte bei Applizierung von Rohextrakten mit unterschiedlicher Polarität aus verschiedenen *Hygrophorus*-Arten die Beeinflussung der Larvalentwicklung von *Drosophila melanogaster* gezeigt werden. Zudem wiesen einzelne Rohextrakte eine antifungische Aktivität gegen *Cladosporium herbarum* sowie antibakterielle Aktivität gegen *Escherichia coli*, *Pseudomonas acidovorans*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* auf (Haselberger 1986).

Aus *Hygrophorus eburneus* konnten Teichert et al. (2005) acht ungewöhnliche Fettsäuren (22 – 29) isolieren, die durch eine γ -Oxoacrylat-Teilstruktur gekennzeichnet sind (siehe auch Teichert 2004). Sie sind bioaktiv gegen den phytopathogenen Pilz *Cladosporium cucumerinum*. Außerdem zeigen sie in ersten Versuchen antibakterielle Eigenschaften gegen

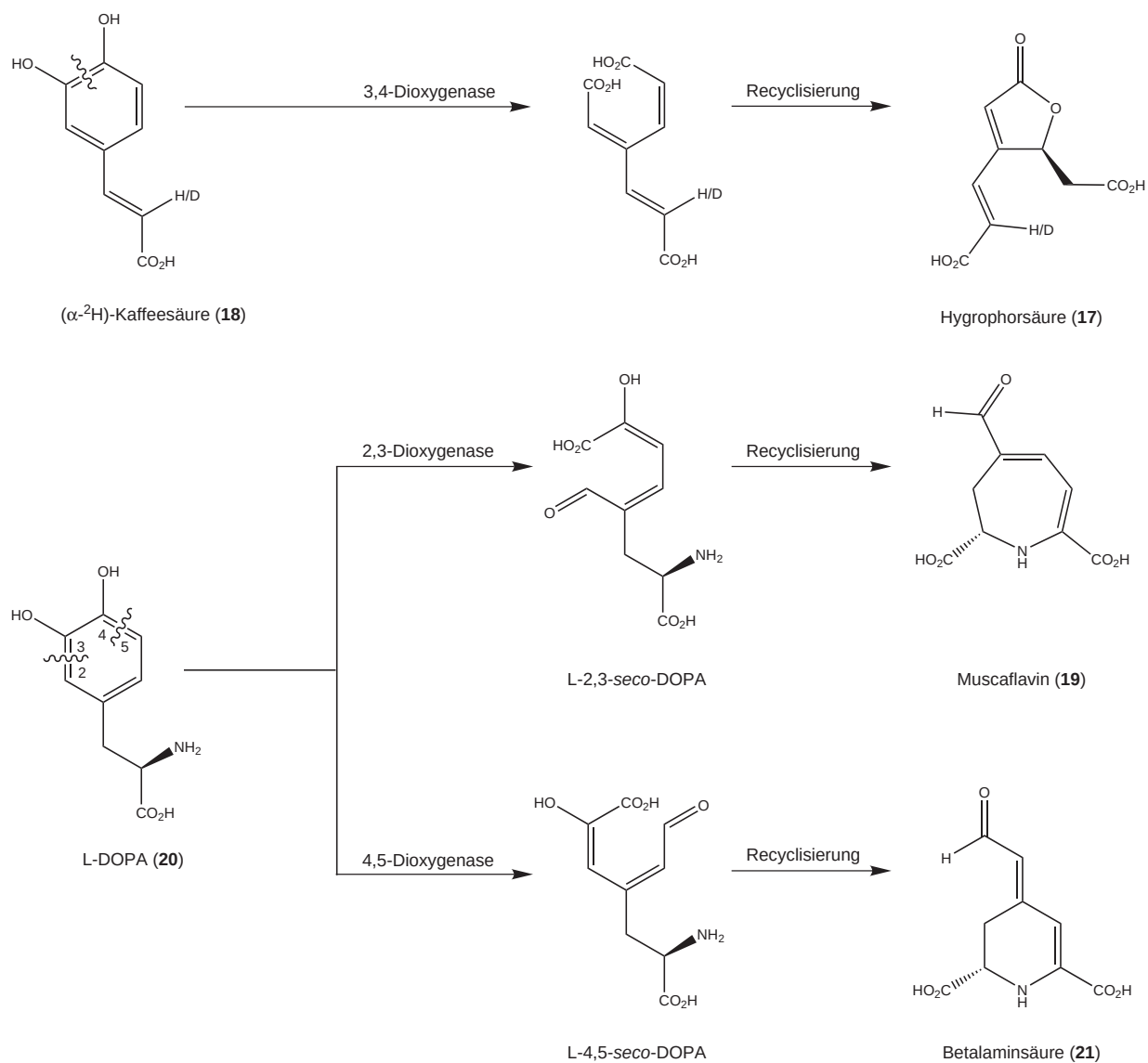


Abbildung 3.5. Biosynthese von Hygrophorsäure (**17**) aus Kaffeesäure (**18**) (nach Gill und Steglich 1987) sowie von Muscaflavin (**19**) und Betalaminsäure (**21**) aus L-DOPA (**20**) (nach Strack et al. 2003).

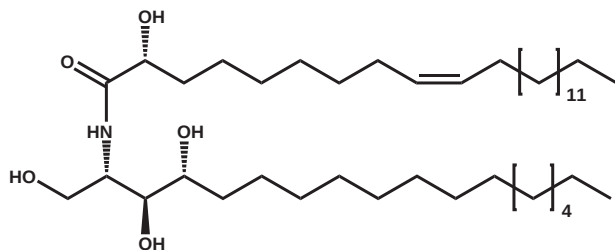


Abbildung 3.6. Hygrophamid (**30**) aus *H. eburnesus* [sic!] (Qu et al. 2004)

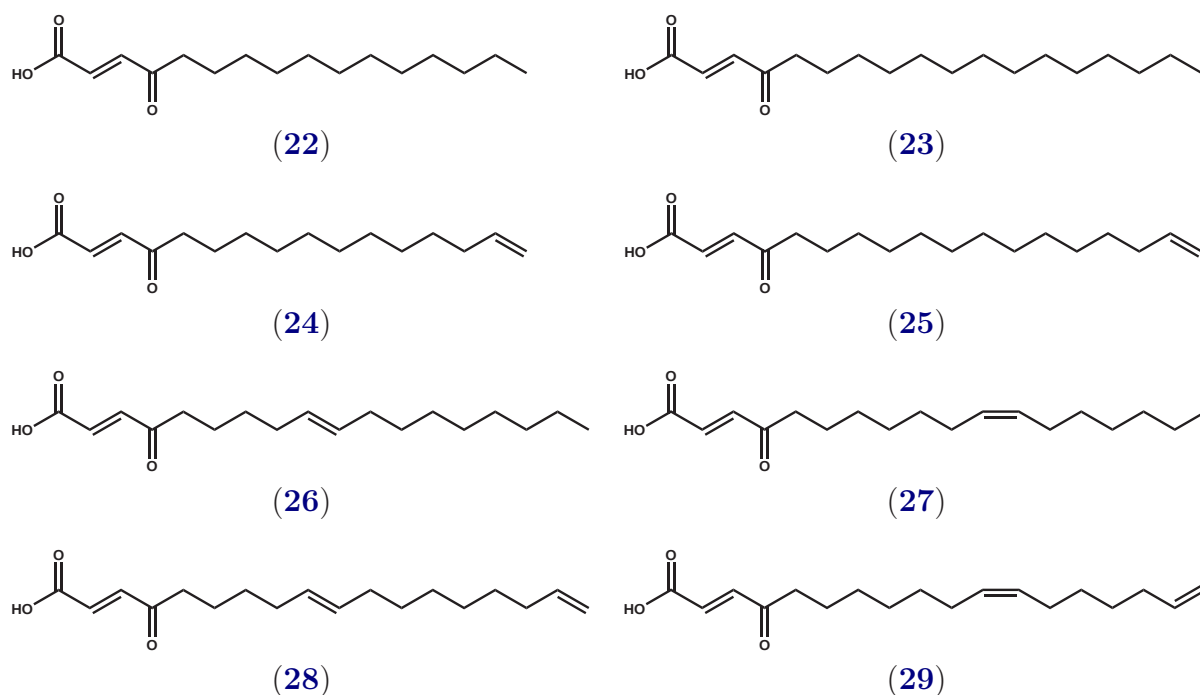


Abbildung 3.7. Ungewöhnliche Fettsäuren mit γ -Oxoacrylat-Teilstruktur, die aus *H. eburneus* isoliert wurden (Teichert et al. 2005).

die Leuchtbakterien *Vibrio fischeri*. Aus *H. eburneus* (sic!, gemeint ist wohl *H. eburneus*) konnten Qu et al. (2004) das neue Ceramid Hygrophamid (30) isolieren.

Wie *Hygrophorus* sind auch die Nachbararten *Hygrocybe* (Saftlinge), *Camarophyllus* (Ellerlinge) sowie *Dermoloma* (Samtritterlinge) bisher kaum mykochemisch untersucht worden. Neben dem Vorkommen von Ergosterol und deren Derivaten (Yokokawa und Mitsuhashi 1981) sowie dem oben erwähnten Muscaflavin und deren Vorläufern ist der Nachweis von Psilocybin und Psilocin (Gartz 1986) in *Hygrocyben* beschrieben worden.

Ziel dieser Dissertation war es, aus ausgesuchten Arten der Gattung *Hygrophorus* neue, bioaktive Substanzen zu isolieren und deren Struktur aufzuklären.

4. Allgemeiner Teil

4.1. Die Gattung der Schnecklinge – *Hygrophorus*

Die Gattung *Hygrophorus* Fr. (Schnecklinge) zählt zur Ordnung Agaricales (Ständerpilze). Zur Einordnung in Familien gibt es unterschiedliche taxonomische Ansätze. Moser (1983) ordnet *Hygrophorus* (Schnecklinge) gemeinsam mit den Gattungen *Camarophyllus* (Ellerlinge) und *Hygrocybe* (Saftlinge) in die Familie *Hygrophoraceae* (Wachsblatt- oder Schnecklingsartige) ein. Die Abgrenzung zur Familie *Tricholomataceae* (Ritterlingsartige) ist strittig. Bas (1990, 1998) betrachtet sie nur noch als Tribus *Hygrophoreae* der Familie *Tricholomataceae* und ordnet dort *Hygrophorus* als einzige Gattung ein. Die Gattungen *Camarophyllus* und *Hygrocybe* ordnet er dem Tribus *Hygrocybeae* der Familie *Tricholomataceae* zu. Arnolds (1995) stellt auch die Gattung *Dermoloma* (Samtritterlinge) in diesen Tribus.

Der Name *Hygrophorus* setzt sich aus den griechischen Wörtern „hygro“ für feucht und „phorus“ für tragend, also „Feuchtigkeitsträger“ zusammen. Der deutsche Name Schnecklinge beschreibt dies treffend: meist ist der Hut, oft auch der gesamte Fruchtkörper mit einer kräftigen, klebrigen Schleimschicht überzogen. Der englische Name „waxy caps“, „wax caps“ oder „wood wax“ beschreibt die sich wachsartig anführenden Lamellen. Diese sind immer dicklich, entfernt stehend, angewachsen bis herablaufend. Neben den namensgebenden Merkmalen haben alle Schnecklinge weißes Sporenpulver. Die Farbe der Fruchtkörper variiert von weiß über gelb, orange, bis zu dunklen Brauntönen. Sie ist aber im Gegensatz zu den *Hygrocyben* nie leuchtend. Mikroskopische Merkmale der Gattung fassen Gminder und Kriegsteiner (2001) wie folgt zusammen. Die Epikutis (Huthaut) besteht aus radial verlaufenden Hyphen, die Lamellentrama ist bilateral, Cystiden sind selten und unauffällig, die Basidien sind vier-, seltener zweisporig. Die Arten sind sich mikroskopisch in Sporengröße und Form sehr ähnlich (Bon 1992).

Die Schnecklinge sind Ektomykorrhizabildner mit verschiedenen Laub- und Nadelbäumen, wobei sich die einzelnen Arten stark spezialisiert haben. Auffällig ist, dass sie kaum von Insektenlarven oder parasitären Pilzen befallen werden. Die Arten in *Hygrophorus* sind oft nur schwer voneinander abzugrenzen, wobei Arten, sogar die Gattungsgrenzen selbst, sehr unterschiedlich interpretiert werden (vgl. Bas 1990; Bon 1992; Bresinsky und Huber 1967; Moser 1983; Hesler und Smith 1963). Die Gattung umfasst, der Großpilzflora von Europa folgend (Bon 1992), etwa 60 Arten mit zahlreichen Unterarten. Laut Gminder und Kriegsteiner (2001) gibt es 40 europäische Arten, von denen in Deutschland ca. 35 Arten vorkommen.

Tabelle 4.1. Einteilung der *Hygrophorus*-Arten in **Sektionen** und Subsektionen nach [Arnolds \(1990\)](#) mit einem Bild eines typischen Vertreters der Sektion.

Hygrophorus	Pudorini	Discoidei	Olivaceoumbrini
			
<i>H. eburneus</i>	<i>H. nemoreus</i>	<i>H. discoideus</i>	<i>H. persoonii</i>
Fkp: weiß, ± schleimig	Fkp: rötlich, trocken	Fkp: gelb-bräunlich, schleimig	Fkp: dunkelbraun, schleimig
Chrysodonti	Erubescentes	<i>H. discoideus</i>	Olivaceoumbrini
<i>H. chrysodon</i>	<i>H. erubescens</i>	<i>H. unicolor</i>	<i>H. olivaceoalbus</i>
<i>H. flavodiscus</i>	<i>H. russula</i>	<i>H. carpini</i>	<i>H. persoonii</i>
	<i>H. capreolarius</i> ^a	<i>H. arbustivus</i>	<i>H. latitabundus</i>
Pallidini		<i>H. lucorum</i>	<i>H. mesotephros</i>
<i>H. penarius</i>	Pudorini	<i>H. hypothejus</i>	
	<i>H. poetarum</i>		Tephroleuci
Hygrophorus	<i>H. nemoreus</i>		<i>H. pustulatus</i>
<i>H. eburneus</i>	<i>H. pudorinus</i>		<i>H. agathosmus</i>
<i>H. discoxanthus</i>			
<i>H. chrysaspis</i>			
<i>H. hedrychii</i>			
<i>H. gliocyclus</i>			

^a *H. capreolarius* ist in der Flora Agaricina Neerlandica nicht geführt. Fkp - Fruchtkörper

Die vorliegende Arbeit folgt in der Systematik und Taxonomie der Flora Agaricina Neerlandica. [Arnolds \(1990\)](#) unterteilt dort die Gattung *Hygrophorus* in Anlehnung an [Singer \(1986\)](#) in vier Sektionen mit mehreren Subsektionen (siehe Tabelle 4.1). Diese Einteilung in Sektionen basiert hauptsächlich auf der Farbe der Fruchtkörper bzw. der Lamellen.

4.2. Übersicht über Farbreaktionen

Traditionell werden zum Bestimmen von Pilzen auch verschiedene einfache Reagenzien benutzt, die nach Applikation auf den Fruchtkörper bestimmte Farbreaktionen hervorrufen. Dazu zählen beispielsweise Natronlauge, Kalilauge, Ammoniak und Salzsäure, Schwefelsäure sowie Lösungen von Eisensulfat, Phenol, Fuchsin, Kresolblau, Guajak oder Sulfovanillin. *Hygrophorus*-Arten zeigen vor allem mit Kali- bzw. Natronlauge, Ammoniak, Sulfovanillin und Guajak Farbreaktionen (siehe Tabelle 4.2 sowie A.1 im Anhang). Guajak, auch



Abbildung 4.1. *Hygrophorus pustulatus* bevor (links) und nachdem (rechts) der Stiel mit KOH beträufelt wurde.

Guaiac oder Guajakharz genannt, ist das Harz des Guajakbaums *Guajacum officinale*. Die ethanolische Lösung ist ein empfindliches Reagenz auf Oxidasen und Peroxidasen. Dabei wird die Guajaconsäure, ein Hauptbestandteil des Guajaks, zu „Guajakblau“ oxidiert. In der Medizin wird es als Nachweisreagenz für okkultes Blut verwendet, wobei dabei die Pseudoperoxidase-Aktivität des Hämoglobins ausgenutzt wird (Heyn 2004). Die meisten Pilze zeigen diese Oxidationsreaktion, so dass vor allem eine negative Reaktion systematisch interessant erscheint. Bon (1992) beschreibt, dass die Guajak-Reaktion wenig aussagekräftig ist, da das Ergebnis oft zufällig ist. Ein wichtiges taxonomisches Bestimmungsmerkmal für Schnecklinge hingegen ist die Reaktion mit 30%iger wässriger Natrium- bzw. Kaliumhydroxidlösung. Bei einigen *Hygrophorus*-Arten verfärbt sich der Stiel gelb bis braun, nachdem er mit Hydroxidlösung beträufelt wurde. Die stoffliche Grundlage dazu war bisher unbekannt.

Tabelle 4.2. Makrochemische Farbreaktionen nach Applikation von NaOH oder KOH

Pilz	Farbreaktion mit KOH bzw. NaOH	Literatur
<i>H. chrysaspis</i>	frisches Fruchtfleisch: gelbbraun	Meixner (1975)
<i>H. chrysodon</i>	Fruchtkörper: gilbend, dann orange-rotbraun Fruchtfleisch: gelb	Bon (1992) Meixner (1975)
<i>H. discoxanthus</i>	Fruchtkörper: gilbend, dann orange-rotbraun Hut KOH orange-braun	Bon (1992) Bas (1990)
<i>H. eburneus</i>	Stielbasis: fleischfarben – orange Fruchtkörper: gilbend, dann orange-rotbraun	Moser (1983) Bon (1992)
<i>H. erubescens</i>	Fruchtkörper: grünlich-gelb Fruchtfleisch: gelblich Huthaut: leicht grünlich gelblich	Bon (1992) Meixner (1975) Meixner (1975)
<i>H. gliocyclus</i>	Fruchtkörper: gilbend, dann orange-rotbraun	Bon (1992)
<i>H. hedrychii</i>	Hut, Stielbasis: blaß ocker	Bas (1990)
<i>H. latitabundus</i>	Fruchtkörper: gelb – ocker	Bas (1990)
<i>H. nemoreus</i>	Huthaut KOH bleicht	Meixner (1975)
<i>H. olivaceoalbus</i>	Stielrinde: sofort hellgelb Fleisch: rot-orange	Meixner (1975) Candusso (1997)
<i>H. penarius</i>	Stiel: gilbend, dann orange-rotbraun Stielbasis: KOH gelb, orange Fruchtfleisch: gelb	Bon (1992) Bas (1990) Meixner (1975)
<i>H. persoonii</i>	Hut: gelb-braun Stielbasis: KOH orange-rot	Bas (1990) Bas (1990)
<i>H. pudorinus</i>	Fruchtkörper: orange-rot	Bon (1992)
<i>H. russula</i>	Fruchtfleisch: KOH sofort grünlich-gelb	Meixner (1975)

5. Spezieller Teil

5.1. *Hygrophorus personii* - Olivgestiefelter Schneckling



Abbildung 5.1. *Hygrophorus personii* - Olivgestiefelter Schneckling.

Hygrophorus personii Arnolds, der Olivgestiefelte Schneckling, ist ein Pilz, der auf kalkhaltigen Böden wächst. Man findet ihn im späten Herbst vor allem unter Eichen. Er wächst einzeln bis gesellig. Der gesamte Pilz ist mit einer kräftigen, klebrigen, glänzenden Schleimschicht überzogen. Der Hut ist 3 – 8 cm breit, fuchsigbraun bis dunkelbraun. Junge Pilze haben einen fast kugelförmigen Hut mit umgekrempeltem Rand, ältere Exemplare sind gewölbt bis gebuckelt. Die breiten, entfernt stehenden, wachsigen Lamellen sind weiß und herablaufend. Deren Farbe kann im Alter leicht grauen und einen gelblich-grünen Stich bekommen. Der Stiel ist 4 – 12 cm lang und hat einen Durchmesser von 0.5 – 1.5 cm, ist zylinderförmig und zur Basis hin zugespitzt. Er hat am Hutansatz eine 1 cm lange, weiße, ringförmige Zone. Der Stiel ist gelblich – olivbraun genattert und mit olivbraunen Stielschuppen besetzt. Die Stielspitze ist weiß, die Basis wurzelnd. Das Fleisch ist weiß und geruchlos. Der gesamte Stiel verfärbt sich mit KOH-Lösung kräftig orange bis orangebraun.

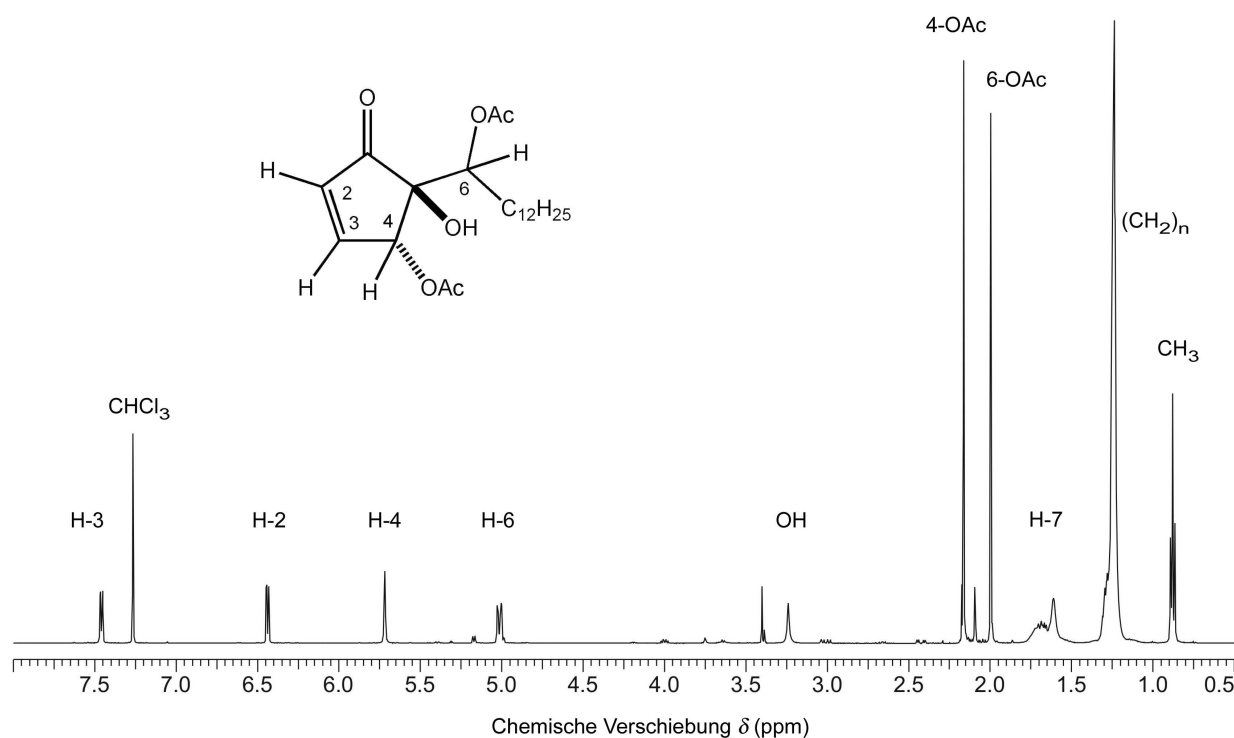


Abbildung 5.2. ^1H -NMR-Spektrum von 4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron A¹² (**31**)

Durch Behandeln der Fruchtkörper mit Petrolether lässt sich ein Extrakt erhalten, der sich im Alkalischen gelb bis braun verfärbt. Nach Grobfraktionierung mittels Festphasenextraktion und Feinreinigung mit HPLC konnten sechs neue Verbindungen (**31** – **36**) gewonnen werden. Sie wurden nach der Gattung, aus der sie isoliert wurden, Hygrophorone genannt. Die Hygrophorone lassen sich auf einer Dünnschichtplatte sehr einfach detektieren. Dazu wird diese in eine Natrium- oder Kaliumhydroxidlösung (vorzugsweise in eine methanolische) getaucht, oder man erhitzt sie im Heißluftstrom. Letztere Methode ist einfacher und empfindlicher. Die zunächst farblosen Hygrophorone verfärben sich dann gelb bis braun. Gleichzeitig ist im UV-Licht (366 nm) das Auftreten einer gelb- bis ockerfarbenen Fluoreszenz zu beobachten.

Das positive ESI-MS-Spektrum (siehe auch Abschnitt 5.6, Seite 39) von 4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron A¹² (**31**) enthält neben dem protonierten Molekülion bei m/z 397 auch Peaks bei m/z 337 $[\text{M}+\text{H}-\text{AcOH}]^+$ und 277 $[\text{M}+\text{H}-2\text{AcOH}]^+$. Sie zeigen die Existenz von zwei Acetat-Gruppen, welche auch mittels ^1H -NMR [δ ^1H = 2.136 (3H, s), 1.996 (3H, s)] und ^{13}C -NMR (δ ^{13}C = 170.5, 20.9; 169.9, 20.7) zu beobachten sind. Ein Peak bei δ ^{13}C = 202.3 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum weist auf das Vorhandensein einer Carbonylgruppe hin. Signale bei δ ^{13}C = 134.4 ppm und 156.8 ppm gehören zu einer C-C-Doppelbindung. HR-FT-ICR-MS-Messungen belegen die Summenformel $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_6$, aus welcher sich fünf Doppelbindungsäquivalente berechnen lassen. Summiert man die Doppelbindungen der beiden Acetatgruppen sowie die der C-O- bzw. der C-C-Doppelbindung, verbleibt ein Äquiva-

lent, welches auf einen Ringschluss hinweist. Durch Interpretation des HMBC-Spektrums kommt man zu der Schlussfolgerung, dass ein Fünfring durch die C-C-Doppelbindung, das C-Atom der Carbonylgruppe sowie zweier weiterer C-Atome ($\delta^{13}\text{C} = 79.7$ ppm und 81.4 ppm) gebildet wird. Außerdem zeigt das HMBC-Spektrum, dass die Acetatgruppen an C-4 bzw. an C-6 geknüpft sind. Des Weiteren ist eine lange, unverzweigte, gesättigte Alkylkette an C-6 gebunden. Korrelationspeaks im HMBC-Spektrum zwischen dem Proton der OH-Gruppe und C-1, C-4 sowie C-5 zeigen, dass sich die OH-Gruppe an C-5 befindet. HMBC-Korrelationen zwischen H-6 und C-1, C-4 sowie C-5 bestätigen die Verknüpfung von C-6 an C-5. COSY und NOESY-Messungen stehen im Einklang mit der vorgeschlagenen Struktur. 4,6-Di-O-acetylhygrophoron A¹² (**31**) ist demnach ein an C-4 und C-5 hydroxyliertes Cyclopent-2-enon mit einer 1-Hydroxytridecanyl-Seitenkette an C-5. Die Hydroxygruppen an C-4 und C-6 sind mit Essigsäure verestert. **31** besitzt an C-4, C-5 und C-6 stereogene Zentren, deren relative Anordnung zumindest teilweise aufgeklärt werden konnte. Die Acetylgruppe an C-4 steht *trans* zur OH-Gruppe an C-5 (siehe auch Abschnitt 5.5.1, Seite 36). Mittels HPLC an verschiedenen chiralen Säulen (Chiralpak AD-H, Chiralpak AS-H, Chiralcel OH-H, Chiralcel OD-H) konnte für **31** nur ein Peak erhalten werden. Vermutlich handelt sich daher bei **31** nicht um ein Enantiomeregemisch.

Tabelle 5.1. Chemische Verschiebungen, Kopplungskonstanten, COSY-, HMBC- und NOESY-Korrelationen von 4,6-Acetylhygrophoron A¹² (**31**).

H-Atom	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	mult. J (Hz)	COSY zu H	HMBC zu C	NOESY zu H
2	6.441	<i>dd</i> (6.2/1.8)	3, 4	1, 3, 4, 5	3
3	7.462	<i>dd</i> (6.2/2.1)	2, 4	1, 2, 4, 5	2, 4
4 H	5.721	<i>dd</i> (2.1/1.8)	2, 3	2, 3, 4 (C=O), 5	3, 5
4 -O ₂ C-CH ₃	2.136	<i>s</i>		4, 4 (C=O)	
5 OH	3.247	<i>s</i>		1, 4, 5	4, 6
6 H	5.017	<i>dd</i> (10.2/2.6)	7	1, 4, 5, 6 (C=O), 7, 8	5, 7, 8
6 -O ₂ C-CH ₃	1.996	<i>s</i>		6, 6 (C=O)	
7	1.7	<i>m</i>	6		6, 5, 8
18	0.880	<i>t</i> (7.0)	17	16, 17, (18)	

Die ¹H-NMR-Spektren von 4-O-Acetylhygrophoron A¹² (**32**) und 6-O-Acetylhygrophoron A¹² (**33**) ähneln dem Spektrum von **31** sehr. Während sich die chemischen Verschiebungen und die Kopplungsmuster von H-2 und H-3 in **31**, **32** und **33** fast gleichen, ist das Signal für H-6 in **32** [$\delta^1\text{H} = 3.725$ ppm (¹H, *dt*, $J = 9.6$ Hz, $J = 3.0$ Hz)] bzw. H-4 in **33** [$\delta^1\text{H} = 4.835$ ppm (¹H, *ddd*, $J = 6.7$ Hz, $J = 2.0$ Hz, $J = 1.8$ Hz)] hochfeldverschoben und zeigt eine zusätzliche Kopplung. Außerdem ist das Signal einer Acetatgruppe durch ein Signal für eine OH-Gruppe [**32**: $\delta^1\text{H} = 2.39$ ppm (¹H, *br d*, $J = 3.0$ Hz), **33**: $\delta^1\text{H} = 3.012$ ppm (¹H, *d*, $J = 6.7$ Hz)] ersetzt. Die Summenformel C₂₀H₃₄O₅ wurde durch ESI-FT-ICR-MS-Messung ermittelt. Sie bestätigt, dass **32** und **33** monodeacetylierte Derivate von **31** sind. Während die Acetoxygruppe in **32** an C-4 verknüpft ist, befindet sich die Acetoxygruppe in **33** an C-6 (siehe Abb. 5.3).

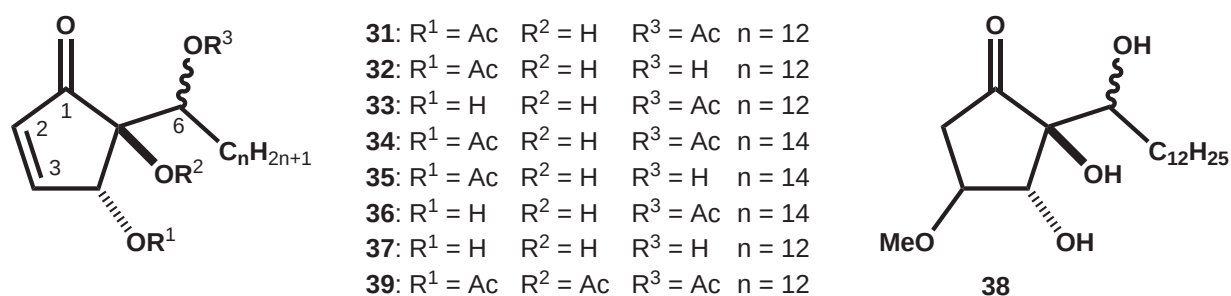


Abbildung 5.3. Hygrophorone A isoliert aus *Hygrophorus persoonii* (**31** – **36**) und semisynthetische Derivate davon (**37** – **39**).

4,6-Di-*O*-Acetylhygrophoron A¹⁴ (**34**), 4-*O*-Acetylhygrophoron A¹⁴ (**35**) und 6-*O*-Acetylhygrophoron A¹⁴ (**36**) sind Homologe von **31**, **32** und **33** mit einer zusätzlichen Ethyleneinheit in der Alkyl-Seitenkette. Durch vorsichtiges Verseifen von **31** mit verdünnter methanolischer Natronlauge ist es möglich sowohl die monoacetylierten Derivate **32** und **33**, als auch Hygrophoron A¹² (**37**) mit drei freien OH-Gruppen sowie dessen Methanoladdukt (**38**) zu erhalten. Die peracetylierte Verbindung 4,5,6-Tri-*O*-acetylhygrophoron A¹² (**39**) konnte durch Acetylierung von **31** mit einem Überschuss von Essigsäureanhydrid in Pyridin erhalten werden.

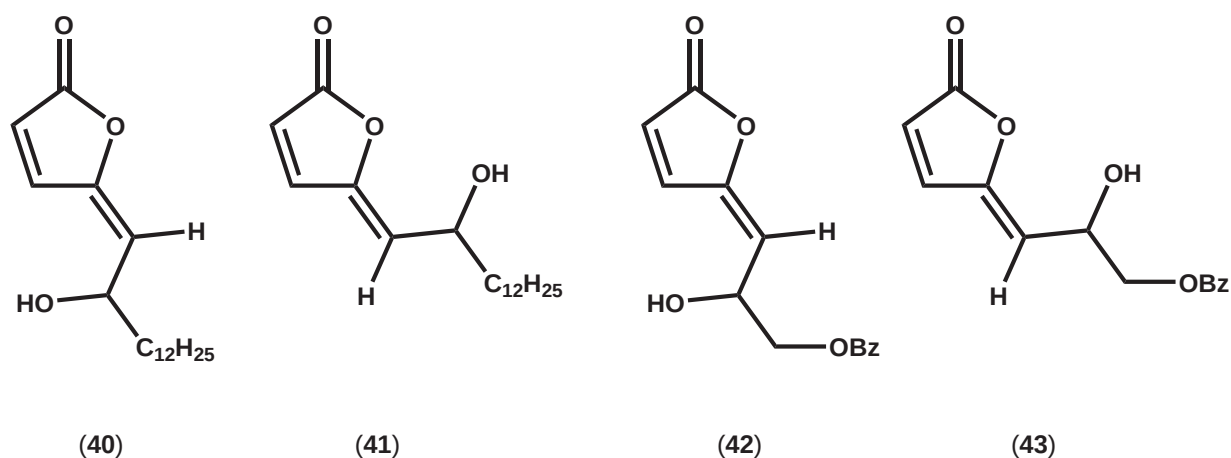


Abbildung 5.4. Hygrophoron F¹² (**40**) und G¹² (**41**) aus *Hygrophorus persoonii* sowie die beiden Butenolide **42** und **43** aus *Melodorum fruticosum* (Tuchinda et al. 1991).

Weiterhin enthält der Petrolether-Extrakt von *H. persoonii* die beiden neuen γ -Butyrolactone Hygrophoron F¹² (**40**) und Hygrophoron G¹² (**41**) als Nebenbestandteil (Abb. 5.4). Sie wurden mittels Festphasenextraktion, HPLC und anschließender Säulenchromatographie erhalten. Obwohl die ¹H-NMR-Spektren dieser Verbindungen denen der anderen Hygrophorone ähneln, gibt es große Unterschiede in den ¹³C-NMR- und HMBC-Spektren. Im ¹³C-NMR-Spektrum von **40** sieht man ein Signal für ein Ester-Carbonyl-Kohlenstoff

($\delta^{13}\text{C} = 169.1$ ppm). Weiterhin sind vier Signale für olefinische C-Atome ($\delta^{13}\text{C} = 117.3$ ppm, 121.0, 140.5, 150.3) sichtbar. APT- und HSQC-Messungen zeigen, dass C-4 ($\delta^{13}\text{C} = 150.3$ ppm) quaternär ist. Die Summenformel $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3$ wurde durch ESI-FT-ICR-MS-Messung ermittelt. Das HMBC-Spektrum zeigt, dass die zweite Doppelbindung in Konjugation mit der Doppelbindung einer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe steht. Die Tieffeldverschiebung von C-4 im ^{13}C -NMR-Spektrum sowie dessen Quarternarität zeigen, dass das Lacton über C-4 zu einem Fünfringlacton geschlossen ist. Ein beobachtbarer NOE-Korrelationspeak zwischen H-3 und H-6 sowie ein fehlender NOE-Korrelationspeak zwischen H-3 und H-5, genauso wie die relativ große Kopplungskonstante zwischen H-2 und H-5 ($^5J_{2,5} = 1.8$ Hz) sowie zwischen H-3 und H-5 ($^4J_{3,5} = 0.8$ Hz) zeigen die *trans*-Stellung der beiden Protonen H-3 und H-5. Demzufolge hat die exocyclische Doppelbindung *E*-Konfiguration. Eine OH-Gruppe und eine lange, unverzweigte, gesättigte Alkylkette ist an C-6 verknüpft. Aufgrund der Summenformel sowie der ^{13}C -NMR-Messung konnte eine Kettenlänge von 12 C-Atomen bestimmt werden. Ein Vergleich der NMR-Daten mit denen von (4*E*)-7-Benzoyloxy-6-hydroxy-2,4-hexadien-4-olid ([42](#), [Tuchinda et al. 1991](#)) bestätigt diesen Strukturvorschlag.

Von der zu [40](#) diastereomeren Verbindung [41](#) konnten nur Spuren erhalten werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei [41](#) um ein Isolierungs-Artefakt aufgrund von UV-induzierter Isomerisierung handelt. Die Strukturaufklärung der Grundstruktur wurde nur mit Hilfe der ^1H -NMR-Daten durchgeführt. Gemäß dieser eingeschränkten Daten ist [41](#) das *Z*-Isomer von [40](#). Im Vergleich zu [40](#) sind die ^1H -NMR-Signale von H-3 und H-5 hochfeldverschoben, während H-6 wegen der abschirmenden Wirkung der OH-Gruppe und des Ringsauerstoffes tieffeldverschoben ist. Im Gegensatz zu [40](#) wurden NOE-Korrelationen zwischen H-3 und H-5 beobachtet, während NOE-Korrelationen zwischen H-3 und H-6 fehlten. Außerdem sind die Kopplungskonstanten zwischen H-2 und H-5 ($^5J_{2,5} = 0.7$) sowie zwischen H-3 und H-5 ($^4J_{3,5} = 0.4$) signifikant kleiner als bei [40](#). Ein Vergleich mit den NMR-Daten von (4*Z*)-7-Benzoyloxy-6-hydroxy-2,4-hexadien-4-olid ([43](#)) bestätigt diesen Vorschlag ([Tuchinda et al. 1991](#)).

5.2. *Hygrophorus olivaceoalbus* - Natternstieliger Schneckling

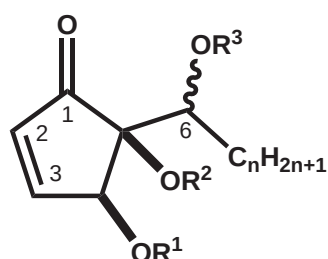
Hygrophorus olivaceoalbus (Fr.) Fr., den Natternstieligen Schneckling, findet man vereinzelt oder in Gruppen stehend unter älteren Fichten auf sauren Böden. Der Hut ist 3 – 6 cm breit, deutlich gebuckelt, olivgrau bis schwärzlich olivgrün, im Zentrum dunkler und dick mit Schleim überzogen. Der Rand ist anfangs eingebogen, später wellig geschweift. Die wachsartigen, breiten Lamellen sind weiß, manchmal mit bläulichem oder grünlichem Schein, entfernt stehend und herablaufend. Der Stiel ist 4 – 10 cm lang mit einem Durchmesser von 0.5 – 1.0 cm. Er ist am Anfang mit dem Hutrand durch einen schleimigen Schleier verbunden. Die Farbe des Stiels ist weiß mit hellbrauner Natterung und hat am



Abbildung 5.5. *Hygrophorus olivaceoalbus*. Mit KOH verfärbt sich dessen Stiel nicht.

Hutansatz eine weiße Zone. Das Fruchtfleisch ist weißlich bis gelblich. Der Pilz hat keinen charakteristischen Geruch. Mit KOH-Lösung gibt es keine Farbreaktion.

Aus dem Petrolether-Extrakt von *H. olivaceoalbus* ließen sich die Hygrophorone B¹⁴ (**44**) und B¹⁶ (**45**) nach Grobfraktionierung mittels Festphasenextraktion und Feinreinigung mit HPLC isolieren. Die Ergebnisse von 1D (¹H, ¹³C) und 2D-NMR-Experimenten (COSY, HSQC, HMBC, NOE) sowie die Ergebnisse der ESI-FT-ICR-MS-Messungen korrelieren sehr gut zu einer Cyclopentenon-Struktur mit drei freien OH-Gruppen an C-4, C-5 und C-6 sowie einer Pentadecanyl- (**44**) bzw. einer Heptadecanyl-Seitenkette (**45**) an C-5 (siehe Abbildung 5.6).



44:	R ¹ = H	R ² = H	R ³ = H	n = 14
45:	R ¹ = H	R ² = H	R ³ = H	n = 16
46:	R ¹ = Ac	R ² = H	R ³ = H	n = 14
47:	R ¹ = H	R ² = H	R ³ = Ac	n = 14
48:	R ¹ = Ac	R ² = H	R ³ = Ac	n = 14
49:	R ¹ = Ac	R ² = Ac	R ³ = Ac	n = 14

Abbildung 5.6. Hygrophorone B, isoliert aus *Hygrophorus olivaceoalbus* (**44**, **45**) und deren semisynthetischen Acetylderivate (**46** – **49**).

Durch Acetylierung von **44** mit Essigsäureanhydrid in Pyridin kann man, abhängig von Reaktionszeit und Reagenzienüberschuss, Derivate mit unterschiedlichen Acetylierungsgrad (siehe Abb. 5.6) erhalten: 4-Mono-*O*-acetylhygrophoron B¹⁴ (**46**), 6-Mono-*O*-acetylhygrophoron B¹⁴ (**47**), 4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron B¹⁴ (**48**) und 4,5,6-Tri-*O*-acetylhygrophoron B¹⁴ (**49**). Die Derivate lassen sich einfach mittels HPLC trennen.

Die ¹H-NMR-Spektren dieser Verbindungen unterscheiden sich von den Spektren der Hygrophorone (**31** – **39**), die aus *H. personii* isoliert bzw. derivatisiert wurden. Es handelt sich hierbei folglich um Diastereomere. Deren relative Stereochemie konnte teilweise aufgeklärt werden. Die Acetylgruppen bzw. Hydroxygruppen an C-4 und C-5 stehen *cis* zueinander (siehe Abschnitt 5.5.1, Seite 36).

5.3. *Hygrophorus pustulatus* - Schwarzpunktierter Schneckling



Abbildung 5.7. *Hygrophorus pustulatus*.

Hygrophorus pustulatus (Pers.) Fr., der Schwarzpunktierter Schneckling, wächst rasig in Hochfichtenwäldern auf vorzugsweise neutralen Böden. Der schleimüberzogene Hut ist 3 – 6 cm groß, hat eine oliv- bis graubraune Farbe, die in der Mitte deutlich dunkler ist. Der Hutrand ist wellig verbogen. Die angewachsenen bis herablaufenden Lamellen sind weiß und wachsig. Der meist trockene Stiel ist 4 – 8 cm lang und hat einen Durchmesser von 0.5 – 1.0 cm. Er ist weißlich mit deutlichen, punktförmigen, blassbraunen bis schwarzen

Pusteln. Das Fruchtfleisch ist weiß und geruchlos. Der Stiel verfärbt sich mit KOH-Lösung gelb – orange. Diese Farbreaktion ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden.

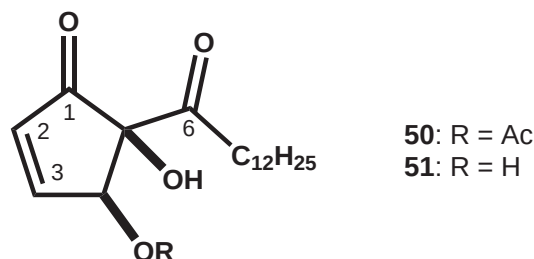


Abbildung 5.8. 4-*O*-Acetylhygrophoron C¹² (**50**) und Hygrophoron C¹² (**51**) aus *H. pustulatus*.

Der Petrolether-Extrakt des Schwarzpunktigen Schnecklings enthält 4-*O*-Acetylhygrophoron C¹² (**50**) und Hygrophoron C¹² (**51**), welche durch Festphasenextraktion und HPLC-Trennung erhalten wurden. Die ¹H-NMR-Spektren von **50** und **51** weisen große Ähnlichkeit zu den Spektren der anderen Hygrophorone auf. Die ¹³C-NMR-Spektren zeigen ein Signal einer zusätzlichen Carbonylfunktion (**50**: $\delta^{13}\text{C} = 205.3$ ppm, **51**: $\delta^{13}\text{C} = 205.7$ ppm). Die HMBC-Messungen beweisen, dass C-6 zu einem Keton oxidiert wurde. ESI-FT-ICR-MS-Messungen sowie COSY- und NOESY-Spektren bestätigen dies. Die Hygrophorone **50** und **51** sind oxidierte Formen von **31** bzw. **33**. Durch diese Oxidation geht ein Stereozentrum verloren. Die relative Anordnung der Substituenten an C-4 und C-5 konnte aufgeklärt werden (siehe Abschnitt 5.5.2, Seite 37). So steht die Hydroxygruppe an C-5 *cis* zur Hydroxy- bzw. Acetoxy-Gruppe an C-4. Interessanterweise konnte aus *H. pustulatus* kein Homologes mit kürzerer oder längerer Alkylkette isoliert werden.

5.4. *Hygrophorus latitabundus* - Großer Kiefernscneckling

Hygrophorus latitabundus Britz., der Große Kiefernscneckling, ist ein in Deutschland relativ seltener Pilz. Er bevorzugt höhere Lagen und bildet die Fruchtkörper recht spät im Jahr, oft noch nach den ersten Schneefällen. Er ist streng an Kiefern gebunden, wächst truppweise bis rasig auf kalkhaltigen Böden. Der massive, fleischige Pilz ist vollständig mit einer Schleimschicht überzogen. Der Hut ist 5 – 15 cm breit und hat eine glatte Oberfläche. Die Farbe ist außen dunkel olivbraun, in der Mitte fast schwarz. Der Hutrand ist heruntergebogen. Die Lamellen sind weiß bis cremefarben, wachsig, breit, angewachsen bis herablaufend. Der kräftige Stiel ist 5 – 10 cm lang, hat einen Durchmesser von 1.5 – 3.5 cm und ist weiß mit schwacher, gräulichen bis olivbraunen Natterung. Mit KOH-Lösung verfärbt sich der Stiel gelb. Das Fruchtfleisch ist schneeweiß ohne charakteristischen Geruch. In der Volksmedizin Kataloniens wird der dort als „Mocosa negra“ benannte Scneckling vor allem gegen Probleme mit dem Verdauungssystem eingesetzt, so als Darmantiseptikum



Abbildung 5.9. *Hygrophorus latitabundus* - der Stiel des mittleren Fruchtkörpers ist mit KOH-Lösung beträufelt worden.

(Intestinalantiseptikum), als Mittel gegen Durchfallerkrankungen (Antidiarrhoikum) oder gegen Magengeschwüre (Antiulcerativum) (Agelet und Vallès 2003).

Der Petrolether-Extrakt erweist sich als reichhaltige Quelle neuer Cyclopentenon-Derivate (Siehe Abb. 5.10). Die ^1H und ^{13}C -NMR-Spektren von 4-*O*-Acetylhygrophoron D¹² (52) und Hygrophoron D¹² (53) erinnern stark an die Spektren von 50 bzw. 51. Tatsächlich handelt es sich bei 50 und 52 bzw. 51 und 53 um Diastereomerenpaare mit *cis*- bzw. *trans*- Konfiguration an C-4/C-5. Die relative Stereochemie konnte mit Methoden der NMR und der MS aufgeklärt werden (siehe Abschnitt 5.5.2, Seite 37). Die Hygrophorone aus *H. pustulatus* (50, 51) sind *cis* konfiguriert. 4-*O*-Acetylhygrophoron D¹² (52) und Hygrophoron D¹² (53) aus *H. latitabundus* sind *trans* konfiguriert. 4-*O*-Acetylhygrophoron D¹⁴ (54) ist ein Homologes von 52 mit einer zusätzlichen Ethyleneinheit in der Seitenkette. Homologe von Hygrophoron D¹² (53) mit kürzerer oder längerer Kette wurden bisher nicht in *Hygrophorus* nachgewiesen. 4-*O*-Acetylhygrophoron D¹⁴ (54) ist nicht sehr stabil. In einer Probe, die ca. 6 Monate bei 10 °C im Kühlschrank gelagert wurde, war ein Teil der Substanz zum Hygrophoron D¹⁴ (55) deacetyliert.

Weiterhin wurden die Verbindungen 56 – 59 aus dem Petrolether-Extrakt isoliert (siehe Abb. 5.10). Das ^{13}C -NMR-Spektrum von 1,4-Di-*O*-acetylhygrophoron E¹² (56) zeigt zwei Acetat-Gruppen ($\delta^{13}\text{C}$ = 170.4, 20.8; 169.7, 21.0), welche erwartungsgemäß auch im ^1H -NMR-Spektrum zu sehen sind [$\delta^1\text{H}$ = 2.108 (3H, s), 2.018 (3H, s)]. HMBC-Korrelations-Peaks zwischen den Ester-Carbonyl-Kohlenstoffen und H-1 bzw. H-4 zeigen deren Position

Tabelle 5.2. ^1H -NMR-Daten ausgewählter Hygrophorone, CDCl_3 , 500 MHz (ppm), die Signale der Alkylkette: 1.20 – 1.33 *m* $(\text{CH}_2)_n$, 0.880 *t* (7.0) CH_3 .

37			32		33		31		39	
Pos.	δ ^1H	mult. J (Hz)	δ ^1H	mult. J (Hz)	δ ^1H	mult. J (Hz)	δ ^1H	mult. J (Hz)	δ ^1H	mult. J (Hz)
2	6.366	dd (6.1/1.6)	6.437	dd (6.1/1.6)	6.316	dd (6.1/1.8)	6.441	dd (6.2/1.8)	6.489	dd (6.4/1.8)
3	7.646	dd (6.1/2.0)	7.561	dd (6.1/2.2)	7.524	dd (6.1/2.0)	7.462	dd (6.2/2.1)	7.347	dd (6.4/2.1)
4 H	4.873	dd (2.0/1.6)	5.801	dd (2.2/1.6)	4.835	$ddd(6.7/2.0/1.8)$	5.721	dd (2.1/1.8)	6.244	dd (2.1/1.8)
4 OH/OAc	$n.d.$		2.174	s OAc	3.012	d (6.7) OH	2.136	s OAc	2.135	s OAc
5 OH/OAc	$n.d.$		3.185	br s OH	2.958	s OH	3.247	br s OH	1.983 ^a	s OAc
6 H	3.859	m	3.725	dt (9.6/3.0)	5.145	dt (10.4/2.9)	5.017	m	5.176	t (6.5)
6 OH/OAc	$n.d.$		2.39	s OH	2.045	s OAc	1.996	s OAc	2.123 ^a	s OAc
44			46		47		48		49	
Pos.	δ ^1H	mult. J (Hz)	δ ^1H	mult. J (Hz)	δ ^1H	mult. J (Hz)	δ ^1H	mult. J (Hz)	δ ^1H	mult. J (Hz)
2	6.301	dd (6.0/1.3)	6.438	dd (6.2/1.3)	6.300	dd (6.1/1.2)	6.438	dd (6.2/1.2)	6.470	dd (6.3/1.5)
3	7.644	dd (6.0/2.3)	7.588	dd (6.2/2.7)	7.640	dd (6.1/2.4)	7.550	dd (6.2/2.8)	7.432	dd (6.3/2.8)
4 H	4.727	dd (2.3/1.3)	5.722	dd (2.7/1.3)	4.793	dd (2.4/1.2)	5.785	dd (2.8/1.2)	5.967	dd (2.8/1.5)
4 OH/OAc	3.073	br s OH	2.156	s OAc	$n.d.$		2.151	s OAc	2.094 ^a	s OAc
5 OH/OAc	2.196	br s OH	$n.d.$		$n.d.$		2.730	s OH	2.102 ^a	s OAc
6 H	3.777	br d (10.1)	3.818	m	5.177	dd (10.1/2.8)	5.086	dd (9.7/3.6)	5.227	dd (10.1/2.9)
6 OH/OAc	3.718	br s OH	$n.d.$		2.000	s OAc	2.062	s OAc	2.002	s OAc

n.d. = nicht detektiert, ^a Zuordnung nicht sicher, kann auch vertauscht sein.

Tabelle 5.3. ^1H -NMR-Daten ausgewählter Hygrophorone, CDCl_3 , 500 MHz (ppm), die Signale der Alkylkette: 1.20 – 1.33 m $(\text{CH}_2)_n$, 0.880 t (7.0) CH_3 .

53			52		56		59	
Pos.	$\delta^1\text{H}$	mult. J (Hz)	$\delta^1\text{H}$	mult. J (Hz)	$\delta^1\text{H}$	mult. J (Hz)	$\delta^1\text{H}$	mult. J (Hz)
1 H	—	—	—	—	5.707	<i>ddd</i> (2.1/2.0/1.1)	5.659	<i>ddd</i> (2.2/1.5/1.0)
1 OH / OAc	—	—	—	—	2.108	<i>s</i> OAc	2.018	<i>s</i> OAc
2	6.446	<i>dd</i> (6.1/1.7)	6.591	<i>dd</i> (6.1/1.6)	6.159	<i>ddd</i> (6.1/2.1/1.1)	6.058	<i>ddd</i> (6.0/2.2/1.2)
3	7.722	<i>dd</i> (6.1/2.0)	7.701	<i>dd</i> (6.1/2.1)	6.190	<i>ddd</i> (6.1/1.9/1.1)	6.192	<i>ddd</i> (6.0/2.0/1.0)
4 H	4.942	<i>dd</i> (2.0/1.7)	5.827	<i>dd</i> (2.1/1.6)	5.724	<i>ddd</i> (2.0/1.9/1.1)	4.932	<i>ddd</i> (2.0/1.4/1.4)
4 OH / OAc	<i>n.d.</i>		2.089	<i>s</i> OAc	2.018	<i>s</i> OAc	<i>n.d.</i>	
5 OH / OAc	<i>n.d.</i>		4.622	<i>br s</i> OH	4.003	<i>br s</i>	<i>n.d.</i>	
7A	2.643	<i>ddd</i> (18.3/8.0/6.9)	2.591	<i>ddd</i> (17.9/7.6/7.1)	2.659	<i>ddd</i> (17.8/9.0/6.0)	2.698	<i>ddd</i> (17.7/8.2/6.7)
7B	2.464	<i>ddd</i> (18.3/8.0/6.5)	2.320	<i>ddd</i> (17.9/7.6/7.0)	2.589	<i>ddd</i> (17.8/8.8/6.1)	2.541	<i>ddd</i> (17.7/8.2/6.6)

51			50		40		41	
Pos.	$\delta^1\text{H}$	mult. J (Hz)	$\delta^1\text{H}$	mult. J (Hz)	$\delta^1\text{H}$	mult. J (Hz)	$\delta^1\text{H}$	mult. J (Hz)
2	6.466	<i>dd</i> (6.0/1.3)	6.537	<i>dd</i> (6.0/1.6)	6.256	<i>dd</i> (5.6/1.8)	6.230	<i>dd</i> (5.5/0.7)
3	7.857	<i>dd</i> (6.0/2.4)	7.802	<i>dd</i> (6.0/2.6)	7.794	<i>dd</i> (5.6/0.8)	7.372	<i>dd</i> (5.5/0.4)
4 H	4.850	<i>ddd</i> (7.2/2.4/1.3)	5.734	<i>dd</i> (2.6/1.6)	—	—	—	—
4 OH / OAc	3.046	<i>d</i> (7.2) OH	2.138	<i>s</i> OAc	—	—	—	—
5 OH / OAc	4.646	<i>s</i> OH	4.064	<i>s</i> OH	5.756	<i>ddd</i> (8.1/1.8/0.8)	5.326	<i>ddd</i> (8.4/0.7/0.4)
6 H	—	—	—	—	4.520	<i>m</i>	4.793	<i>m</i>
6 OH / OAc	—	—	—	—	<i>n.d.</i>		<i>n.d.</i>	
7A	2.452	<i>dt</i> (17.6/7.4)	2.595	<i>ddd</i> (17.9/8.1/6.7)				
7B	2.390	<i>dt</i> (17.6/7.3)	2.439	<i>ddd</i> (19.7/8.1/6.7)				

n.d. = nicht detektiert

Tabelle 5.4. ^{13}C -NMR-Daten ausgewählter Hygrophorone, CDCl_3 , 125 MHz (ppm).

Pos.	31	32	33	37	39	44	47	48	49	50	51	52	53	56	40
1	202.3	204.7	204.5	205.7	197.6	207.3	205.9	204.2	200.4	201.2	201.3	198.6	199.5	77.5 ^b	169.1
2	134.4	134.9	132.5	133.1	135.4	133.5	132.9	135.4	135.6	135.4	134.1	136.0	133.4	133.8	121.0
3	156.8	161.4	158.1	162.7	154.8	163.5	162.8	157.7	154.7	160.0	164.8	158.2	162.7	134.5	140.5
4	79.7	79.3	78.8	79.5	75.6	71.4	71.5	72.5	70.7	73.6	71.7	80.4	79.5	86.2	150.3
4-O ₂ C-CH ₃	170.5	170.2	—	—	170.2	—	—	169.8	169.2	170.1	—	169.5	—	169.7	—
4-O ₂ C-CH ₃	20.9	20.8	—	—	20.9 ^a	—	—	20.7	20.3 ^a	20.3	—	20.8	—	21.0	—
5	81.4	81.4	82.8	83.4	84.3	75.8	76.1	77.1	73.0	82.6	82.4	87.9	91.5	83.6	117.3
5-O ₂ C-CH ₃	—	—	—	—	169.4 ^a	—	—	—	168.6	—	—	—	—	—	—
5-O ₂ C-CH ₃	—	—	—	—	20.8 ^a	—	—	—	20.1 ^a	—	—	—	—	—	—
6	74.1	74.4	75.4	75.6	72.1	73.3	73.4	73.8	79.1	205.3	205.7	202.7	205.8	207.7	68.3
6-O ₂ C-CH ₃	169.9	—	171.2	—	169.5 ^a	—	170.6	170.4	169.6	—	—	—	—	—	—
6-O ₂ C-CH ₃	20.7	—	21.1	—	20.6 ^a	—	20.5	20.7	20.5	—	—	—	—	—	—
7	28.7	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	28.8	31.2	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	37.0	37.1	39.0	39.2	38.3	38.1
8-(ω -1)	31.8	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	31.9	31.9	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	31.9	31.9	32.0	32.0	32.0	32.0
	29.63				29.63	29.68				29.62	29.61	29.72	29.74	29.75	29.72
	29.59				29.61	29.67				29.60	29.59	29.70	29.73	29.73	29.71
	29.57				29.59	29.65				29.56	29.5	29.66	29.68	29.71	29.69
	29.5				29.53	29.64				29.4	29.4	29.50	29.52	29.59	29.62
	29.4				29.45	29.61				29.32	29.33	29.43	29.45	29.57	29.57
	29.34				29.39	29.56				29.30	29.26	29.42	29.44	29.45	29.5
	29.28				29.32	29.51				28.95	29.0	29.12	29.0	29.37	29.4
	25.9				25.8	29.41				23.0	23.1	23.3	23.0	23.7	25.3
	22.6				22.7	29.35				22.7	22.7	22.8	22.8	22.8	22.8
					26.1										
					22.7										
ω	14.1	14.0	14.0	14.0	14.1	14.1	14.0	14.0	14.0	14.1	14.1	14.3	14.3	14.3	14.2

^a Zuordnung nicht sicher, kann auch vertauscht sein.^b 1-OAc: 170.4 und 20.8 ppm.^c teilweise nicht aufgelöste CH₂-Signale zwischen 22 und 32 ppm.

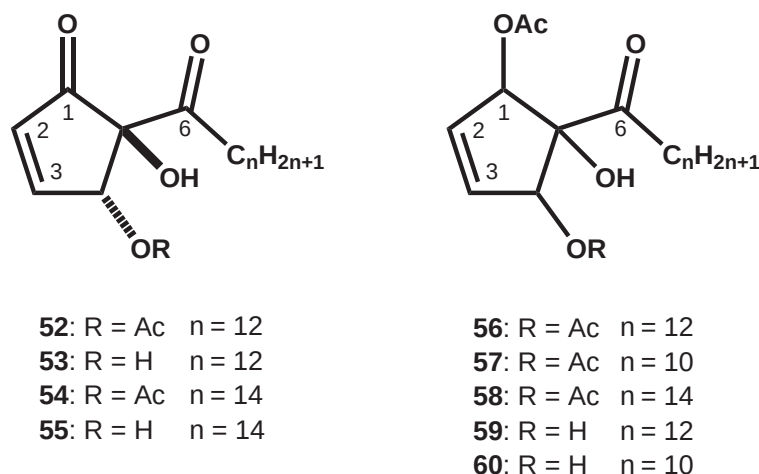


Abbildung 5.10. Hygrophorone D (**52 – 55**) sowie Hygrophorone E (**56 – 60**) aus *Hygrophorus latitabundus*

an O-1 und O-4 an. Tieffeld-Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum ($\delta^{13}\text{C} = 134.6, 133.8$) zeigen eine Doppelbindung an. Starke HMBC-Korrelations-Peaks zwischen C-1 und H-2, zwischen C-4 und H-3 sowie schwache Korrelations-Peaks zwischen C-1 und H-3 sowie zwischen C-4 und H-2 belegen, dass sich die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 befindet. Ein Signal im ^{13}C -NMR-Spektrum bei $\delta^{13}\text{C} = 207.7$ verweist auf die Existenz einer Keto-Gruppe. HMBC-Korrelations-Peaks zwischen dem quaternären C-Atom bei $\delta^{13}\text{C} = 83.6$ und H-2, H-3 sowie H-4 zeigen, dass dieses C-Atom mit C-1 und C-2 verknüpft ist. Ein erwarteter HMBC-Korrelations-Peak zwischen C-5 und H-1 konnte nicht detektiert werden. Dies lag möglicherweise an der zu kleinen vicinalen Kopplungskonstante. Korrelation-Peaks von C-6 mit H-1 und H-4 bestätigen, dass ein fünfgliedriger Ring aus C-1, C-2, C-3, C-4 und C-5 gebildet ist. Ein weiterer HMBC-Korrelations-Peak zwischen C-6 und H-7 zeigt, dass die Alkylkette an C-6 verknüpft ist. Eine OH-Gruppe [$\delta^1\text{H} = 4.003$ (^1H , br s)] ist mit C-5 verbunden. Die Summenformel $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_6$ wurde mittels ESI-FT-ICR-MS-Messungen bestimmt. **56** ist also ein Hygrophoron, bei dem der Cyclopentenon-Ring reduziert ist. Statt einer Ketogruppe befindet sich eine O-Acetylgruppe an Position 1. 1,4-Di-O-acetylhygrophoron E^{10} (**57**) und 1,4-Di-O-acetylhygrophoron E^{14} (**58**) sind Homologe von **56** mit einer Ethyleneinheit weniger bzw. mehr in der Seitenkette. 1-O-Acetylhygrophoron E^{12} (**59**) und 1-O-Acetylhygrophoron E^{10} (**60**) sind monodeacetylierte Formen von **56** und **57**.

5.5. Konfiguration der Hygrophorone

Aus *H. personii* und *H. olivaceoalbus* sowie aus *H. latitabundus* und *H. pustulatus* wurden Serien von Diastereomerenpaaren mit zwei bzw. drei stereogenen Zentren isoliert, deren absolute sowie relative Anordnung unbekannt ist. Die beste Methode zur Untersuchung der Konfiguration ist die Röntgenkristallstrukturanalyse (RKSA). Mit dieser Methode kann

in vielen Fällen durch Ausnutzen der anomalen Dispersion neben der relativen auch die absolute Konfiguration ermittelt werden. Voraussetzung für die Anwendung von Röntgenmethoden sind gute Kristalle. Von den Hygrophoronen ließen sich auf Grund der langen Alkylseitenkette keine Einkristalle erhalten. Daher wurden zur Untersuchung der relativen Konfiguration NMR- und MS-Methoden benutzt.

Bei den Hygrophoronen handelt es sich um Cyclopentenonderivate, die sich vor allem in der räumlichen Anordnung der O-Substituenten (-OH, -OAc) an C-4 und C-5 unterscheiden. Bei Cylohexanderivaten kann man durch Messen der vicinalen Kopplungskonstante sehr leicht bestimmen, ob die Substituenten *cis* oder *trans* zueinander angeordnet sind. Die Größe der Kopplungskonstante ist neben der Bindungslänge und dem Bindungswinkel vor allem vom Diederwinkel (ϕ , Karplus-Beziehung) abhängig. So kann man in der Sesselkonformation der Cyclohexane drei Arten von vicinalen Kopplungen unterscheiden, wobei die Kopplungskonstante bei axial-axialer Kopplung 7 – 12 Hz ($\phi = 180^\circ$) beträgt. Bei axial-äquatorialer sowie bei äquatorial-äquatorialer Kopplung ist sie deutlich kleiner, sie beträgt dort nur noch 2 – 5 Hz ($\phi = 60^\circ$).

Bei den Hygrophoronen ist die Interpretation der ^1H -NMR-Spektren hinsichtlich der Konfiguration an C-4/C-5 nicht einfach. Cyclopentenone liegen nicht in einer stabilen Sesselkonformation vor, es gibt keine axialen und äquatorialen Positionen. Aus der Größe der Kopplungskonstanten lässt sich daher nicht direkt auf die Konfiguration schließen. Außerdem ist die OH-Gruppe an C-5 tertiär. Es steht dort also kein „Reporter“-Proton zur Verfügung, dessen Kopplungskonstanten Aufschluss über die Konfiguration geben könnten.

5.5.1. Hygrophorone A und B

Die Hygrophorone der A-Reihe wurden entweder aus *H. persoonii* isoliert (**31** – **36**) oder sind deacetylierte (**37**) bzw. acetylierte (**39**) Derivate davon. Die Hygrophorone der B-Reihe wurden aus *H. olivaceoalbus* isoliert (**44**, **45**) bzw. wurden durch Acetylierung daraus dargestellt (**46** – **49**). Vergleicht man die ^1H -NMR-Spektren der konstituell identischen Derivate, kann man feststellen, dass die Kopplungskonstanten (siehe Tabelle 5.5) zwischen H-3 und H-4 ($^3J_{\text{H3-H4}}$) von **44** – **49** größer (2.3 – 2.9 Hz) als die der Derivate aus *H. persoonii* (2.0 – 2.2 Hz) sind. Die Kopplungskonstanten zwischen H-2 und H-4 ($^4J_{\text{H2-H4}}$) sind hingegen kleiner (1.1 – 1.3 Hz), verglichen mit den Kopplungskonstanten der Derivate aus *H. persoonii* (1.6 – 1.8 Hz). Diese Kopplungskonstanten können mit den korrespondierenden Kopplungskonstanten des literaturbekannten 4,5-*trans*-konfigurierten Epipentenomycin (**61**) von 2.1 Hz ($^3J_{\text{H3-H4}}$) und 1.6 Hz ($^4J_{\text{H2-H4}}$) (Baute et al. 1991) bzw. mit dem 4,5-*cis*-konfigurierten Pentenomycin (**62**, Umino et al. 1973) von 2.7 Hz ($^3J_{\text{H3-H4}}$) und 1.2 Hz ($^4J_{\text{H2-H4}}$) (Seepersaud und Al-Abed 2000) verglichen werden.

Daher kann postuliert werden, dass die Hygrophorone aus *H. persoonii* (**31** – **36**) und deren Derivate (**37**, **39**) 4,5-*trans*-konfiguriert sind. Die Hygrophorone aus *H. olivaceoalbus* (**44**, **45**) bzw. deren Derivate (**46** – **49**) sind dementsprechend 4,5-*cis*-konfiguriert. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von NOESY-Messungen. Während ein NOE zwischen dem Proton der OH-Gruppe an C-5 und dem vicinalen H-4 in **31**, **32** und **33** be-

Tabelle 5.5. Übersicht über die Kopplungskonstanten $^3J_{\text{H3-H4}}$ und $^4J_{\text{H2-H4}}$ der Hygrophorone A und B in Abhängigkeit von Acetylierungsgrad und relativer Konfiguration an C-4/C-5 im Vergleich zu Pentenomycin (**62**) und Epipentenomycin (**61**).

Substitutionsmuster	$^3J_{\text{H3-H4}}$ (Hz)		$^4J_{\text{H2-H4}}$ (Hz)	
	4,5- <i>cis</i>	4,5- <i>trans</i>	4,5- <i>cis</i>	4,5- <i>trans</i>
4,5,6-OH	2.3	2.0	1.3	1.6
4-OAc	2.7	2.2	1.3	1.6
6-OAc	2.4	2.0	1.2	1.8
4,6-OAc	2.9	2.1	1.1	1.8
4,5,6-OAc	2.8	2.1	1.6	1.8
Pentenomycin (4,5- <i>cis</i>)	2.7		1.2	
Epipentenomycin (4,5- <i>trans</i>)		2.1		1.6

obachtet werden konnte, wurde kein NOE zwischen OH-5 und H-4 in **44** und **48** registriert. Über die Konfiguration an C-6 kann bisher keine Aussage getroffen werden.

5.5.2. Hygrophorone C und D

Hygrophoron C¹² (**51**) und dessen Acetylderivat **50** wurden aus *H. pustulatus*, die dazu diastereomeren Hygrophorone D (**52** – **54**) aus *H. latitabundus* isoliert. Im Unterschied zu den Hygrophoronen der A- und B-Reihe sind sie am C-6 zum Keton oxidiert. Dadurch geht hier ein Stereozentrum verloren. Analog zu den Hygrophoronen A und B kann man die Kopplungskonstanten zwischen H-2 und H-4 bzw. H-3 und H-4 (siehe Tabelle 5.6) vergleichen. Leider ist der Unterschied der Kopplungskonstanten zwischen den Diastereomerenpaaren nicht sehr groß bzw. die Anzahl der untersuchten Derivate so gering, dass sich daraus keine sicheren Aussagen zur Konfiguration ableiten lassen.

Tabelle 5.6. Übersicht über die Kopplungskonstanten $^3J_{\text{H3-H4}}$ und $^4J_{\text{H2-H4}}$ der C- und D-Hygrophorone in Abhängigkeit von Acetylierungsgrad und relativer Konfiguration an C-4/C-5 im Vergleich zu Pentenomycin (**62**) und Epipentenomycin (**61**).

Substitutionsmuster	$^3J_{\text{H3-H4}}$ (Hz)		$^4J_{\text{H2-H4}}$ (Hz)	
	4,5- <i>cis</i>	4,5- <i>trans</i>	4,5- <i>cis</i>	4,5- <i>trans</i>
4-OH	2.4	2.0	1.3	1.7
4-OAc	2.6	2.1	1.6	1.6
Pentenomycin (4,5- <i>cis</i>)	2.7		1.2	
Epipentenomycin (4,5- <i>trans</i>)		2.1		1.6

Große Unterschiede hingegen gibt es in den 1D-NOE-Spektren (Abbildung 5.11) von **50** und **52**. Sie unterscheiden sich in fundamentalen Peaks. Während für **50** starke NOE-Peaks zwischen H-4 und H-7A / H-7B sowie kein NOE-Signal zwischen H-4 und dem Proton der OH-Gruppe zu beobachten sind, kann für **52** ein starkes NOE-Signal zwischen H-4 und dem Proton der OH-Gruppe beobachtet werden. Zwischen H-4 und H-7A / H-7B sind nur schwache Signale zu sehen. Die Größe des NOE-Signals ist indirekt proportional zur 6. Potenz des räumlichen Abstandes der beobachteten Protonen ($\text{NOE} \sim r^{-6}$). Das heißt, das NOE-Signal ist um so größer, je kleiner der Abstand ist.

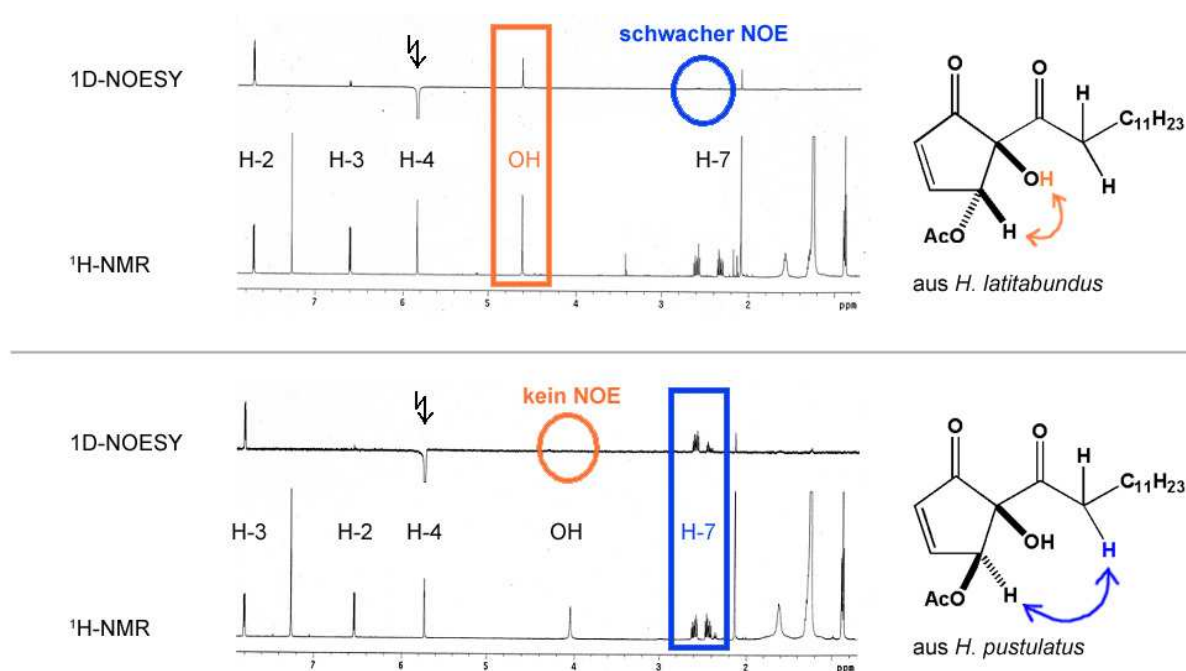


Abbildung 5.11. 1D-NOESY und ^1H -NMR Spektren von **52** aus *H. latitabundus* (oben) und **50** aus *H. pustulatus* (unten) zur Klärung der relativen Konfiguration an C-4 / C-5.

Zur Bestimmung des Abstandes zwischen H-4 und H-7 sowie zwischen H-4 und 5-OH wurden Modellierung-Untersuchungen mittels Kraftfeldberechnungen (Triposkraftfeld mit Gasteiger-Ladungen, Clark et al. 1989, Gasteiger und Marsili 1980) durchgeführt. Dazu wurde mit dem Molecular-Modelling-Programm MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Montreal, Kanada) eine systematische Konformationsuche für die Rotation aller frei drehbaren Bindungen (Seitengruppen am Cyclopentenonring sowie C-5/C-6 und C-6/C-7) in Schrittweiten von 30° durchgeführt. Alle resultierenden Konformationen wurden energetisch optimiert. Anschließend wurden für alle Konformationen mit einer Energie kleiner 5 kcal/mol oberhalb der jeweils gefundenen stabilsten Konformation die Abstände zwischen den entsprechenden Protonen berechnet. Zusammen mit den erhaltenen Energien der jeweiligen Konformationen wurden diese Abstände nach einer Boltzmannverteilung gewichtet. Für das 4,5-*cis*-Derivat beträgt der kürzeste Abstand

Tabelle 5.7. Berechnete gemittelte Abstände zwischen H-4/H-7 und H-4/OH-5 sowie gemessene NOE-Signale.

Verbindung	H-4 / H-7		H-4 / OH-5	
	Abstand	NOE	Abstand	NOE
4-O-Acetylhygrophoron C ¹² (50)	3.7 Å	stark	4.1 Å	kein
4-O-Acetylhygrophoron D ¹² (52)	4.1 Å	schwach	3.3 Å	stark

von H-4 zu H-7 3.7 Å, für das *trans*-Derivat 4.1 Å. Der gemittelte Abstand von H-4 zum Proton der OH-Gruppe beträgt im *cis*-Isomer 4.1 Å, im *trans*-Isomer 3.3 Å. Daher sollte **50** *cis* und **52** *trans* konfiguriert sein.

Des Weiteren war es möglich von Verbindung **51** ein cyclisches Methylboronat herzustellen. Mittels GC-MS konnten das Molekölion bei m/z 334 sowie zwei Fragmentionen bei m/z 197 (C₁₃H₂₅O⁺) und m/z 138 (C₆H₇BO₃⁺), die durch α -Spaltung entstanden sind, nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte von **53** aus sterischen Gründen kein Methylboronat erzeugt werden. Dies korreliert gut mit den Ergebnissen der NOESY-Experimente: Hygrophorone aus *H. pustulatus* (**50**, **51**) sind *cis*-konfiguriert. 4-O-Acetylhygrophoron D¹² (**52**) und Hygrophoron D¹² (**53**) aus *H. latitabundus* sind *trans*-konfiguriert.

5.6. MS-Untersuchung ausgewählter Hygrophorone

Das massenspektroskopische Verhalten von Cyclopentenon-Derivaten wurde bisher wenig untersucht. Die Flüssigchromatographie (LC) gekoppelt mit sanften Ionisationstechniken wie der Elektrosprayionisation (ESI) oder der chemischen Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) eignet sich besonders für die Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens. Dies konnte bisher beispielsweise an Cyclopentenonen wie den Isoprostanen oder den Prostaglandinen (Oda et al. 1995; Margalit et al. 1996; Hankin et al. 1997; Murphy et al. 1999; Murphy et al. 2001; Fam et al. 2002; Lee et al. 2003; Balazy 2004) sowie an anderen Metaboliten der Arachidonsäure (Oda et al. 1995; Hevko und Murphy 2001; Dickinson und Murphy 2002) gezeigt werden. Die Hygrophorone haben im Vergleich zu diesen Substanzen ein anderes Substitutionsmuster. Dies lässt ein anderes Fragmentierungsverhalten erwarten.

Die Hygrophorone können aufgrund ihres Substitutionsmusters vor allem an C-6 in zwei Gruppen eingeteilt werden. Typ I-Hygrophorone (**31** – **39**, **44** – **49**) haben eine Hydroxy- bzw. eine Acetoxy-Gruppe an C-6, während Typ II-Hygrophorone (**50** – **55**) dort zum Keton oxidiert sind. Diese Einteilung spiegelt sich sowohl im Fragmentierungs- als auch im Ionisierungsverhalten mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) wider. Die positiven Massenspektren aller untersuchten Hygrophorone enthielten [M+H]⁺-Ionen. Im negativen Modus konnten mit Ausnahme der peracetylierten Typ I-Hygrophorone (**39**, **49**) von allen untersuchten Hygrophoronen [M–H][–]-Ionen erhalten werden.

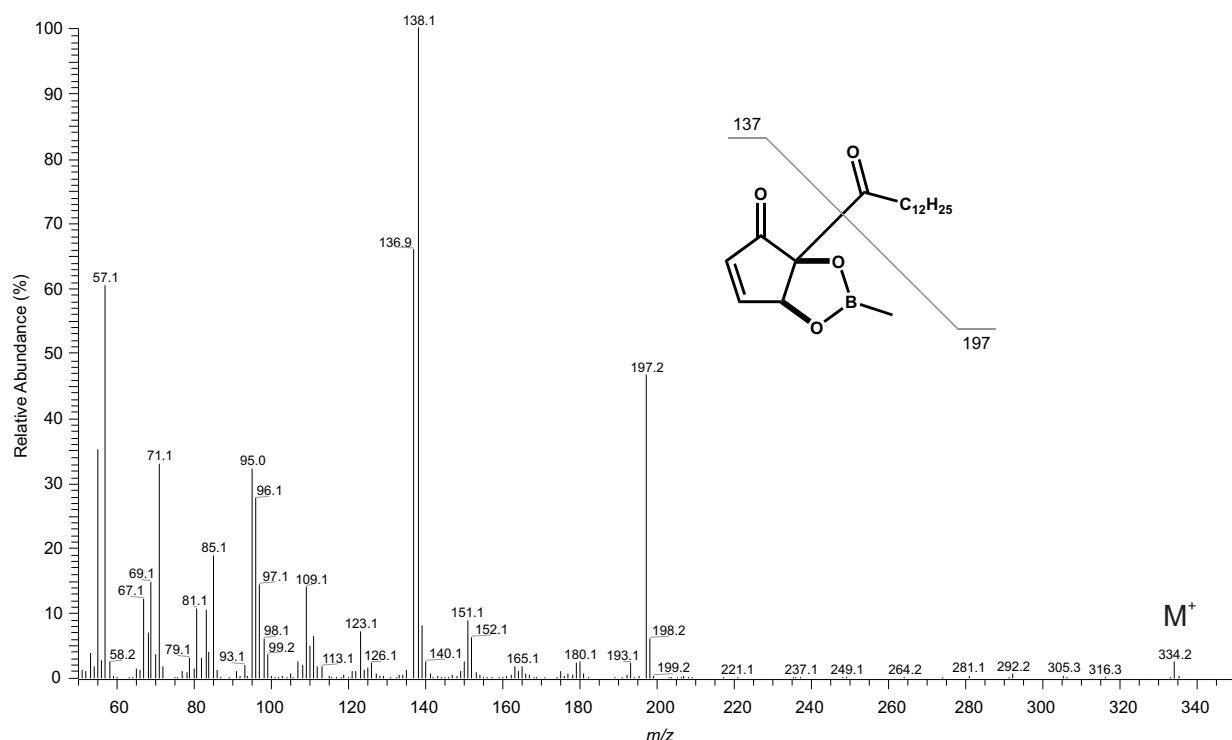
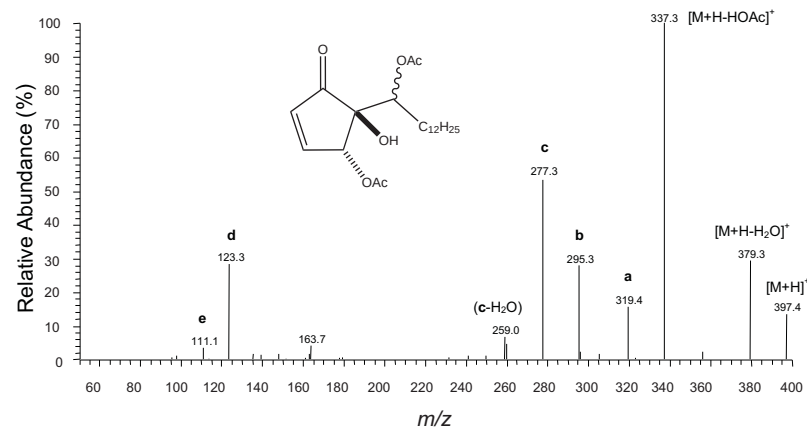


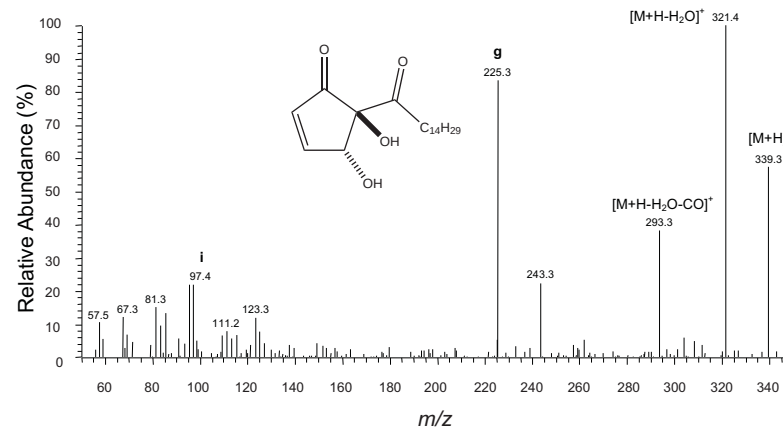
Abbildung 5.12. GC/MS-Spektrum des cyclischen Methylboronates von **51**. Vom Diastereomeren **53** konnte aus sterischen Gründen kein cyclisches Methylboronat erzeugt werden.

5.6.1. Positive Ionisierung

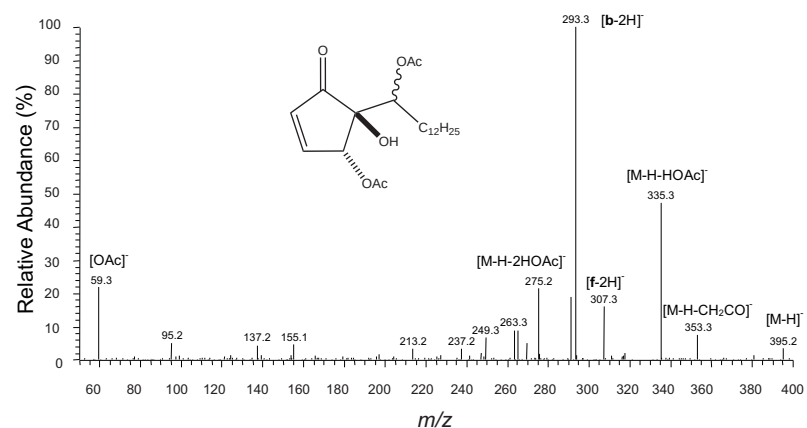
Alle untersuchten Hygrophorone spalten bei kollisionsinduzierter Fragmentierung (CID) funktionelle Gruppen ab. So lassen sich die Abspaltung von Wasser ($[M+H-18]^+$), Keten ($[M+H-42]^+$) und Essigsäure ($[M+H-60]^+$) sowie weitere Folgereaktionen beobachten (siehe Tabelle 5.8 und 5.9, Abbildung 5.13(a) und 5.13(b) sowie Schema 5.1 und 5.2). Es gibt jedoch erhebliche Unterschiede in der Intensität der auftretenden Ionen. Während im Fall der *trans* konfigurierten Typ I-Hygrophorone **31**, **32** und **34** das Ion $[M+H-60]^+$ (Abspaltung von Essigsäure) den Basispeak repräsentiert, führt beim peracetylierten *trans*-Hygrophoron **39** eine zusätzliche Abspaltung von Keten zum Basispeak $[M+H-60-42]^+$ ($m/z = 337$, Ion **b**). Im Gegensatz dazu ist bei Typ I-Hygrophoronen mit *cis* Konfiguration (**44**, **45**, **48**) das Ion $[M+H-H_2O]^+$ der Basispeak. Die Abspaltung von Wasser ist beim peracetylierten *cis*-Hygrophoron **49** nicht möglich, hier führt die Abspaltung von Essigsäure zum Basispeak $[M+H-60]^+$ ($m/z = 407$). Ein wichtiges Schlüsselfragment für alle Typ I-Hygrophorone ist $m/z = 123$ (**d**). Dessen elementare Zusammensetzung wurde mittels hochauflösender Massenspektrometrie (ESI-QqTOF-MS) als $[C_7H_7O_2]^+$ bestimmt. Dieses Ion enthält den Cyclopentenonring sowie die C-Atome C-6 und C-7 der Seitenkette (siehe Schema 5.1). Ein Fragment-Ion von untergeordneter Bedeutung ist $m/z = 111$ (**e**, $[C_6H_7O_2]^+$). Es repräsentiert den Cyclopentenonring sowie C-6. Dieses Ion wird nach Ab-



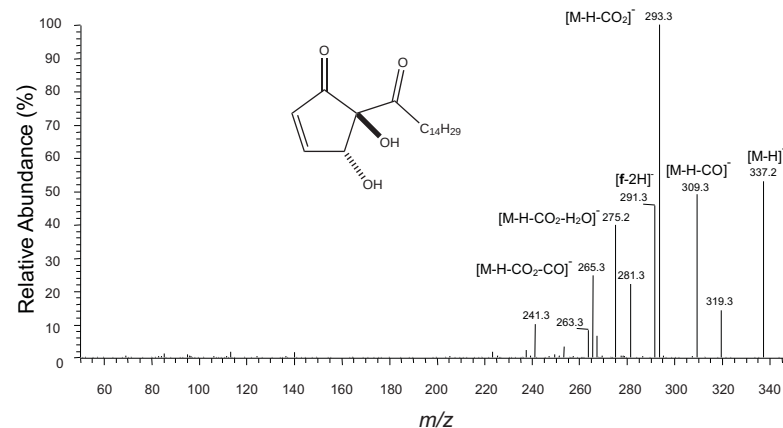
(a) 13 eV (+)-ESI/CID-Massenspektrum von 4,6-Di-O-acetylhygrophoron A¹² (**31**).



(b) 15 eV (+)-ESI/CID-Massenspektrum von Hygrophoron D¹⁴ (**55**).

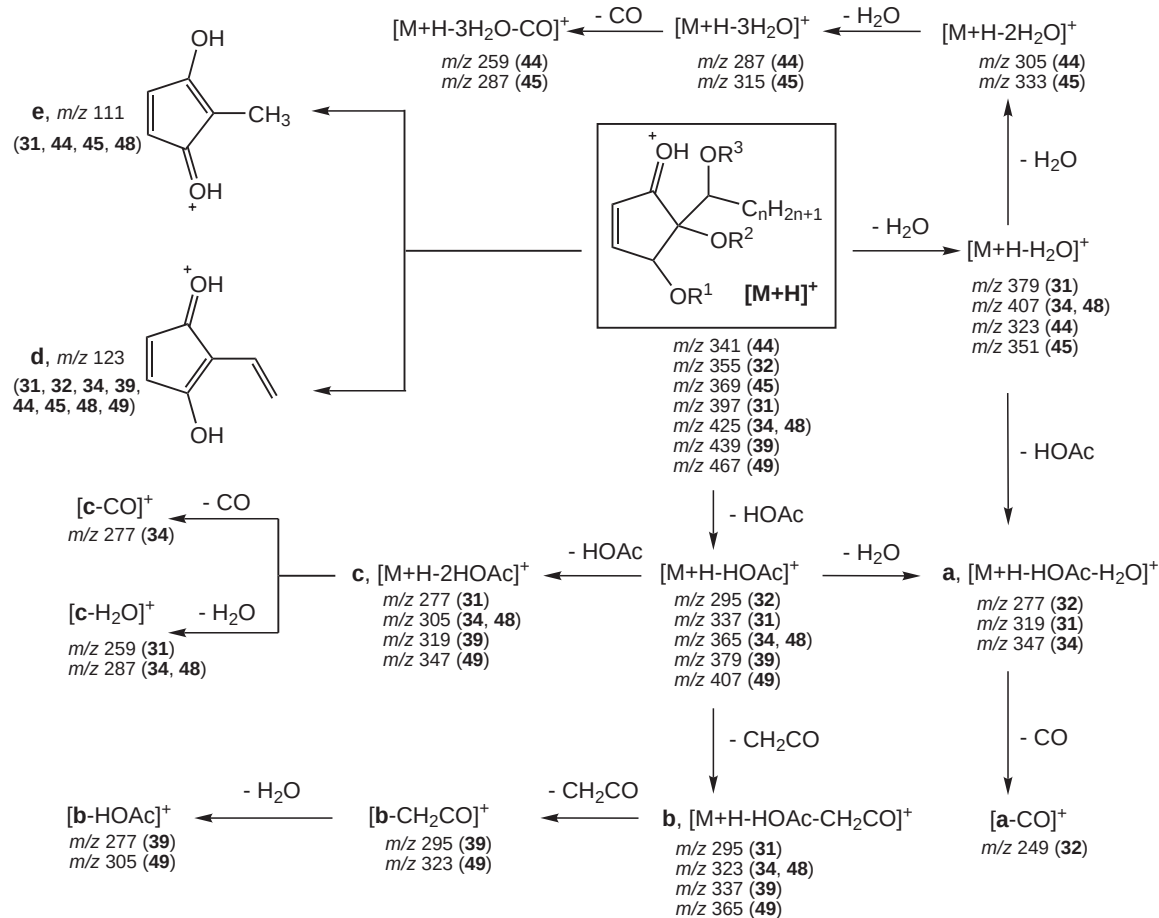


(c) 20 eV (-)-ESI/CID-Massenspektrum von 4,6-Di-O-acetylhygrophoron A¹² (**31**).



(d) 20 eV (-)-ESI/CID-Massenspektrum von Hygrophoron D¹⁴ (**55**).

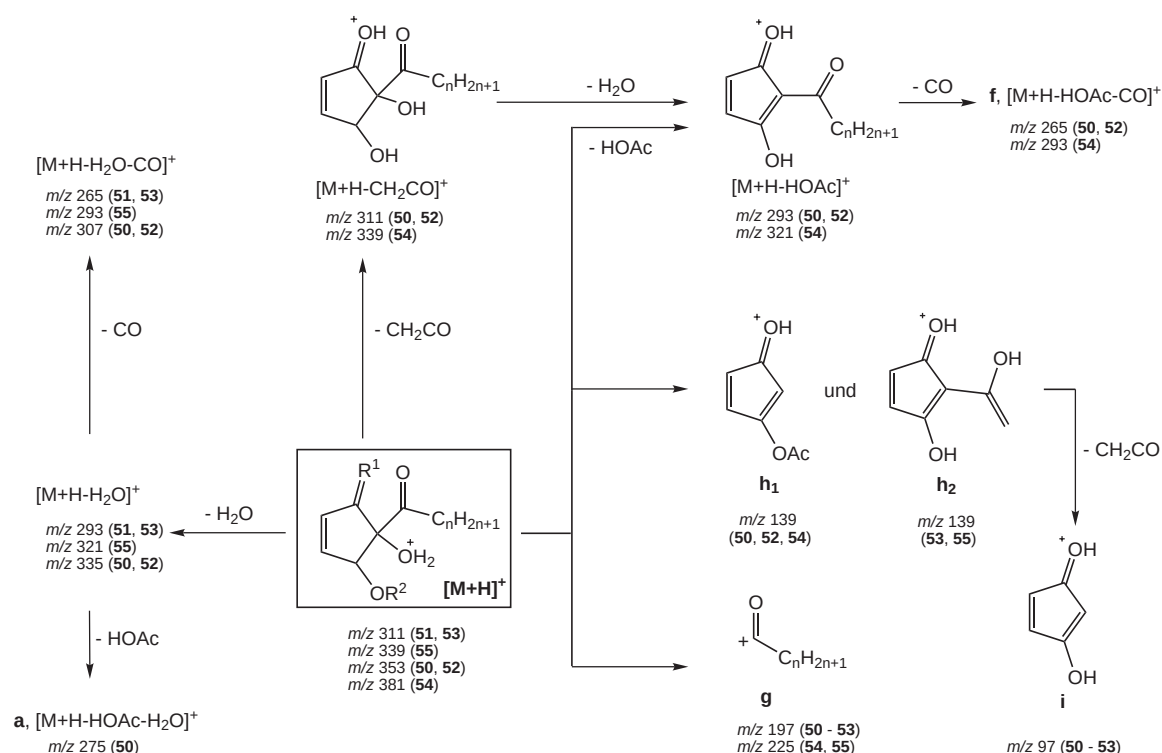
Abbildung 5.13. ESI/CID-Massenspektren von Typ I sowie Typ II-Hygrophoronen im positiven sowie negativen Modus.



Schema 5.1 Fragmentierung von Typ I-Hygrophoronen nach positiver Ionisierung mittels ESI.

spaltung der Substituenten an C-5 und C-6 gebildet. Es tritt bei der Fragmentierung von **31**, **44**, **45** und **48** auf.

Die Typ II-Hygrophorone zeigen im Vergleich zu den Typ I-Hygrophoronen ein deutlich anderes Fragmentierungsverhalten. Die Keto-Gruppe an C-6 induziert eine Fragmentierung, welche zu einem Acyl-Fragment **g** führt (siehe Schema 5.2). Dieses Fragment $m/z = 197$ ist der Basispeak bei Hygrophoron D¹² (**53**). Ein vergleichbares Ion, welches die Seitenkette repräsentiert, ist bei Typ I-Hygrophoronen nicht vorhanden. Im Gegensatz zu den Type I-Hygrophoronen folgt der ersten Substituenten-Eliminierung ($[M+H-H_2O]^+$ bzw. $[M+H-HOAc]^+$) eine Abspaltung von CO, welches zu einem Ion des Typs **f** (siehe Abbildung 5.13(b), Schema 5.2 und Tabelle 5.9) führt. Interessanterweise tritt bei den nichtacetylierten Hygrophoronen C¹² (**51**) und D¹² (**53**, $m/z = 215$, $[C_{13}H_{27}O_2]^+$) sowie D¹⁴ (**55**, $m/z = 243$, $[C_{15}H_{31}O_2]^+$) ein Ion auf, welches formal (**g**+H₂O) entspricht. Die Summenformel dieses Ions wurde mit hochauflösender Massenspektrometrie bestätigt. Es wird wahrscheinlich durch Umlagerung der 5-O-Hydroxygruppe zu einer protonierten



Schema 5.2 Fragmentierung von Typ II-Hygrophoronen nach positiver Ionisierung mittels ESI.

Carbonsäure gebildet, welche die Seitenkette enthält. Weitere signifikante Fragmente sind die Ionen vom **h**-Typ (**h₁** bzw. **h₂**). In den CID-Massenspektren, die mit einem Tripel-Quadrupol-Gerät (ESI-QqTOF-MS) erhalten wurden, tritt das Ion **h₁** ($m/z = 139$) bei den 4-O-Acetylhygrophoronen C¹² (**50**), D¹² (**52**) und D¹⁴ (**54**) auf (siehe Tabelle 5.9). Ein Ion vom **h₂**-Typ mit einer elementaren Zusammensetzung von C₇H₇O₃ konnte mittels ESI-QqTOF bei den Hygrophoronen D¹² (**53**) und D¹⁴ (**55**) detektiert werden. In diesem Fall kann eine Struktur des Iones vorgeschlagen werden, welche neben dem Fünfring auch die C-Atome C-6 und C-7 der Seitenkette enthält (siehe Schema 5.2). Eine darauf folgende Abspaltung einer Keten-Einheit führt zum Schlüssel-Ion **i** ($m/z = 97$), welches in allen untersuchten Typ II-Hygrophoronen (**50 – 55**) auftaucht.

Die Schlüsselfragmente **f**, **g**, **h₁/h₂** und **i** kommen in den Typ I-Hygrophoronen nicht vor. Die Bildung des Acyl-Ions **g** scheint daher typisch für Verbindungen mit einer Keto-Gruppe an C-6 zu sein. Es kann nicht gebildet werden, wenn sich an dieser Position eine Hydroxy- oder Acetoxygruppe befindet. Andererseits wird die Bildung von Ionen des **e**-Typs durch die Keto-Gruppe an C-6 in den Typ II-Hygrophoronen (siehe Tabelle 5.8 und 5.9) verhindert. Interessanterweise tritt ein Ion $m/z = 123$ bei den Typ II-Hygrophoronen **50**, **51**, **53** und **55** auch auf. Dessen elementare Zusammensetzung, die durch hochaufgelöste Messungen

bestimmt wurde, beträgt allerdings C_9H_{15} . Daher ist es nicht mit dem Ion **d** identisch, welches die gleiche Nominalmasse hat.

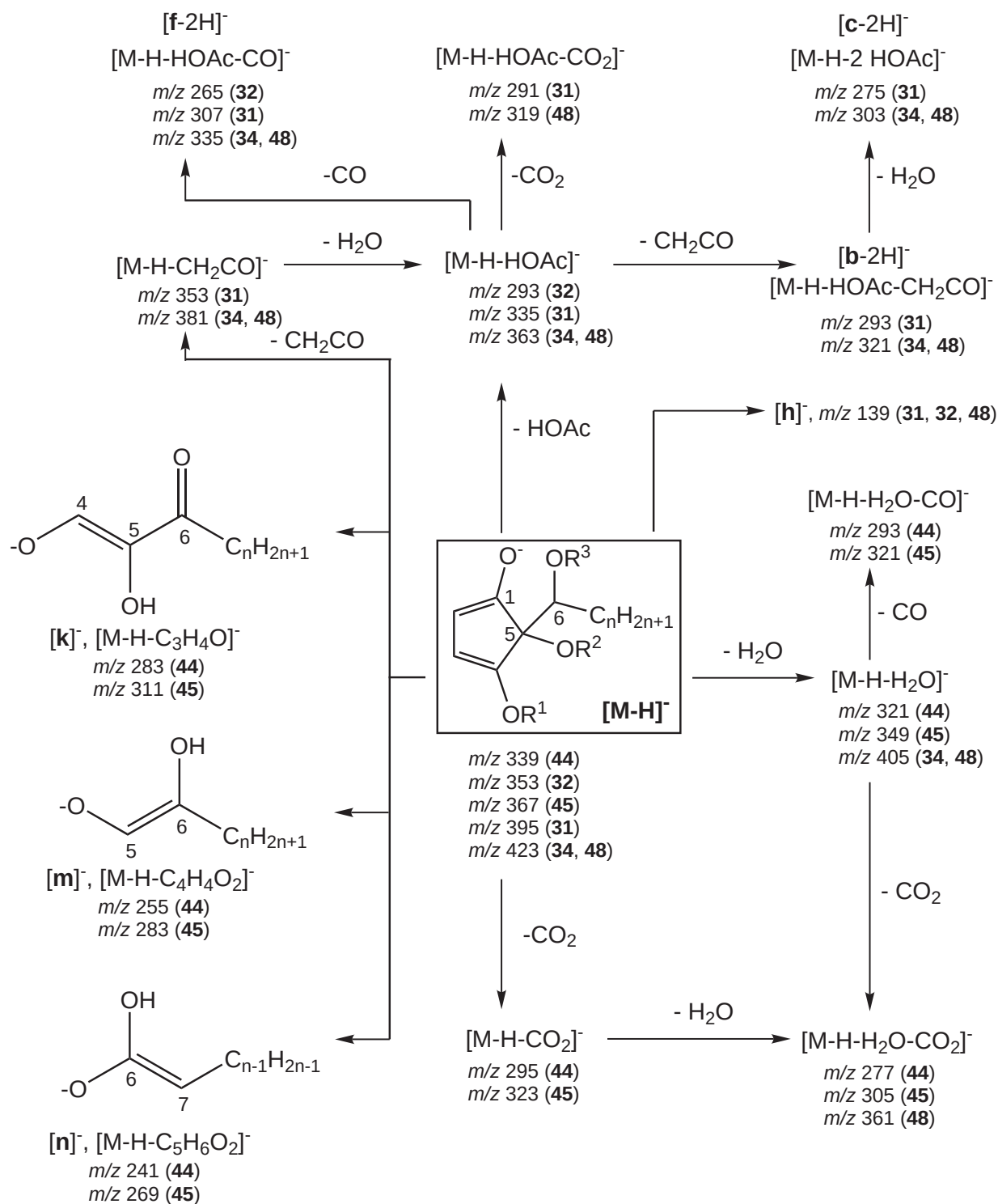
5.6.2. Negative Ionisierung

Die Ionisierungsausbeute der Typ II-Hygrophorone ist sehr gering, im Fall der peracetylierten Hygrophorone (**39** und **49**) ließen sich unter den Bedingungen der Elektrosprayionisierung (ESI) keine negativen Ionen erhalten. Allgemein unterscheidet sich das Fragmentierungsverhalten der Hygrophorone im negativen Modus stark vom positiven Modus. Das trifft sowohl für Typ I als auch Typ II-Hygrophorone zu. Aber auch hier gibt es bemerkenswerte Unterschiede in den CID-MS-Spektren der deprotonierten Hygrophorone des Typs I und II (siehe Schema 5.3 und 5.4 sowie Tabelle 5.10 und 5.11). Neben der Substituentenfragmentierung, welche zu Ionen des Typs $[M-H-H_2O]^-$, $[M-H-CH_2CO]^-$ sowie $[M-H-HOAc]^-$ führt, treten auch einige typische Fragment-Ionen auf, welche die Zuordnung der Verbindungen zum Typ I oder II erlauben.

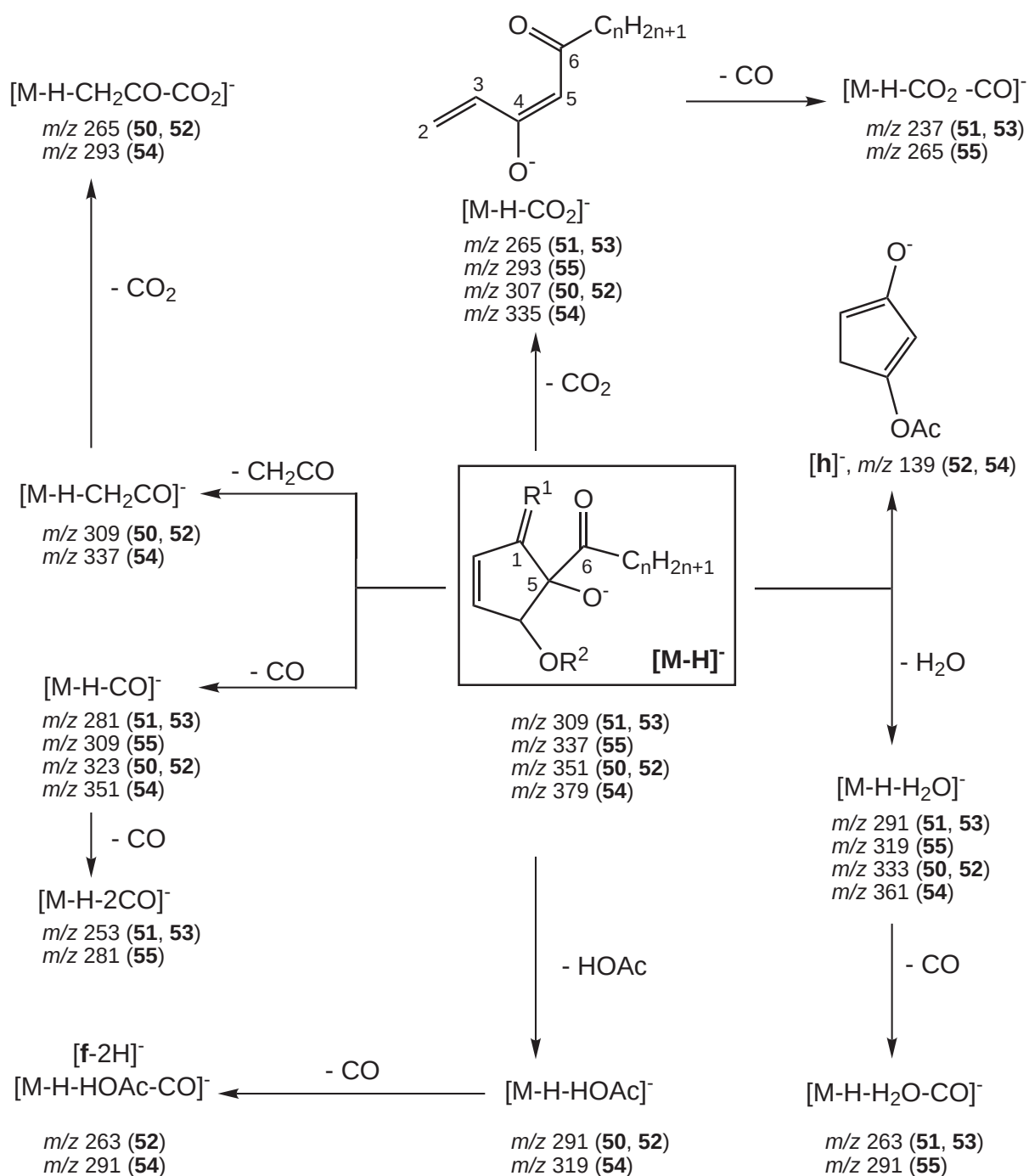
Für acetylierte Typ I-Hygrophorone ist die Abspaltung von Essigsäure dominierend. So ist der Basispeak von **32** ($m/z = 293$) und **46** ($m/z = 363$) $[M-H-HOAc]^-$, von **31** ($m/z = 293$) und **34** ($m/z = 321$) $[M-H-HOAc-CH_2CO]^-$. Neben der Abspaltung funktioneller Gruppen zeigen die trihydroxylierten Hygrophorone **44** und **45** eine interessante Fragmentierung. Sie führt dort nach Zerstörung des Cyclopentenongerrüsts zur Bildung resonanzstabilisierter negativer Schlüssel-Ionen $[k]^-$, $[m]^-$ und $[n]^-$. Während das Ion $[k]^-$ dem Ion $[M-H-C_3H_4O]^-$ entspricht, wurde das Ion $[m]^-$ durch Abspaltung einer $C_4H_4O_2$ -Einheit vom deprotonierten Molekülion gebildet. In diesem Fall werden die Ringkohlenstoff-Atome C-1 – C-4 abgespalten. Ein weiteres interessantes Fragment-Ion der Verbindungen **44** und **45** ist das Schlüssel-Ion des Typs $[n]^-$ ($[M-H-C_5H_6O_2]^-$), welches bei beiden Verbindungen das Basis-Ion darstellt. Es entsteht wahrscheinlich durch Abspaltung des kompletten Fünfrings mit gleichzeitiger Hydroxywanderung nach C-6.

Das Fragmentierungsverhalten der Typ II-Hygrophorone unterscheidet sich von den Typ I-Hygrophoronen. Zum Beispiel kann die Abspaltung von CO nur bei Verbindungen des Typ II (**50** – **55**) beobachtet werden. Ein sehr interessanter Fragmentierungsschritt dieser Verbindungen ist die direkte Abspaltung von Kohlendioxid vom deprotonierten Molekülion $[M-H]^-$. Bei den hydroxylierten Hygrophoronen C^{12} (**51**), D^{12} (**53**) und D^{14} (**55**, siehe Abbildung 5.13(d)) führt diese Abspaltung direkt zum Basispeak (**51**, **53**: $m/z = 265$, **55**: $m/z = 293$). Im Fall der korrespondierenden 4-O-Acetyl-Derivate **52** und **54** findet die Abspaltung von CO_2 als Folgereaktion nach Abspaltung von Keten statt. Die Abspaltung von CO_2 ist durch hochaufgelöste MS/MS-Messungen (ESI-QqTOF-MS) abgesichert. Sie kann durch eine Umlagerung, an der die Ketogruppe an C-1 sowie die Hydroxygruppe an C-5 beteiligt sind, erklärt werden (siehe Schema 5.4). Eine intensitätsschwache Abspaltung von CO_2 direkt vom $[M-H]^-$ -Ion tritt auch in den nichtacetylierten Typ I-Hygrophoronen **44**, **45** und **50** auf. Zusätzlich kann hier eine CO_2 -Abspaltung als Folgereaktion beobachten werden (siehe Tabelle 5.10).

Eine ungewöhnliche Abspaltung von Kohlendioxid vom $[M-H]^-$ -Ion wurde auch bei deprotonierten Flavonen, Flavonolen, Flavonon-Aglyconen (Fabre et al. 2001; Bai et al.



Schema 5.3 Fragmentierung von Typ I-Hygrophoronen nach negativer Ionisierung mittels ESI.



Schema 5.4 Fragmentierung von Typ II-Hydrophoronen nach negativer Ionisierung mittels ESI.

Tabelle 5.8. CID-MS-Spektren der Typ I-Hygrophorone, erhalten von $[M+H]^+$ -Ionen nach HPLC/ESI-MS

	RT (min)	$[M+H]^+$	$[M+H-H_2O]^+$	$[M+H-HOAc]^+$	a	b	c	(c-H₂O)	d	e	andere Ionen
31	19.7	397 (13)	379 (31)	337 (100)	319 (16)	295 (30)	277 (60)	259 (7)	123 (30)	111 (4)	–
32	17.6	355 (4)	–	295 (100)	277 (14)	–	–	259 (7) ^b	123 (4)	–	267 (f , 8), 249 (a -CO, 15)
34	23.2	425 (12)	407 (23)	365 (100)	347 (15)	323 (38)	305 (83)	287 (14)	123 (55)	–	277 (4), 259 (4)
39	22.4	439 (1)	–	379 (54)	–	337 (100)	319 (6)	259 (7) ^c	123 (9)	–	295 (70) ^e , 277 (25) ^f , 231 (3)
44	18.3	341 (3)	323 (100)	–	305 (73) ^a	–	–	287 (30) ^d	123 (16)	111 (10)	259 (21) ^g , 245 (15), 165 (16), 147 (15)
45	21.4	369 (7)	351 (100)	–	333 (35) ^a	–	–	315 (31) ^d	123 (15)	111 (20)	287 (38) ^g , 259 (12), 241 (21), 147 (18)
48	22.4	425 (23)	407 (100)	365 (73)	–	323 (38)	305 (51)	287 (11)	123 (24)	111 (2)	189 (7)
49	26.0	467 (2)	–	407 (100)	–	365 (66)	347 (3)	–	123 (3)	–	323 (9) ^e , 305 (12) ^f

a = $[M+H-HOAc-H_2O]^+$; **b** = $[M+H-HOAc-CH_2CO]^+$; **c** = $[M+H-2HOAc]^+$; **d** = $[C_7H_7O_2]^+$; **e** = $[C_6H_7O_2]^+$; **f** = $[M+H-HOAc-CO]^+$; ^a $[M+H-2H_2O]^+$; ^b $[M+H-HOAc-2H_2O]^+$; ^c (**c**-HOAc); ^d $[M+H-3H_2O]^+$; ^e (**b**-CH₂CO); ^f (**b**-HOAc); ^g $[M+H-3H_2O-CO]^+$; **fett** = Basispeak

Tabelle 5.9. CID-MS Spektren der Typ II-Hygrophorone, erhalten von $[M+H]^+$ -Ionen nach HPLC/ESI-MS

	RT (min)	$[M+H]^+$	$[M+H-H_2O]^+$	$[M+H-CH_2CO]^+$	$[M+H-H_2O-CO]^+$	$[M+H-HOAc]^+$	f	g	h₁	i	andere Ionen
50	19.3	353 (15)	335 (10)	311 (60)	307 (100)	293 (52)	265 (10)	197 (31)	139 (39)	97 (4)	275 (a , 8), 123 (5) ^b
51	17.7	311 (77)	293 (100)	–	265 (5) ^a	–	–	197 (43)	–	97 (12)	215 (13) ^c , 123 (8) ^b , 115 (20), 95 (8)
52	19.3	353 (13)	335 (3)	311 (44)	307 (8)	293 (42)	265 (31)	197 (70)	139 (100)	97 (29)	–
53	17.2	311 (76)	293 (83)	–	265 (79) ^a	–	–	197 (100)	–	97 (40)	215 (25) ^c , 123 (20) ^b , 109 (19), 95 (38)
54	22.4	381 (2)	–	339 (20)	–	321 (72)	293 (17)	225 (58)	139 (100)	97 (11)	–
55	20.0	339 (56)	321 (100)	–	293 (47) ^a	–	–	225 (85)	–	97 (21)	243 (27) ^d , 123 (14) ^b , 109 (12), 95 (14)

a = $[M+H-HOAc-H_2O]^+$; **b** = $[M+H-HOAc-CH_2CO]^+$; **f** = $[M+H-HOAc-CO]^+$; **g** = $[C_{n+1}H_{2n+1}O]^+$; **h₁** und **h₂** = $[C_7H_7O_3]^+$; **h₂** wird nur bei ESI-QqTOF-Messungen beobachtet; **i** = $[C_5H_5O_2]^+$; ^a korrespondiert formal mit **f**; ^b $[C_9H_{15}]^+$; ^c $[C_{13}H_{27}O_2]^+$; ^d $[C_{15}H_{31}O_2]^+$; **fett** = Basispeak

Tabelle 5.10. CID-MS-Spektren der Typ I-Hygrophorone, erhalten von $[M-H]^-$ -Ionen nach HPLC/ESI-MS

	$[M-H]^-$	$[M-H-H_2O]^-$	$[M-H-CH_2CO]^-$	$[M-H-HOAc]^-$	$[M-H-H_2O-CO_2]^-$	$[f-2H]^-$	$[b-2H]^-$	$[n]^-$	$[h]^-$	andere Ionen
31	395 (2)	–	353 (8)	335 (42)	–	307 (13)	293 (100)	–	139 (2)	291 ($[M-H-HOAc-CO_2]^-$, 21), 275 ($[c-2H]^-$, 14), 263 (8), 249 (6), 95 (5), 59 (20)
32	353 (2)	–	–	293 (100)	–	265 (15)	–	–	139 (4)	275 ($[M-H-H_2O-HOAc]^-$, 4)
34	423 (13)	405 (4)	381 (8)	363 (54)	–	335 (5)	321 (100)	–	–	303 ($[c-2H]^-$, 7), 205 (8), 59 (37)
44	339 (9)	321 (42)	–	–	277 (60)	–	–	241 (100)	–	295 ($[M-H-CO_2]^-$, 7), 293 ($[M-H-H_2O-CO]^-$, 10), 283 ($[k]^-$, 24), 279 (10), 267 ($[M-H-H_2O-C_3H_2O]^-$, 21), 255 ($[m]^-$, 23), 113 (16), 97 (45), 83 (13)
45	367 (24)	349 (48)	–	–	305 (42)	–	–	269 (100)	–	323 ($[M-H-CO_2]^-$, 3), 321 ($[M-H-H_2O-CO]^-$, 9), 311 ($[k]^-$, 18), 295 ($[M-H-H_2O-C_3H_2O]^-$, 10), 283 ($[m]^-$, 24), 113 (30), 97 (79), 95 (11), 83 (14)
48	423 (4)	405 (22)	381 (13)	363 (100)	361 (2)	335 (19)	321 (73)	–	139 (20)	351 ($[M-H-H_2O-C_3H_2O]^-$, 4), 333 ($[M-H-H_2O-CO-CO_2]^-$, 12), 319 ($[M-H-HOAc-CO_2]^-$, 15), 303 ($[c-2H]^-$, 5), 291 ($[f-2H-CO_2]^-$, 35), 283 ($[M-H-2H_2O-HOAc-CO_2]^-$, 11), 277 ($[b-2H-CO_2]^-$, 18), 273 ($[f-2H_2O-CO_2]^-$, 25), 197 (14), 181 (17), 59 (48)

$[f-2H]^- = [M-H-HOAc-CO]^-$; $[b-2H]^- = [M-H-CH_2CO-HOAc]^-$; $[c-2H]^- = [M-H-2HOAc]^-$; $[h]^- = [C_7H_7O_3]^-$;
 $[k]^- = [M-H-C_3H_4O]^-$, $[m]^- = [M-H-C_4H_4O_2]^-$; $[n]^- = [M-H-C_5H_6O_2]^-$; **fett** = Basispeak

Tabelle 5.11. CID-MS Spektren der Typ II-Hygrophorone, erhalten von $[M-H]^-$ -Ionen nach HPLC/ESI-MS

	$[M-H]^-$	$[M-H-H_2O]^-$	$[M-H-CO]^-$	$[M-H-CH_2CO]^-$	$[M-H-CO_2]^-$	$[M-H-HOAc]^-$	$[M-H-CO_2-CH_2CO]^-$	$[f-2H]^-$	$[h]^-$	andere Ionen
50	351 (7)	333 (2)	323 (3)	309 (100)	307 (3)	291 (19)	265 (36)	–	–	–
51	309 (61)	291 (17)	281 (67)	–	265 (100)	–	–	263 (51) ^a	–	253 ($[M-H-2CO]^-$, 27), 247 ($[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 42), 237 ($[M-H-CO_2-CO]^-$, 32), 235 (11), 213 (13), 113 (7)
52	351 (33)	333 (36)	323 (15)	309 (26)	307 (8)	291 (35)	265 (100)	263 (29)	139 (18)	305 (16) ^a , 289 (24), 279 (18), 239 (10), 113 (11)
53	309 (34)	291 (14)	281 (49)	–	265 (100)	–	–	263 (56) ^a	–	253 ($[M-H-2CO]^-$, 30), 247 ($[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 45), 237 ($[M-H-CO_2-CO]^-$, 34), 235 (14), 113 (3)
54	379 (48)	361 (21)	351 (10)	337 (21)	335 (17)	319 (24)	293 (100)	291 (24)	139 (13)	317 (16), 307 (23), 113 (8)
55	337 (54)	319 (14)	309 (49)	–	293 (100)	–	–	291 (46) ^a	–	281 ($[M-H-2CO]^-$, 22), 275 ($[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 40), 265 ($[M-H-CO_2-CO]^-$, 24), 241 (10)

^a $[M-H-H_2O-CO]^-$; $[a-2H]^- = [M-H-HOAc-H_2O]^-$; $[b-2H]^- = [M-H-HOAc-CH_2CO]^-$; $[h]^- = [C_7H_7O_3]^-$;
 $[f-2H]^- = [M-H-HOAc-CO]^-$; **fett** = Basispeak

Tabelle 5.12. Ergebnisse des ^1H -NMR-Screenings auf Hygrophorone in *Hygrophorus*

Hygrophoron-Reihe	<i>H. agathosmus</i>	<i>H. discoideus</i>	<i>H. nemoreus</i>	<i>H. poetarum</i>
Hygrophorone A	–	+	–	–
Hygrophorone B	+	–	–	+
Hygrophorone C	+	–	–	+
4-Acetylhygrophorone C	+	–	+	+

2004), methoxylierten Flavanoiden (Justesen 2001) sowie Chalconen (Zhang und Brodbelt 2003) beobachtet. Auch in diesen Fällen musste zuvor eine Sauerstoffwanderung hin zur beteiligten Keto-Gruppe stattfinden, damit eine CO_2 -Abspaltung erfolgen konnte.

5.7. Screening auf Hygrophorone in *Hygrophorus* spp.

5.7.1. Screening mittels Dünnschichtchromatographie

Bačinić (2006) konnte im Rahmen ihrer Diplomarbeit das Vorkommen von Hygrophoronen mittels Dünnschichtchromatographie anhand der charakteristischen Farbreaktion (Gelbverfärbung der Dünnschichtplatte nach Erhitzen im Heizluftstrom) zusätzlich zu *H. latitabundus*, *H. persoonii*, *H. pustulatus* auch in *H. agathosmus*, *H. discoideus*, *H. nemoreus* und *H. poetarum* vermuten. Die Hygrophorone der B-Reihe (44 – 49), wie sie in *H. olivaceoalbus* vorkommen, verfärben sich weder durch Erhitzen noch nach Behandlung mit KOH gelb.

5.7.2. ^1H -NMR-Screening

Die Hygrophorone lassen sich leicht mittels ^1H -NMR im Petrolether-Rohextrakt nachweisen. Dazu werden zwei bis drei Fruchtkörper mit Petrolether extrahiert, der Extrakt unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und der Rückstand in CDCl_3 aufgenommen. Die Hauptbestandteile des Petroletherextraktes sind gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, meist C18, so dass die Signale des Cyclopentenonrings nicht überlagert werden (siehe Abb. 5.14). Die Signale der Alkylkette werden hingegen überlagert. Die ^1H -NMR ist daher eine geeignete Methode Cyclopentenonderivate schnell in Petroletherextrakten nachzuweisen. Es ist damit möglich, die Art des Hygrophorones (A – G) sowie das Substitutionsmuster zu bestimmen. Für die Bestimmung der gesamten Struktur der Hygrophorone (vor allem die Länge der Seitenkette) sind weitere, z. B. massenspektrometrische Untersuchungen notwendig.

Es wurden die Petrolether-Rohextrakte von 23 *Hygrophorus*-Arten auf das Vorkommen von Hygrophoronen mittels ^1H -NMR untersucht. Dabei wurden zusätzlich zu *H. persoonii*, *H. olivaceoalbus*, *H. pustulatus* und *H. latitabundus* Hygrophorone in *H. agathosmus*, *H. nemoreus*, *H. discoideus* und *H. poetarum* nachgewiesen (siehe Tabelle 5.12).

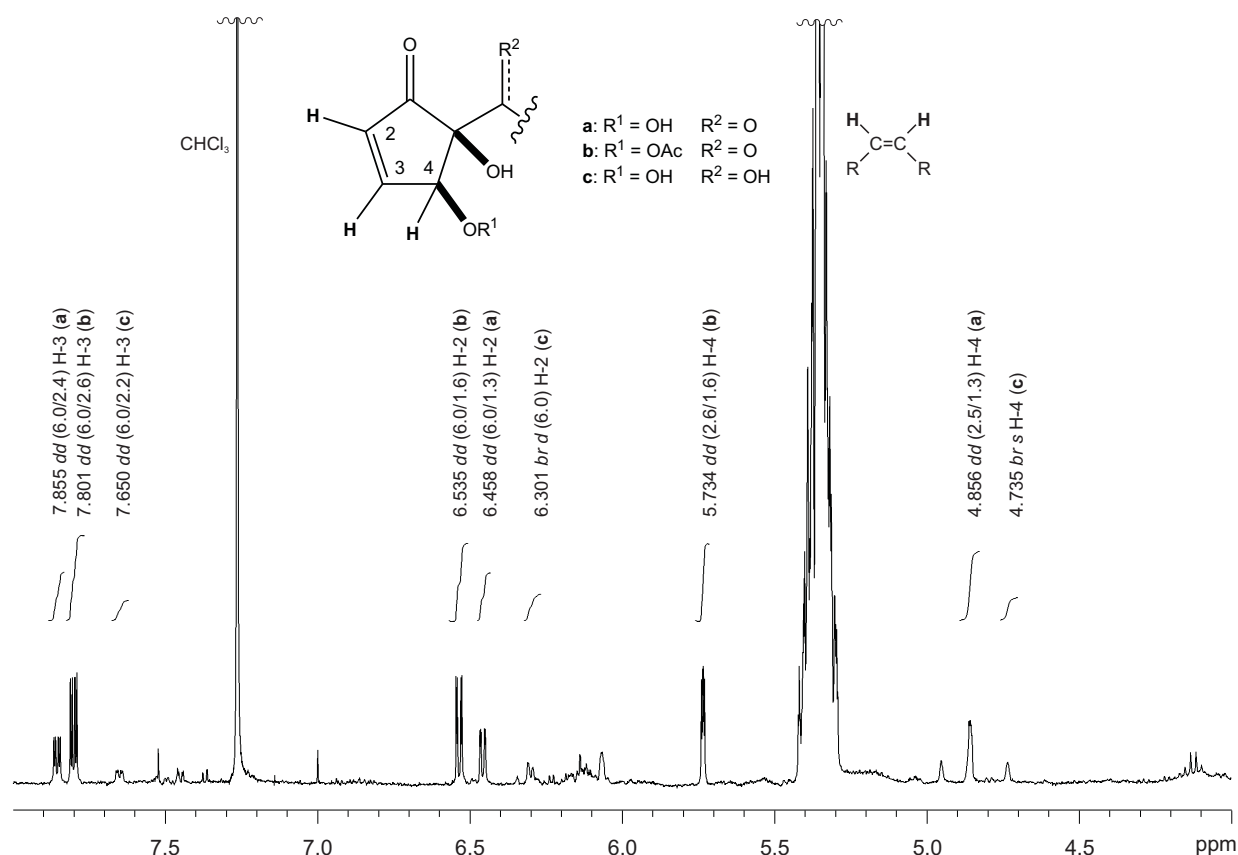


Abbildung 5.14. Ausschnitt (8.0 – 4.0 ppm) aus dem ^1H -NMR Spektrum (400 MHz, 128 Scans, CDCl_3) des Petrolether-Rohextrakts von *H. agathosmus*. Sichtbar sind neben olefinischen Protonen (5.35 ppm, oben abgeschnitten) die Protonensignale der Cyclopentenongerüste von Hygrophoron B (c), C (b) und von 4-O-Acetylhygrophoron C (a).

5.7.3. Screening mittels Selected Reaction Monitoring (SRM)

Die Petroletherextrakte der im DC- und ^1H -NMR-Screening positiv aufgefallenen *Hygrophorus*-Arten wurden mittels HPLC-ESI-MS (full scan) und Selected Reaction Monitoring (SRM) auf das Vorkommen von Hygrophoronen untersucht (siehe Abbildung 5.15 und Tabelle 5.13). Dabei wurden im negativen Ionisierungsmodus nach unacetylierten sowie nach einfach und zweifach acetylierten Typ I-Hygrophoronen (Hygrophorone A und B) sowie nach unacetylierten und einfach acetylierten Typ II-Hygrophoronen (Hygrophorone C und D) gesucht. Hierbei wurde nur auf Hygrophorone mit einer C_{12} -, C_{14} - oder C_{16} -Seitenkette geachtet, und zwar unabhängig davon, ob dieses Hygrophoron schon vorher bekannt war oder nicht (siehe Tabelle 5.13).

SRM ist eine spezielle MS/MS-Methode, bei der ausgewählte Fragmentierungsschritte beobachtet werden. Sie ist empfindlicher als eine Full-Scan-Methode und eignet sich daher besonders für die Spurenanalytik. Allerdings unterscheiden sich die untersuchten diaste-

Tabelle 5.13. Mit SRM (Selected Reaction Monitoring) im Petroletherextrakt von *Hygrophorus*-Arten nachgewiesene Hygrophorone.

[M-H] [−]	Hygrophoron	aga	disc	korho	nemo	poet	pustu
311	A ¹² (37) / B ¹² (63)	+ ^B	+ ^A	−	+ [?]	+ ^{B,2}	+ ^{?,2}
339	A ¹⁴ (64) / B ¹⁴ (44)	+ ^B	+ ^A	+ [?]	−	+ ^{B,2}	+ ^{?,2}
367	A ¹⁶ (65) / B ¹⁶ (45)	−	−	−	−	−	−
353	Acetyl A ¹² (32, 33) / B ¹² (66)	−	−	−	−	+ [?]	−
381	Acetyl A ¹⁴ (35, 36) / B ¹⁴ (46, 47)	−	−	−	−	−	−
409	Acetyl A ¹⁶ (67) / B ¹⁶ (68)	−	−	−	−	−	−
395	Diacetyl A ¹² (31) / B ¹² (69)	−	−	−	−	−	−
423	Diacetyl A ¹⁴ (34) / B ¹⁴ (48)	−	−	−	−	−	−
451	Diacetyl A ¹⁶ (70) / B ¹⁶ (71)	−	−	−	−	−	−
309	C ¹² (51) / D ¹² (53)	+ ^C	+ [?]	+ [?]	+ ^C	+ ^C	+ ^C
337	C ¹⁴ (72) / D ¹⁴ (55)	+ ^C	+ [?]	−	+ ^C	+ ^{C,2}	+ ^{C,2}
365	C ¹⁶ (73) / D ¹⁶ (74)	−	−	−	−	−	−
351	Acetyl C ¹² (50) / D ¹² (52)	−	−	−	+ ^C	+ ^C	+ ^C
379	Acetyl C ¹⁴ (75) / D ¹⁴ (54)	+ ^C	−	−	−	+ ^C	+ ^C
407	Acetyl C ¹⁶ (76) / D ¹⁶ (77)	−	−	−	−	−	−

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

+ = positiver Nachweis; − = nicht detektierbar; ^{A, B, C, D} Die Bestimmung der Konfiguration (4,5-*cis* oder 4,5-*trans*) ist aufgrund ähnlicher Retentionszeiten sowie ähnlicher Intensitätsverhältnisse der Fragmentationen mittels HPLC-MS nicht möglich. Aufgrund von ¹H-NMR Untersuchungen des Rohextraktes handelt es sich wahrscheinlich um ein Hygrophoron der A-, B-, C- bzw. D-Reihe; [?] Zuordnung der Konfiguration nicht möglich; ² Es wurde ein zusätzliches Isomer mit unterschiedlicher Retentionszeit und anderen Intensitätsverhältnissen der Fragmentationen detektiert.

reomeren Hygrophorone kaum in Retentionszeit und Fragmentierungsverhalten, so dass mittels SRM eine Bestimmung der Konstitution nicht möglich ist.

Während in allen mit SRM untersuchten Pilzextrakten Typ I-Hygrophorone mit drei freien OH-Gruppen ($m/z = 311$ und 339) nachgewiesen werden konnten, wurden nur im Petroletherextrakt von *H. poetarum* Spuren eines einfach acetylierten Typ I-Hygrophorones ($m/z = 353$) nachgewiesen. Zweifach acetylierte Typ I-Hygrophorone waren in keinem untersuchten Pilzextrakt nachweisbar.

Hygrophorone mit einer Ketogruppe an C-6 (Typ II-Hygrophorone) und zwei freien OH-Gruppen ($m/z = 309$ und 337) konnten in allen untersuchten Pilzextrakten nachgewiesen werden, einfach acetylierte Typ II-Hygrophorone ($m/z = 351$ und 379) waren in *H. agathosmus*, *H. nemoreus*, *H. poetarum* und *H. pustulatus* nachweisbar.

Die Konfiguration der mittels SRM nachgewiesenen Hygrophorone lässt sich nicht vom Fragmentierungsverhalten oder der Retentionszeit ableiten. Durch Vergleich mit den Da-

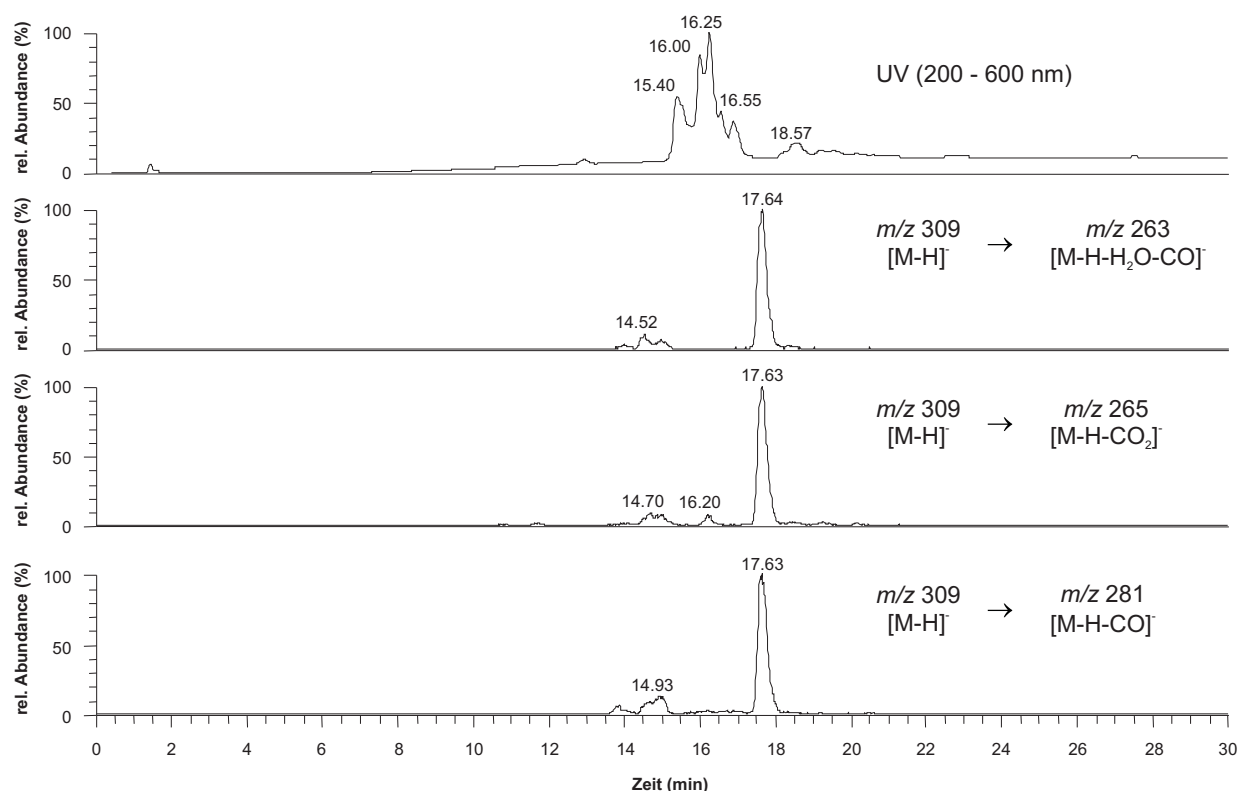


Abbildung 5.15. Nachweis von Hygrophoron C¹² (**51**) im Petrolether-Rohextrakt von *H. agathosmus* mittels HPLC-Negativionen-ESI-SRM.

ten aus dem ¹H-NMR-Screening lässt sich allerdings eine Zuordnung der Konfiguration vornehmen (siehe Tabelle 5.13). So wurden beispielsweise in *H. agathosmus* und *H. poe-tarum* mittels ¹H-NMR nur 4,5-*cis* konfigurierte Hygrophorone detektiert, es handelt sich demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Hygrophorone B¹² (**63**), B¹⁴ (**44**), C¹² (**51**), C¹⁴ (**72**) sowie um die Acetylhygrophorone C¹² (**50**) und C¹⁴ (**75**). Dabei wurden bisher die Hygrophorone B¹² (**63**) und C¹⁴ (**72**) sowie das Acetylhygrophoron C¹⁴ (**75**) nicht als Reinsubstanz charakterisiert. Vom Methanol-Extrakt von *H. korhonenii* liegen keine ¹H-NMR Daten vor, so dass hier keine Zuordnung der Konfiguration vorgenommen werden konnte.

Massenspektrometrische Methoden sind deutlich empfindlicher als Methoden der Kernresonanzspektroskopie. So überrascht es auch nicht, dass mittels SRM Hygrophorone nachgewiesen wurden, die mit ¹H-NMR nicht detektierbar waren. Beispielsweise konnten in *H. discoideus* Spuren zweier Typ II-Hygrophorone ($m/z = 311$ und 339) nachgewiesen werden, die beim ¹H-NMR Screening nicht aufgefallen sind. Von diesen Hygrophoronen gibt es daher auch keine ¹H-NMR-Daten für eine Zuordnung der Konfiguration. In *H. discoideus* konnten die 4,5-*trans* konfigurierten Hygrophorone A¹² (**37**) und A¹⁴ (**64**) mittels ¹H-NMR und SRM nachgewiesen werden. Man kann daher annehmen, dass die C-6 oxidierten Hygrophorone auch 4,5-*trans* konfiguriert sind, es sich also um Hygrophoron D¹²

(53) und D¹⁴ (55) handelt. Hygrophoron A¹² (37) und Hygrophoron D¹⁴ (55) wurden bisher nur als semisynthetische Derivate erhalten, Hygrophoron A¹⁴ (64) wurde bisher nicht als Reinsubstanz charakterisiert.

Die Hygrophorone aus *H. agathosmus*, *H. discoideus*, *H. korhonenii*, *H. nemoreus* und *H. poetarum* wurden bisher nicht als Reinsubstanzen isoliert, ihr Drehwert ist nicht bekannt. Außerdem muss durch weitere Untersuchungen bestätigt werden, ob die relative Konfiguration der Hygrophorone an C-6 identisch ist mit den Hygrophoronen aus *H. persoonii* bzw. *H. olivaceoalbus*. Möglicherweise sind in den untersuchten Hygrophorus-Arten C-6-Epimere der Hygrophorone A und B enthalten. In *H. poetarum* und *H. pustulatus* wurden weitere Isomere ($m/z = 311$, 339 und 337) detektiert, deren Struktur es noch aufzuklären gilt.

5.8. Biosynthese der Hygrophorone

5.8.1. Hygrophorone F und G

Vorläufer der γ -Butyrolactone Hygrophoron F¹² (40) und G¹² (41) sind möglicherweise Fettsäuren mit einer Oxocrotonat-Teilstruktur, wie sie aus *H. eburneus* isoliert wurden (Teichert et al. 2005). Nach einer Isomerisierung der C-2/C-3-Doppelbindung und einer Keto-Enol-Tautomerie bildet sich ein Lacton (siehe Abb. 5.16). Die Hydroxygruppe an C-6 wird durch eine Hydroxylierung eingeführt.

5.8.2. Hygrophorone A – E

Jasmonate und Prostaglandine sind strukturell den Hygrophoronen A – E sehr ähnlich. Deren Biosynthese wurde bisher intensiv untersucht.

Ausgangspunkt für die Jasmonatbiosynthese (Bachmann et al. 2002; Maucher et al. 2000) ist die dreifach ungesättigte Linolensäure (78). Sie wird durch die 13-Lipidoxygenase (13-LOX) an C-13 hydroperoxidiert und anschließend durch die 13-Allenoxidsynthase (13-AOS) zum Epoxid (79) umgewandelt. Die Allenoxidcyclase (AOC) faltet die epoxidierte Fettsäure (79) zur *cis*-Oxophytodiensäure (80), einem Cyclopentenon mit zwei Alkylseitenketten. Nach Reduktion der cyclischen Doppelbindung wird eine der beiden Seitenketten durch mehrere β -Oxidationsschritte verkürzt. Die entstehende (+)-7-iso-Jasmonsäure (81) isomerisiert durch Keto-Enoltautomerie leicht zur energetisch bevorzugten (–)-Jasmonsäure (82).

Auch die Biosynthese der Prostaglandine (MacLough et al. 1977) startet mit einer Fettsäure, der vierfach ungesättigten Arachidonsäure (83). Eine Cyclooxygenase (COX) übernimmt von C-13 ein Wasserstoffatom. Das so entstandene Arachidonsäure-Radikal reagiert mit molekularem Sauerstoff zu einem Peroxidradikal, welches cyclisiert. Nach Angriff eines weiteren Sauerstoffmoleküls und Rückübertragung eines Wasserstoffatoms von der Cyclooxygenase (COX) entsteht Prostaglandin G₂. Es ist Ausgangspunkt einer Vielzahl

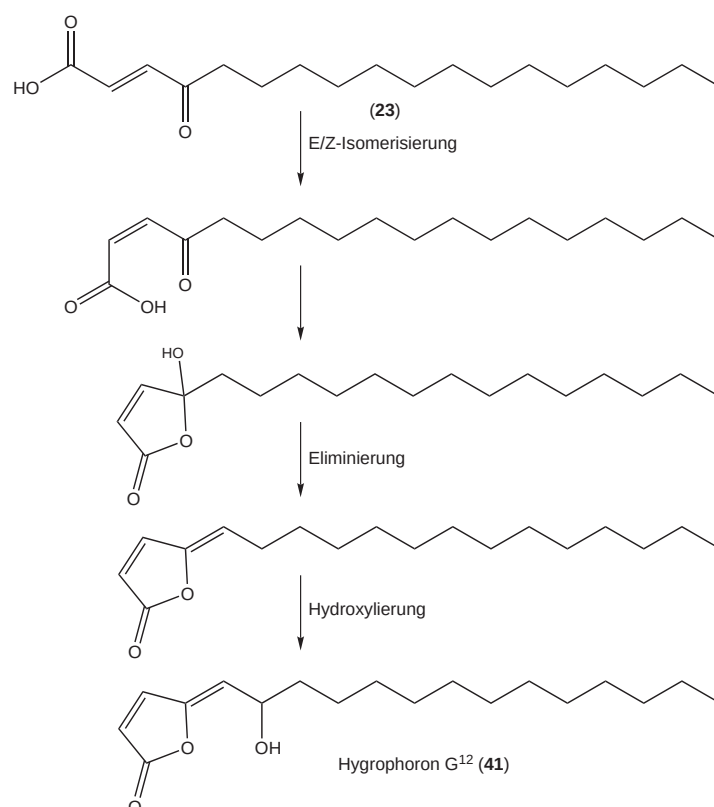


Abbildung 5.16. Postulierte Biosynthese für Hygrophoron G¹² (41) ausgehend von 23.

weiterer Prostaglandine, die daraus mit Hilfe von Isomerasen, Synthetasen, Reduktasen bzw. Oxidasen entstehen (Straus und Glass 2001).

Für die Hygrophorone ist ein ähnlicher Biosyntheseweg vorstellbar. Auch hier kann eine ungesättigte Fettsäure Ausgangspunkt für Oxidation und Cyclisierung sein. Dafür spricht, dass bisher nur Hygrophorone mit geradzahlgiger Kohlenstoffanzahl gefunden wurden. Anschließend muss eine der beiden Alkylseitenketten z. B. durch β -Oxidation vollständig entfernt werden. Da bisher keine β -Oxidation-Intermediate, also Hygrophorone mit einer Alkylierung an C-4, gefunden wurden, ist dieser Weg zweifelhaft.

Baute et al. (1991) konnten aus Myzelkulturen des Ascomyceten *Peziza echinospora* Echinospurin (= Epipentenomycin, 61) isolieren. Aus Kulturen von *Morchella costata* wurde bereits früher von ihnen Microthecin¹ (84) isoliert (Baute et al. 1986). Sie konnten zeigen, dass die Biosynthese sowohl des Epipentenomycins (61) als auch des Microthecin (84) von Anhydrofructose (85) ausgeht. Morcheln sind in der Lage, sowohl endogenes Glycogen als auch Stärke in Anhydrofructose (85) zu spalten (Baute et al. 1988). Wegen des gemeinsamen Startpunkts und einer ähnlichen Struktur postulierten Baute et al. (1991) einen zumindestens teilweise gemeinsamen Biosyntheseweg. Hierbei wird die Anhydrofructose (85) an C-4 dehydratisiert sowie der Ring gespalten. Nach einer Keto-Enol-Tautomerie

¹Microthecin wurde erstmalig aus Kulturen von *Microthecium* isoliert (Naito et al. 1979).

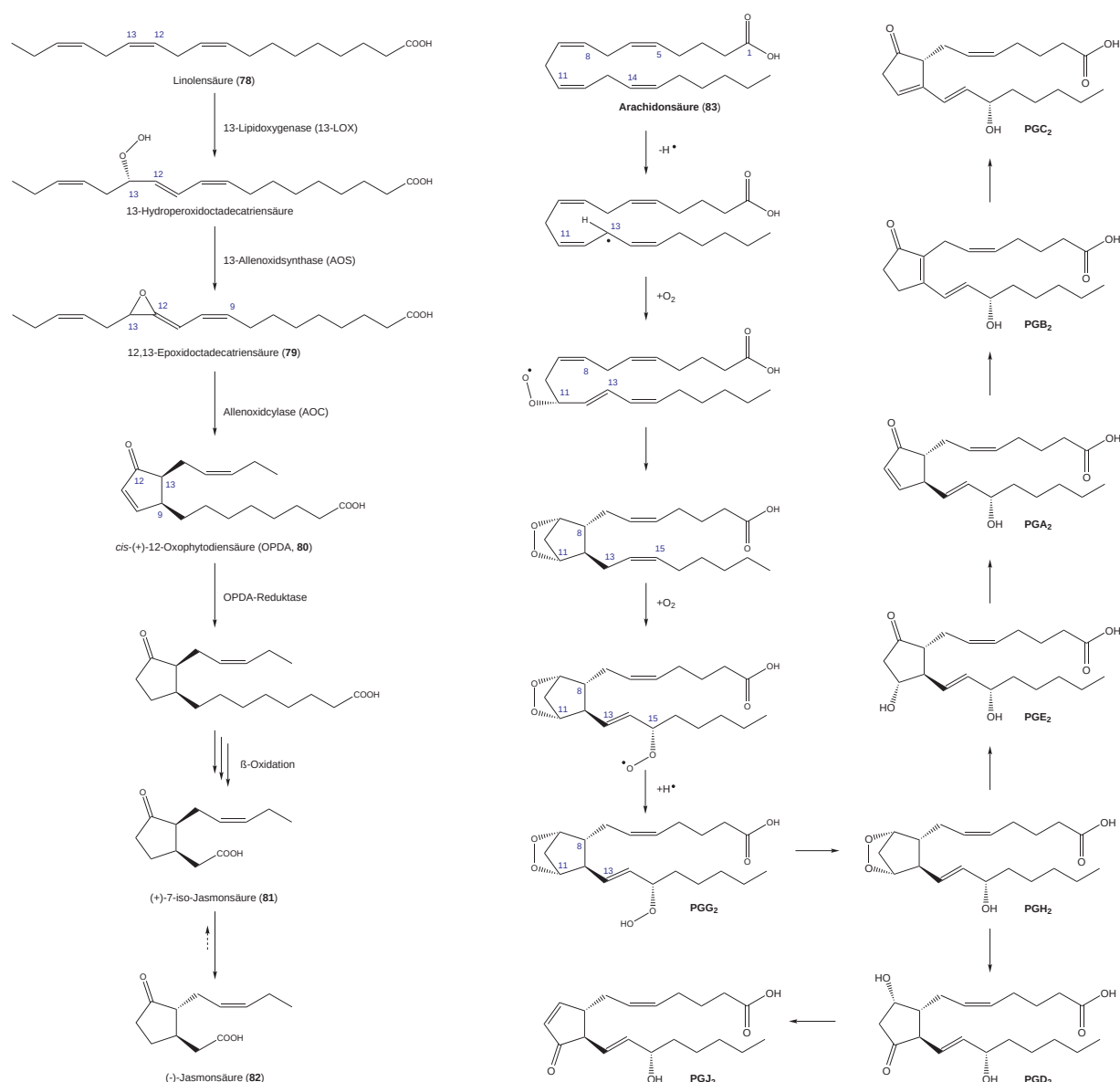


Abbildung 5.17. Biosynthese der Jasmonate ausgehend von Linolensäure (links, nach Maucher et al. 2000) sowie der Prostaglandine ausgehend von Arachidonsäure (rechts, nach MacLouf et al. 1977, Straus und Glass 2001).

verzweigt sich der postulierte Biosyntheseweg. Entweder wird aus dem 2,3-Diketon spontan ein cyclisches Halbacetal gebildet, aus welchem nach Wasserabspaltung racemisches Microthecin (**84**) entsteht oder es entsteht nach stereoselektiver enzymatischer Cyclisierung und anschließender Wasserabspaltung Epipentenomycin (**61**).

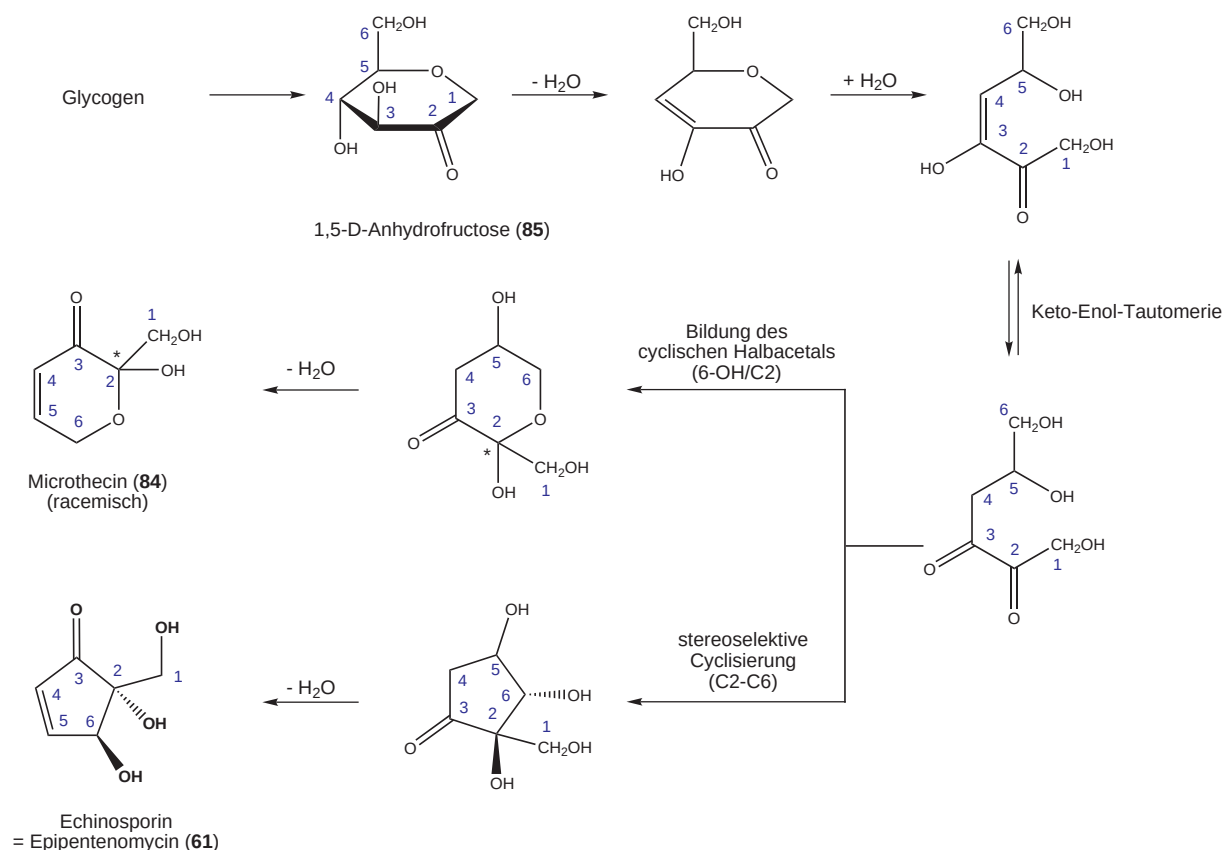


Abbildung 5.18. Postulierte Biosynthese von Epipentenomycin (**61**) und Microthecin (**84**) aus Anhydrofructose (**85**), verändert nach Baute et al. (1991).

In Anlehnung an die Biosynthese des Epipentenomycins kann man sich als Ausgangspunkt für die Biosynthese der Hygrophorone auch einen Zucker vorstellen, der stereospezifisch alkyliert wird.

Als dritte Möglichkeit kann man für die Biosynthese der Hygrophorone A – E sowie F und G einen zumindestens teilweise gemeinsamen Weg postulieren, deren Vorläufer Fettsäuren mit einer Oxocrotonatstruktur sind. Hierbei muss es, ähnlich wie bei der Biosynthese des Epipentenomycins (**61**), eine Verzweigungsstelle geben, an der es entweder zu einer Lactonisierung oder einer C-C-Verknüpfung zwischen C-5 und C-1 kommt. Eine weitere Variante ist die Umlagerung des Lactons zum Cyclopentenon. Sowohl die C-C-Verknüpfung als auch die Umlagerung müssen stereospezifisch verlaufen, da bisher in keiner *Hygrophorus*-Art *cis* und *trans* Hygrophorone gleichzeitig nachgewiesen werden konnten. Cyclopentenone sind durch baseninduzierte Umlagerung von Lactonen synthetisch zugänglich. Dafür wird ein Radikalmechanismus vorgeschlagen (Caddick et al. 2000). Auch für die Biosynthese des Cyclopentenon-Derivats Gyrocyanin (**10**) wird eine Umlagerung aus dem Lacton Atromentinsäure (**5**) diskutiert (Feling 2000; Gill und Steglich 1987) (Feling 2000; Gill und Steglich 1987; siehe auch Abbildung 3.3, S. 14).

5.8.3. Verimpfungsexperimente an Pilzfruchtkörpern

Für die Untersuchung der Biosynthese wurden Verfütterungsexperimente mit 2- ^{13}C markierter Glucose sowie 2- ^{13}C markiertem Natriumacetat durchgeführt. Dazu wurden junge Fruchtkörper von *H. pustulatus*, *H. persoonii* sowie *H. latitabundus* beimpft. Leider konnte mit massenspektrometrischen Methoden kein Einbau in Hygrophorone nachgewiesen werden.

5.8.4. Verimpfungsexperimente an Myzelkulturen

Verimpfungsexperimente von Synthesevorläufern an Submerskulturen haben mehrere Vorteile. Die Untersuchungen sind saisonunabhängig, sie lassen sich standardisieren und die Pilze sind vor natürlichen Fraßfeinden geschützt. In den weltweiten Kultursammlungen sind insgesamt nur fünf *Hygrophorus*-Stämme (1 x CBS², 4 x UAMH³) verzeichnet: *H. calophyllus*, *H. chrysodon*, *H. eburneus*, *H. pustulatus* und *H. russula*, wobei nur die Kultivierung von *H. pustulatus* in ausreichender Quantität gelang. Die übrigen Arten zeigten ein Wachstum < 3 cm/Jahr.

Das Myzel von *H. pustulatus* wächst auf Malz-Pepton-Medium relativ schnell, leider bildet es weder dort noch auf Moser B-Nährboden Fruchtkörper. In den Myzelkulturen konnten keine Hygrophorone nachgewiesen werden. Somit scheinen die aus *H. pustulatus* isolierten Verbindungen fruchtkörperspezifische Sekundärmetabolite zu sein. Verimpfungsexperimente an Myzelkulturen erübrigen sich demnach.

5.9. *Rigidoporus lineatus*

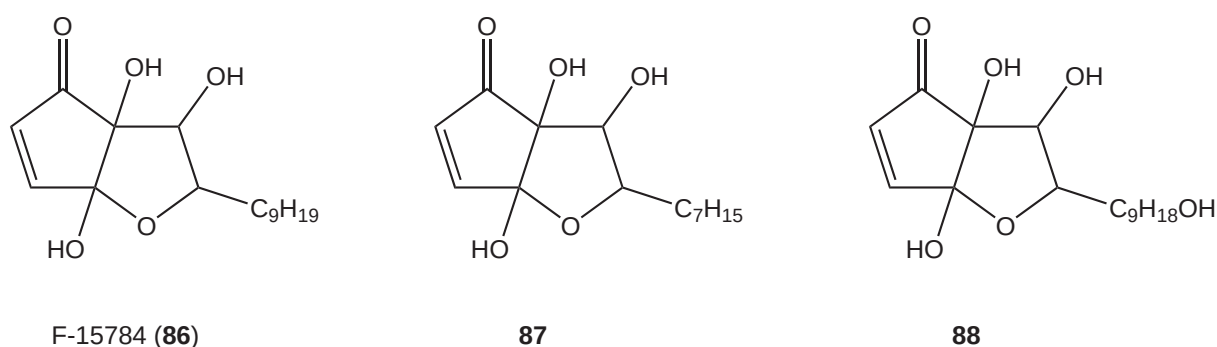


Abbildung 5.19. F-15784 (**86**) sowie weitere Cyclopentenon-Derivate aus *R. lineatus*.

Rigidoporus lineatus (Pers.) Ryvarden ist ein saprophytisch lebender Pilz, der lebendes oder abgestorbenes Holz befällt (Hood et al. 1997). Aus einer Kultur von *R. lineatus*

²Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande

³University of Alberta, Microfungus Collection and Herbarium, Canada



Abbildung 5.20. *Rigidoporus lineatus* auf festem Sojabohnenmehl-Medium.

konnten Takatsu et al. (1982) die Verbindung F-15784 (**86**) isolieren. Dazu ließen sie *R. lineatus* als Schüttelkultur fünf Tage lang in einem Medium aus Stärke, Glycerin, Glucose und Sojabohnenmehl wachsen. Zur Extraktion wurde das Kulturmedium mit Aceton versetzt (1:1), mit Salzsäure angesäuert und gegen Essigester ausgeschüttelt. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel und HPLC an RP-18 konnte aus der Essigesterphase reines F-15784 erhalten werden. Die Ausbeute betrug rund 1.2 g pro Liter Kulturmedium.

Die Struktur von F-15784 (siehe Abbildung 5.19) ist denen der Hygrophorone sehr ähnlich. Es handelt sich dabei, wie bei den Hygrophoronen, um ein Cyclopentenon-Derivat mit einer ungeradzahligen, unverzweigten Alkylkette an C-5 und Hydroxylierungen an C-5 und C-6. An C-4 ist es zum Keton oxidiert. F-15784 hat eine zusätzliche Hydroxylierung an C-7, wobei diese Hydroxygruppe ein cyclisches Halbacetal mit der Ketogruppe an C-4 bildet.

R. lineatus CBS 109425 wurde auf Malz-Pepton und Sojabohnenmehl-Medien emers (auf Agarplatten) bzw. submers, als Stand- sowie als Schüttelkultur kultiviert. Die Kulturen wuchsen sehr schnell mit weißem, nadelförmigem Myzel. Leider produzierte dieser Stamm deutlich geringere Mengen F-15784. Aus 3 Litern Kulturmedium konnte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion, Festphasenextraktion und HPLC eine Fraktion (5 mg) erhalten werden, die F-15784 enthält (ca. 50%, bestimmt mit $^1\text{H-NMR}$). Eine polarere Fraktion enthielt ein Homologes von **86** mit einer Ethyleneinheit weniger in der Seitenkette (**87**), in einer weiteren polaren Fraktion konnte ein hydroxyliertes Derivat (**88**) nachgewiesen werden. $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass es sich dabei wahrscheinlich ein ω -Hydroxy-Derivat von **86** handelt. Aufgrund der geringen Mengen erschienen eine weitere Reinigung sowie eine intensivere Strukturaufklärung nicht sinnvoll.

5.9.1. Fragmentierungsverhalten

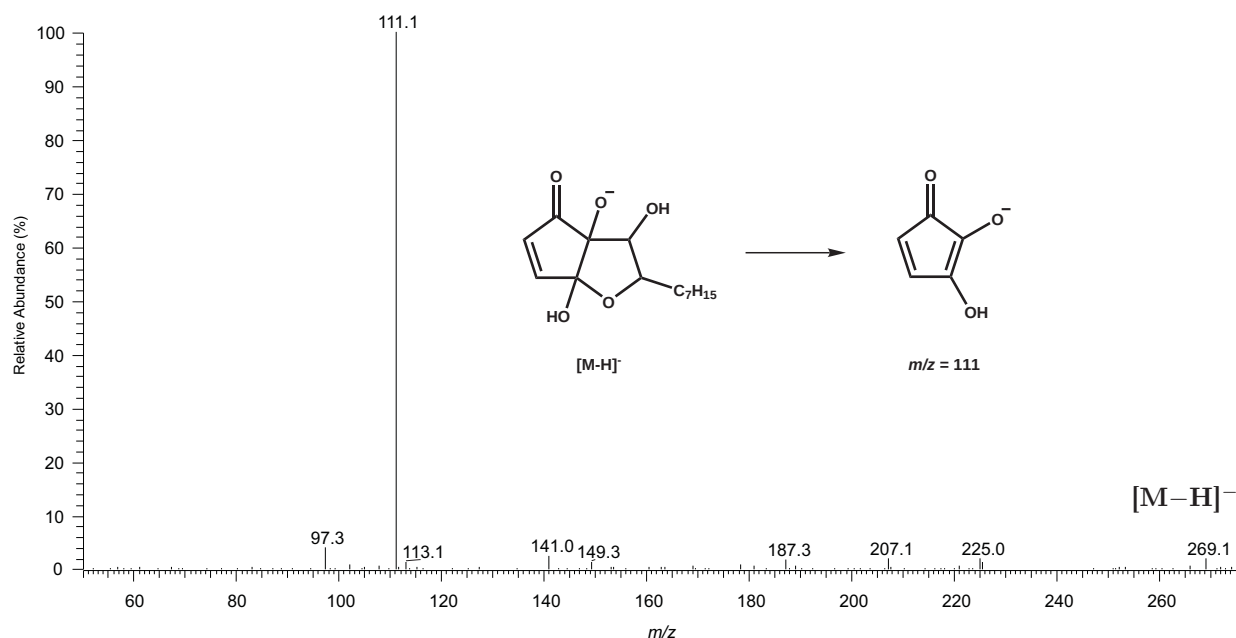


Abbildung 5.21. 13 eV-CID-ESI-MS-Spektrum vom Cyclopentenonderivat **87**.

Mit LC-ESI-MS konnten von **86** und **87** Doppelpicks erhalten werden, wobei sich die MS-Spektren nicht unterscheiden. Es handelt sich daher dabei um Isomere. Entweder liegt ein Gleichgewicht zwischen der offenen Form und dem cyclisierten Halbacetal vor, oder es handelt sich um Diastereomere an C-4, C-5 oder C-6.

Die Cyclopentenon-Derivate **86** – **88** lassen sich gut im negativen Ionisierungsmodus detektieren, als dominierendes Ion (siehe Abbildung 5.21) tritt $m/z = 111$ ($C_5H_3O_3$)⁻ auf. Es entsteht nach Öffnung des Halbacetals und Entfernung der Hydroxyalkylkette durch α -Spaltung zwischen C-5 und C-6.

5.9.2. Verfütterungsexperimente

Zur Aufklärung der Biosynthese der Cyclopentenon-Derivate wurden 2-¹³C-markierte Glucose, 2-¹³C-markiertes Natriumacetat bzw. ein ¹³C-markiertes Fettsäuregemisch zu Kulturen von *R. lineatus* CBS 109425 gegeben. Die Essigester-Rohextrakte wurden nach 14 Tagen Wachstum mit LC-MS untersucht. Dabei konnte ein geringer Einbau von Acetat in **87** (89.0% ¹³C₀, 9.0% ¹³C₁, 2.0% ¹³C₂; Einbaurate = 0.93%) nachgewiesen werden. Hingegen wurde kein Einbau nach Verfütterung von Glukose oder Fettsäuren festgestellt.

Mit SRM (Selected Reaction Monitoring) wurde anschließend untersucht, ob ein spezifischer Einbau stattgefunden hat, oder ob das Acetat gleichmäßig im gesamten Molekül eingebaut wurde. Dazu wurde selektiv die Fragmentierung des einfach markierten Pseudomoleküls von **87** ($[M+1-H]^-$, $m/z = 270$) zum unmarkierten Dihydroxycyclopentadienon-

Tabelle 5.14. Untersuchung auf ortspezifischen Einbau in F-15784 (**86**) mit SRM: Intensität der Ionen (in %, normiert auf $m/z = 269 \rightarrow m/z = 111$).

untersuchter Zerfall	unmarkierte Kontrolle	2- ¹³ C-markiertes Natriumacetat
$m/z = 269 \rightarrow m/z = 111$	100.0	100.0
$m/z = 270 \rightarrow m/z = 111^a$	10.4 ± 0.3	16.5 ± 0.6
$m/z = 270 \rightarrow m/z = 112^b$	5.0 ± 0.2	7.7 ± 0.4
$(270 \rightarrow 111)/(270 \rightarrow 112)$	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1

^a ¹³C-Markierung ist nicht im Cyclopentenonring, sondern in der Alkylkette

^b Cyclopentenonring ist ¹³C markiert

Anion (¹²C₅H₃O₃[−], $m/z = 111$) bzw. zum einfach markierten Anion (¹²C₄¹³CH₃O₃[−], $m/z = 112$) beobachtet. Bei spezifischer Markierung sollte sich das Verhältnis der Intensitäten der beiden Fragment-Ionen im Vergleich zur unmarkierten Probe unterscheiden.

Vergleicht man die Fragmentierungen der markierten mit den Fragmentierungen der unmarkierten Probe, kann man feststellen, dass der Zerfall des markierten Ions ($m/z = 270$) sowohl zum Ion $m/z = 111$ als auch zu $m/z = 112$ in der markierten Probe häufiger stattfindet (siehe Tabelle 5.14). Der Grund ist im höheren ¹³C-Anteil der markierten Verbindung zu suchen. Hingegen gibt es keinen Unterschied im Verhältnis der Fragmentierungen $m/z = 270 \rightarrow m/z = 111$ bzw. $m/z = 112$. Daher ist ein unspezifischer, statistischer Einbau in alle C-Positionen von **86** wahrscheinlich.

5.10. Biotest

5.10.1. Antifungische Aktivität

Die isolierten Hygrophorone wurden, soweit sie in ausreichender Reinheit und Menge vorhanden waren, auf antifungische Aktivität untersucht. Als Testsystem kam hier der von [Gottstein et al. \(1982\)](#) entwickelte Sprühtest mit dem Phytopathogen *Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arth als Testorganismus zur Anwendung. Dazu wurden auf eine Kieselgelplatte die in Methanol gelösten Reinsubstanzen gegeben und nach Entfernen des Lösungsmittels die Platte mit einer wässrigen, nährstoffhaltigen Sporensuspension von *C. cucumerinum* besprüht. Nach zwei Tagen Lagerung in einer wasserdampfgesättigten Kammer war die Platte mit einem grünlich bis dunkelgrauen Myzel überzogen, wobei fungizid, fungitoxisch oder fungistatisch wirksame Verbindungen als weiße Flecken (Hemmhof) erkennbar waren. Eine halbquantitative Abschätzung des antifungischen Potentials von Verbindungen mit ähnlicher Polarität, ähnlichem Diffusionsverhalten sowie ähnlicher Flüchtigkeit kann anhand der Fleckengröße und -intensität erfolgen.

Die Größen der Hemmflächen der getesteten Hygrophorone sind in Tabelle 5.15 zusammengefasst. Alle getesteten Hygrophorone zeigen Aktivität gegen *C. cucumerinum*. Dabei

zeigt 4-*O*-Acetylhygrophoron A¹² (**32**) die größte Aktivität. Auffällig ist, dass vor allem polarere Hygrophorone größere Hemmflächen erzeugen als unpolarere.

5.10.2. Antibakterielle Aktivität

4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron A¹² (**31**), 4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron A¹⁴ (**34**), 4-*O*-Acetylhygrophoron D¹² (**52**), 4-*O*-Acetylhygrophoron D¹⁴ (**54**) und 1,4-Di-*O*-acetylhygrophoron E¹² (**56**) wurden auf ihr antibakterielles Potential untersucht. Dazu wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MIC) gegen verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterienstämme untersucht. Unter diesen Stämmen befanden sich auch klinische Isolate mit verschiedenen Resistenzen, u. a. auch gegen Vancomycin und Ciprofloxacin. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.16 zusammengefasst. Dabei war **31** die aktivste Substanz mit einer MIC von 0.5 bis 2 µg/ml gegen Gram-positive Bakterien. Diese Aktivität ist ähnlich der Aktivität der Vergleichsantibiotika Vancomycin, Linezolid und Ciprofloxacin. Die MIC der Verbindungen **34**, **52** und **54** ist um den Faktor 5 - 10 höher. Die Verbindungen **31**, **34**, **52** und **54** zeigten hohe Aktivität selbst gegen resistente Bakterienstämme. Verbindung **56** zeigte kaum noch antibakterielle Aktivität. Hier ist die Ketogruppe zu einer Acetoxygruppe reduziert. Außer gegen *Moracella* zeigten die untersuchten Hygrophorone keine Aktivität gegen Gram-negative Bakterien. Sie sind hingegen aktiv gegen einen zellwandpermeablen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Bei der Untersuchung der antibakteriellen Aktivität gegen *S. aureus* in 50% Serum, konnte keine Aktivität mehr festgestellt werden. Ursache dafür ist entweder eine sehr hohe, unspezifische Bindung der Hygrophorone an Serumproteine oder möglicherweise eine Deaktivierung der Hygrophorone durch Michael-Addition von Nucleophilen (z.B. durch Cystein) an die Doppelbindung des Cyclopentenon-Gerüsts.

5.10.3. Membranintegrität

Um den Wirkungsmechanismus der Hygrophorone zu verstehen wurde deren Einfluss auf die Bakterienmembran getestet. Dazu wurde in Anlehnung an Roth et al. (1997) zu einer Bakteriensuspension von *S. aureus* der membranundurchgängige, DNA bindende Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green gegeben. Ungebundenes SYTOX Green fluoresziert praktisch nicht. Er fluoresziert erst, wenn er an DNA oder RNA gebunden ist. Lysierte Bakterien dienten als 100% Positivkontrolle. Damit ist die gemessene Fluoreszenz ein Marker für die

Tabelle 5.15. Hemmflächen (in mm²) ausgewählter Hygrophorone nach Applizierung von 20 bzw. 40 µg Reinsubstanz. Eine größere Hemmfläche korreliert mit einer höheren antifungischen Aktivität.

	31	32	34	50	51	52	53	54	59	40
20 µg	23	188	2	86	55	55	83	14	1	43
40 µg	40	217	6	148	90	82	170	15	28	64

Tabelle 5.16. Antibakterielle Aktivität ausgesuchter Hygrophorone gegen verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterienstämme. Vancomycin, Linezolid und Ciprofloxacin dienen als Referenzantibiotika (Minimale Hemmkonzentration in $\mu\text{g/ml}$)

Organismus	31	34	52	54	56	Vanco- mycin	Line- zolid	Cipro- floxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	>32	4	4	>32	0.5	2	0.25
<i>S. aureus</i> I6 ^a	0.5	4	8	4	>32	0.5	0.5	>32
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0.5	4	4	2	>32	2	2	0.5
<i>E. faecium</i> vanA E25_1 ^b	0.5	4	4	2	>32	>32	2	>32
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	0.5	8	>32	>32	32	0.5	1	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>128	>32	>32	>32	>32	>32	>32	<0.03
<i>E. coli</i> AS 19 ^c	>128	>32	>32	32	>32	>32	8	<0.03
<i>Haemophilus influenzae</i> 11	>128	>32	16	32	>32	>32	8	<0.03
<i>Moraxella catarrhalis</i> 117	0.25	4	2	2	4	>32	8	<0.03
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	>128	>32	>32	>32	>32	>32	>32	0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>128	>32	>32	>32	>32	>32	>32	0.25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SKY54 ^c	8	4	1	2	>32	>32	>32	>32

^a resistent gegen Methicillin (MRSA) und Ciprofloxacin, ^b ciprofloxacin- und vancomycinresistent,

^c Zellwand bzw. Zellmembran permeable Mutante

Membranintegrität. In Abbildung 5.22 ist die so gemessene Membranintegrität in Abhängigkeit der Konzentration des untersuchten Hygrophorons zusätzlich zur Wachstumshemmung aufgetragen. Das Antibiotikum Vancomycin diente als Vergleich. Die Zerstörung der Bakterienmembran verläuft parallel zur Wachstumshemmung. Die untersuchten Hygrophorone zerstören demnach wahrscheinlich die Bakterienmembran und hemmen so das Bakterienwachstum. Obwohl es einige Unterschiede in der MIC verschiedener Gram-positiver Bakterien gibt, scheint die Zerstörung der Membran unspezifisch zu sein. Dafür spricht auch, dass 31 bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ hämolytisch aktiv ist.

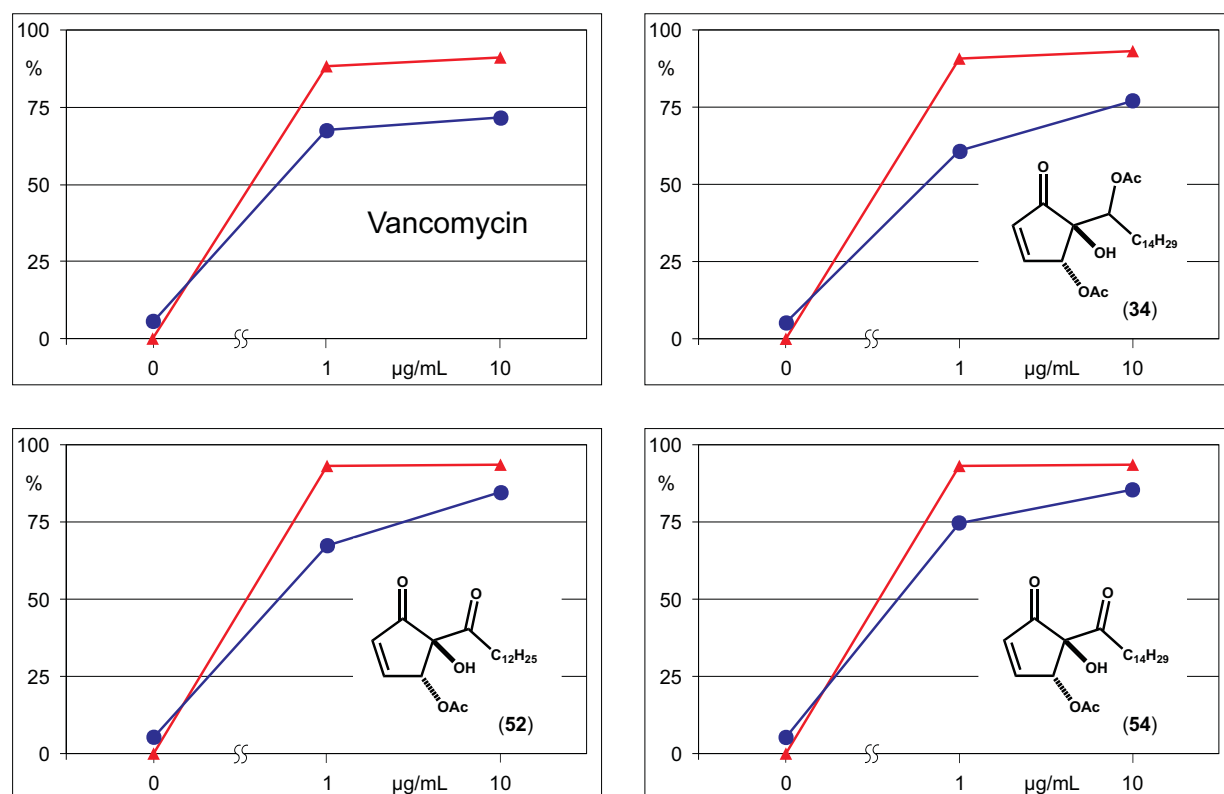


Abbildung 5.22. Test auf Wachstumshemmung (▲) und Membranintegrität (●) ausgewählter Hygrophorone, Testorganismus *Staphylococcus aureus*.

5.10.4. Aktivität gegen *Phytophthora infestans*

Der Oomycet *Phytophthora infestans* ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule von Kartoffeln (Erwin und Ribeiro 1996). 4,6-Di-O-acetylhygrophoron A¹² (31), 4,6-Di-O-acetylhygrophoron A¹⁴ (34), 4-O-Acetylhygrophoron D¹² (52) und 4-O-Acetylhygrophoron D¹⁴ (54) wurden auf Wachstumshemmung getestet (siehe Abbildung 5.23). 31 und 34 zeigen keinen Einfluss auf das Wachstum von *P. infestans*, die Aktivitäten von 52 und 54 sind moderat, wobei das Derivat mit der längeren Alkylkette (54) stärker aktiv ist.

Zusätzlich wurde der Einfluss von 31 auf die Keimung der Zoosporen von *P. infestans* untersucht. Bei einer Konzentration von 50 μM keimen nur noch 21% aller Keime (im Vergleich zu 76% Kontrolle). Unter dem Mikroskop sieht so aus, als ob 31 die äußere Membran der Zoosporen auflöst.

Hygrophorone haben keinen oder nur einen sehr schwachen Einfluss auf das Wachstum von *P. infestans*, allerdings unterdrücken sie die Keimung der Zoosporen, wahrscheinlich durch Auflösung der äußeren Membran.

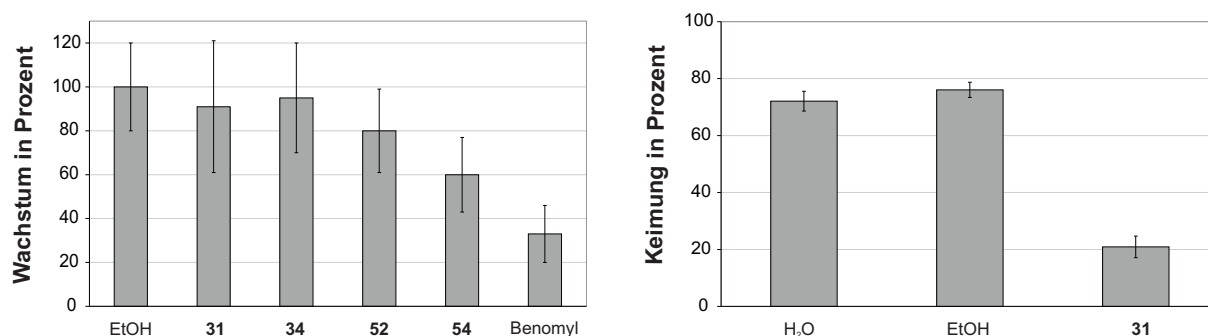


Abbildung 5.23. Wachstumshemmung (links) und Keimungshemmung (rechts) des Phytophathogens *Phytophthora infestans* durch Hygrophorone (50 µM).

5.11. Vergleich der Hygrophorone mit Naturstoffen

Cyclopentenonderivate sind vielfältig als Naturstoffe beschrieben. Umino et al. (1973) konnten aus Kulturen von *Streptomyces eutythermus* Pentenomycin I (**62**) und dessen 4-Acetat-Derivat Pentenomycin II (**89**) isolieren. Die beiden Substanzen haben eine moderate Aktivität gegenüber Gram-positive und Gram-negative Bakterien. Einige Jahre später isolierten Bernillon et al. (1989) aus Fruchtkörpern von *Peziza* sp. das C5-Epimer Epipentenomycin (**61**), welches zuvor schon synthetisch hergestellt worden war (Smith III. und Pilla 1980; Shono et al. 1980). Epipentenomycin (**61**) ist aktiv gegen Gram-positive Bakterien, zeigt aber keine Aktivität gegen Gram-negative Bakterien oder gegen Pilze (Bernillon et al. 1989; Baute et al. 1991).

Noble et al. (1978) konnten aus Kulturen von *Streptomyces cattleya* das Cyclopentendion G2201-C (**90**) isolieren. **90** ist moderat aktiv gegen Gram-positive Bakterien, schwach aktiv gegen Gram-negative Bakterien und inaktiv gegen Pilze. G2201-C (**90**) ist toxisch gegen Mäuse (LD_{50,i.p.} ≈ 19 mg/kg). Hingegen überlebten Mäuse nach intravenöser Injektion von Pentenomycin I (**62**, 400 mg/kg) bzw. II (**89**, 150 mg/kg) mehr als 24 Tage (Umino et al. 1973).

Ein isomeres Cyclopentenon-Derivat mit der Hydroxyethylgruppe an C-4 ist Pentenocin B (**91**), welches aus Kulturen von *Trichoderma hamatum* isoliert wurde (Matsumoto et al. 1999; Ohira et al. 2004). **91** ist beim Screening auf ICE-Inhibitoren aufgefallen. ICE (Interleukin-1β Converting Enzyme) ist für die Auslösung von Entzündungsreaktionen verantwortlich.

Die größten strukturellen Ähnlichkeiten (siehe Abb. 5.24) mit den Hygrophoronen haben FR96001M (**92**) aus *Cyphellopsis anomala* (Rasser 2001; Berglund 2001) sowie F-15784 (**86**) aus *R. lineatus* (Takatsu et al. 1982, siehe auch Abschnitt 5.9 Seite 58). F-15784 (**86**) ist aktiv gegen Pilze wie *Candida albicans*, *Aspergillus niger* oder *Trichophyton mentagrophytes*.

FR96001M (**93**) zeigt hohe Aktivität gegen Gram-positive Bakterien. **93** ist weniger sensitiv bei Gram-negativen Bakterien sowie filamentösen Pilzen und Hefen. Außerdem zeigt

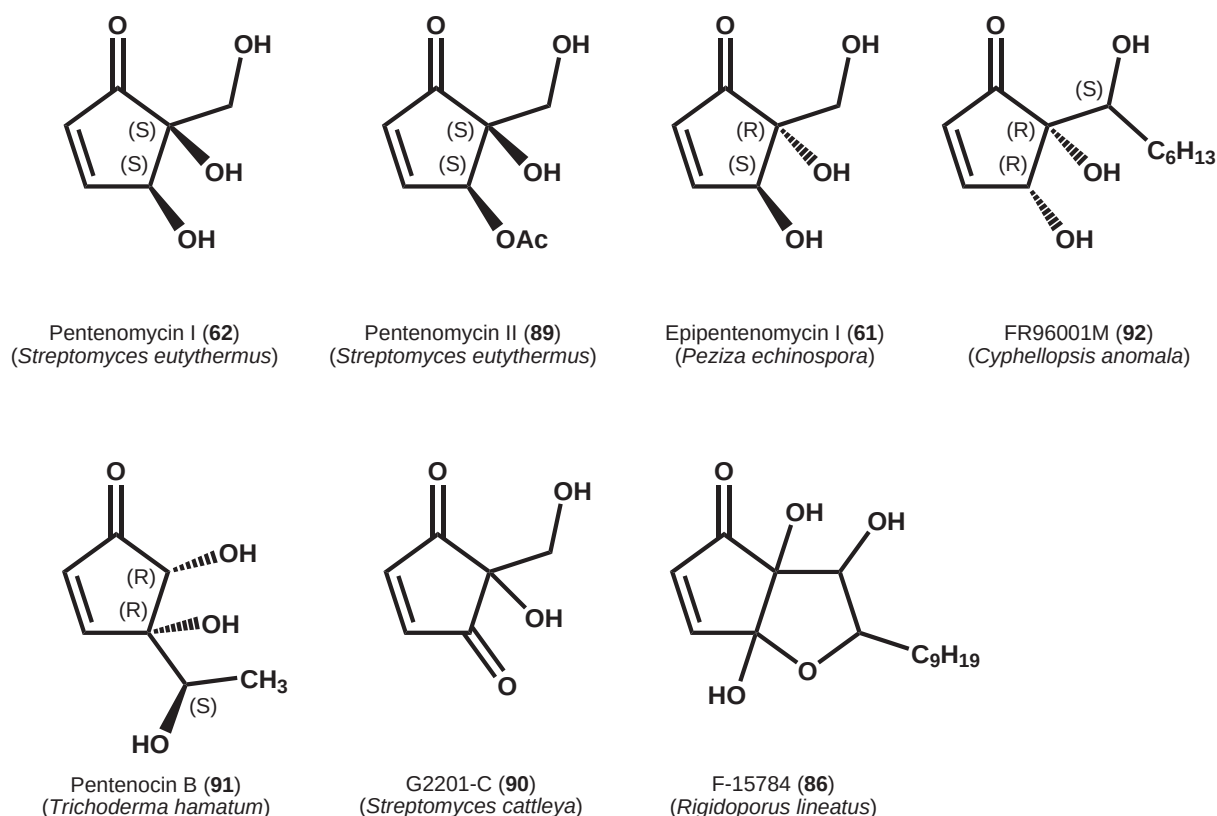


Abbildung 5.24. Strukturell verwandte Naturstoffe

93 eine hohe Cytotoxizität gegen verschiedene menschliche Zelllinien (z. B. HeLaS3, Colo-320, COS7) sowie Phytotoxizität auf das Spross- und Wurzelwachstum von Hirse (*Setaria italica*) und Kresse (*Lepidium sativum*). Semisynthetische Derivate (Berglund 2001) zeigen ähnliche biologische Wirkungen, wobei das 2,3-Dihydroderivat kaum noch antibiotische Aktivitäten aufweist. Das scheint darauf hinzuweisen, dass die Doppelbindung im Cyclopentenonsystem wichtig für die biologische Wirkung ist. Rasser (2001) konnte weiterhin feststellen, dass sich die antibiotische Aktivität steigern ließ, indem die Substanz unpolarer gemacht wurde.

Alle hier vorgestellten Cyclopentenone weisen antibiotische Aktivitäten auf, wobei sie sich in ihrem Wirkspektrum unterscheiden. Wurden sie auf bakterielle Wirksamkeit getestet, fielen sie durch Aktivität vor allem gegen Gram-positive Bakterien auf. Die Wirksamkeit gegen Gram-negative Bakterien war nicht einheitlich, aber immer schwächer als gegen Gram-positive Bakterien. Auch die Hygrophorone zeigen antibiotische Aktivität gegen Gram-positive Bakterien, sie sind schwächer bis kaum aktiv gegen Gram-negative Bakterien. Außerdem sind sie gegen Pilze aktiv, wobei sie vermutlich hauptsächlich die Keimung der Sporen verhindern.

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, Quellentemp. 200°C ; Säule DB-5MS (J&W, 30 m x 0.25 mm, 0.25 μm Filmdicke), Injektionstemp. 250°C , Interfacetemp. 300°C , Trägergas He, Flussrate 1.0 ml/min, konstanter Fluss, splittlose Injektion, Säulentemperaturprogramm: 60°C für 1 min, dann Anstieg auf 300°C mit 10 K/min, isothermisch bei 300°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 (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- H_2O -Gemischen mit ansteigendem H_2O -Gehalt gespült. Die Probe wurde im 1. Elutionslösungsmittel gelöst oder suspendiert und auf die Kartusche gegeben. Anschließend wurde mit MeOH- H_2O -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 & Na- gel)
Säule 3:	Nucleosil 100 RP-18 Säule (7 μm , 250 x 1 mm ID, Fa. Macherey & Na- gel)
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 benutzt. Diese wurden 15 min 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 ^1H -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% *aqu.* 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 A^{12} (**31**, $R_t = 32.8$ min) und 12.6 mg 4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron A^{14} (**34**, $R_t = 38.7$ min) zu erhalten. Fraktionen von 28.0 – 31.0 min enthielten 1.3 mg 4-*O*-Acetylhygrophoron A^{12} (**32**) und 1.7 mg 6-*O*-Acetylhygrophoron A^{12} (**33**), welche durch wiederholende HPLC (Säule 3, Gradient 2) voneinander

Tabelle 6.2. Für das ^1H -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% *aqu.* 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: 1300 – 1900 ml (31.0 mg) und Fraktion III: 2170 – 2490 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 Bačinić (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 1 l-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 1l-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 2218968). 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 μM in 96er Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierzu wurden 100 μl Medium mit 100 μl Sporensuspension (5 000 Sporen) beimpft. Nach 16 Stunden Inkubation bei 18 °C im Dunklen wurden 0.5 μl 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:

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

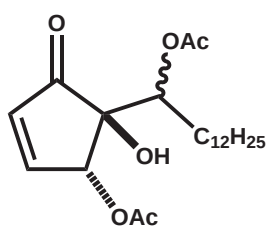
Es wurden drei unabhängige Experimente mit je 8 Wiederholungen für jede zu testende Substanz durchgeführt. Benomyl ($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$) diente als Positivkontrolle, reines Lösungsmittel (1% EtOH) als Negativkontrolle. Die äußeren Wells enthielten nur Medium und 100 μl Wasser.

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 μM (1% EtOH) beträgt. Nach Zugabe von 100 μl 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.

7. Charakterisierung

4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron **A**¹² (**31**)



4,5-*trans*-4-Acetoxy-5-hydroxy-5-(1-acetoxytridecyl)-2-cyclopenten-1-on

farbloses Öl

isoliert aus *H. persoonii* Arnolds

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ¹H ppm: 7.462 *dd* (6.2/2.1) H-3, 6.441 *dd* (6.2/1.8) H-2, 5.721 *dd* (2.1/1.8) H-4, 5.017 *m* H-6, 3.247 *br s* 5-OH, 2.136 *s* 4-OAc, 1.996 *s* 6-OAc, 1.7 *m* H-7, 1.20 – 1.33 *m* H-8 – H-17, 0.888 *t* (7.0) H-18

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ¹³C ppm: 202.3 C-1, 170.5 4-OAc, 169.9 6-OAc, 156.8 C-3, 134.4 C-2, 81.4 C-5, 79.7 C-4, 74.1 C-6, 28.7 C-7, 31.8, 29.63, 29.59, 29.57, 29.5, 29.4, 29.34, 29.28, 25.9, 22.6 C-8 – C-17, 20.9 4-OAc, 20.7 6-OAc, 14.1 C-18

ESI-FT-ICR-MS *m/z* 419.23986 ([M+Na]⁺, ber. für C₂₂H₃₆NaO₆⁺ 419.24041)

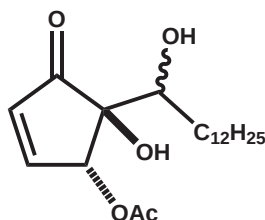
(+)-ESI-CID-MS (–13 eV) *m/z* (rel. int., %): 397 (13, [M+H]⁺), 379 (31, [M+H–H₂O]⁺), 337 (100, [M+H–HOAc]⁺), 319 (16, [M+H–HOAc–H₂O]⁺), 295 (30, [M+H–HOAc–CH₂CO]⁺), 277 (60, [M+H–2 HOAc]⁺), 259 (7, [M+H–2 HOAc–H₂O]⁺), 123 (30, [C₇H₇O₂]⁺), 111 (4, [C₆H₇O₂]⁺)

(–)-ESI-CID-MS (+20 eV) *m/z* (rel. int., %): 395 (2, [M–H][–]), 353 (8, [M–H–CH₂CO][–]), 335 (42, [M–H–HOAc][–]), 307 (13, [M–H–HOAc–CO][–]), 293 (100, [M–H–HOAc–CH₂CO][–]), 291 (21, [M–H–HOAc–CO₂][–]), 275 (14, [M–H–2 HOAc][–]), 263 (8), 249 (6), 139 (2, [C₇H₇O₃][–]), 95 (5), 59 (20)

[α]_D²³ +53.0° (MeOH; *c* 0.940)

$\nu_{\text{max}}^{\text{film}} \text{ cm}^{-1}$	3470 (br, w), 2955 (m), 2924 (s), 2854 (s), 1746 (s), 1729 (s), 1653 (vw), 1595 (vw), 1465 (m), 1435 (w), 1372 (m), 1329 (vw), 1233 (s), 1192 (w), 1118 (w), 1100 (m), 1070 (m), 1035 (m), 912 (w), 828 (vw), 769 (vw), 719 (vw)
DC	LM 1: $R_f = 0.67$, LM 2: $R_f = 0.49$
Chirale HPLC	(Gradient 11) Säule: OD-H: $R_t = 12.2 \text{ min}$, OB-H: $R_t = 12.9 \text{ min}$, AS-H: $R_t = 14.1 \text{ min}$, AD-H: $R_t = 12.5 \text{ min}$.

4-*O*-Acetylhygrophoron **A**¹² (32)

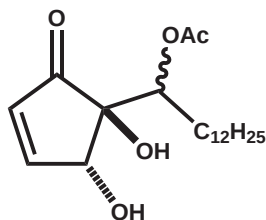


4,5-*trans*-4-Acetoxy-5-hydroxy-5-(1-hydroxytridecyl)-2-cyclopenten-1-on

farbloses Öl

isoliert aus *H. persoonii* Arnolds

$^1\text{H-NMR}$	(500 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 7.561 <i>dd</i> (6.1/2.2) H-3, 6.437 <i>dd</i> (6.1/1.6) H-2, 5.801 <i>dd</i> (2.2/1.6) H-4, 3.725 <i>dt</i> (9.6/3.0) H-6, 3.185 <i>br s</i> 5-OH, 2.39 <i>br d</i> (3.0) 6-OH, 2.171 <i>s</i> 4-OAc, 1.7 <i>m</i> H-7, 1.20 – 1.33 <i>m</i> H-8 – H-17, 0.880 <i>t</i> (7.0) H-18
$^{13}\text{C-NMR}$	(125 MHz, CDCl_3) δ ^{13}C ppm: 204.7 C-1, 170.2 4-OAc, 161.4 C-3, 134.9 C-2, 81.4 C-5, 79.3 C-4, 74.4 C-6, 32 – 22 C-7 – C-17, 20.8 4-OAc, 14.0 C-18
ESI-FT-ICR-MS	m/z 377.23084 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{NaO}_5^+$ 377.22984)
(+)-ESI-CID-MS	(-15 eV) m/z (rel. int., %): 355 (4, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 295 (100, $[\text{M}+\text{H}-\text{HOAc}]^+$), 277 (14, $[\text{M}+\text{H}-\text{HOAc}-\text{H}_2\text{O}]^+$), 267 (8, $[\text{M}+\text{H}-\text{HOAc}-\text{CO}]^+$), 259 (7, $[\text{M}+\text{H}-\text{HOAc}-2\text{H}_2\text{O}]^+$), 249 (15, $[\text{M}+\text{H}-\text{HOAc}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$), 123 (4, $[\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_2]^+$)
(-)-ESI-CID-MS	(+20 eV) m/z (rel. int., %): 353 (2, $[\text{M}-\text{H}]^-$), 293 (100, $[\text{M}-\text{H}-\text{HOAc}]^-$), 275 (4, $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{HOAc}]^-$), 265 (15, $[\text{M}-\text{H}-\text{HOAc}-\text{CO}]^-$), 139 (4, $[\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_3]^-$)
DC	LM 1: $R_f = 0.30$

6-*O*-Acetylhygrophoron A¹² (33)

4,5-*trans*-4,5-Dihydroxy-5-(1-acetoxytridecyl)-2-cyclopenten-1-on

farbloses Öl

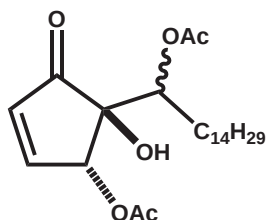
isoliert aus *H. persoonii* Arnolds

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ¹H ppm: 7.524 *dd* (6.1/2.0) H-3, 6.316 *dd* (6.1/1.8) H-2, 5.145 *dt* (10.4/2.9) H-6, 4.835 *ddd* (6.7/2.0/1.8) H-4, 3.012 *d* (6.7) 4-OH, 2.958 *s* 5-OH, 2.045 *s* 6-OAc, 1.7 *m* H-7, 1.20 – 1.33 *m* H-8 – H-17, 0.880 *t* (7.0) H-18

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ¹³C ppm: 204.5 C-1, 171.2 6-OAc, 158.1 C-3, 132.5 C-2, 82.8 C-5, 78.8 C-4, 75.4 C-6, 32 – 22 C-7 – C-17, 21.1 6-OAc, 14.0 C-18

ESI-FT-ICR-MS m/z 377.22897 ([M+Na]⁺, ber. für C₂₀H₃₄NaO₅⁺ 377.22984)

DC LM 1: R_f = 0.30

4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron A¹⁴ (34)

4,5-*trans*-4-Acetoxy-5-hydroxy-5-(1-acetoxypentadecyl)-2-cyclopenten-1-on

farbloses Öl

isoliert aus *H. persoonii* Arnolds

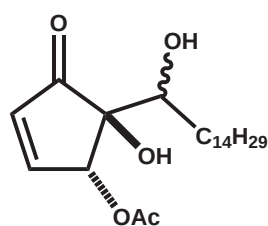
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ¹H ppm: 7.462 *dd* (6.2/2.1) H-3, 6.441 *dd* (6.2/1.8) H-2, 5.721 *dd* (2.1/1.8) H-4, 5.017 *m* H-6, 3.247 *s* 5-OH, 2.136 *s* 4-OAc, 1.996 *s* 6-OAc, 1.7 *m* H-7, 1.20 – 1.33 *m* H-8 – H-19, 0.888 *t* (7.0) H-20

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ¹³C ppm: 202.1 C-1, 170.7 4-OAc, 170.0 6-OAc, 156.8 C-3, 134.5 C-2, 81.6 C-5, 79.9 C-4, 74.1 C-6, 28.8 C-7, 32.0, 29.80, 29.79, 29.77, 29.76, 29.74, 29.69, 29.58, 29.51, 29.47, 26.1, 22.8 C-8 – C-19, 21.1 4-OAc, 20.9 6-OAc, 14.3 C-20

ESI-FT-ICR-MS m/z 447.27221 ([M+Na]⁺, ber. für C₂₄H₄₀NaO₆⁺ 447.27171)

(+)-ESI-CID-MS	(-13 eV) m/z (rel. int., %): 425 (12, $[M+H]^+$), 407 (23, $[M+H-H_2O]^+$), 365 (100, $[M+H-HOAc]^+$), 347 (15, $[M+H-HOAc-H_2O]^+$), 323 (38, $[M+H-HOAc-CH_2CO]^+$), 305 (83, $[M+H-2 HOAc]^+$), 287 (14, $[M+H-2 HOAc-H_2O]^+$), 277 (4), 259 (4), 123 (55, $[C_7H_7O_2]^+$)
(-)-ESI-CID-MS	(+20 eV) m/z (rel. int., %): 423 (13, $[M-H]^-$), 405 (4, $[M-H-H_2O]^-$), 381 (8, $[M-H-CH_2CO]^-$), 363 (54, $[M-H-HOAc]^-$), 335 (5, $[M-H-HOAc-CO]^-$), 321 (100, $[M-H-HOAc-CH_2CO]^-$), 303 (7, $[M-H-2 HOAc]^-$), 205 (8), 59 (37)
$\nu_{\max}^{\text{film}} \text{ cm}^{-1}$	3447 (br, w), 2950 (m), 2923 (s), 2852 (s), 1744 (s), 1727 (s), 1645 (vw), 1594 (vw), 1465 (m), 1437 (w), 1371 (m), 1330 (w), 1234 (s), 1119 (w), 1102 (m), 1041 (m), 910 (w), 826 (vw), 753 (vw), 713 (vw)
DC	LM 1: $R_f = 0.67$, LM 2: $R_f = 0.49$

4-*O*-Acetylhygrophoron **A**¹⁴ (**35**)

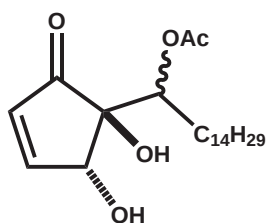


4,5-*trans*-4-Acetoxy-5-hydroxy-5-(1-hydroxypentadecyl)-2-cyclopenten-1-on

farbloses Öl

isoliert aus *H. persoonii* Arnolds

$^1\text{H-NMR}$	(500 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 7.561 <i>dd</i> (6.1/2.2) H-3, 6.437 <i>dd</i> (6.1/1.6) H-2, 5.801 <i>dd</i> (2.2/1.6) H-4, 3.725 <i>dt</i> (9.6/3.0) H-6, 3.185 <i>s</i> 5-OH, 2.39 <i>br</i> 6-OH, 2.171 <i>s</i> 4-OAc, 1.7 <i>m</i> H-7, 1.20 -1.33 <i>m</i> H-8 – H-19, 0.880 <i>t</i> (7.0) H-20
ESI-FT-ICR-MS	m/z 405.26152 ($[M+Na]^+$, ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{NaO}_5^+$ 405.26115)
DC	LM 1: $R_f = 0.30$

6-*O*-Acetylhygrophoron A¹⁴ (36)

4,5-*trans*-4,5-Dihydroxy-5-(1-acetoxypentadecyl)-2-cyclopenten-1-on

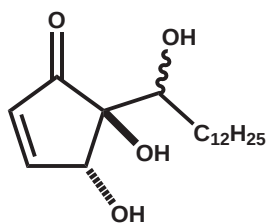
farbloses Öl

isoliert aus *H. persoonii* Arnolds

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ¹H ppm: 7.524 *dd* (6.1/2.0) H-3, 6.316 *dd* (6.1/1.8) H-2, 5.145 *dt* (10.4/2.9) H-6, 4.835 *ddd* (6.7/2.0/1.8) H-4, 3.012 *d* (6.7) 4-OH, 2.958 *s* 5-OH, 2.045 *s* 6-OAc, 1.7 *m* H-7, 1.20–1.33 *m* H-8 – H-19, 0.880 *t* (7.0) H-20

ESI-FT-ICR-MS m/z 405.26152 ([M+Na]⁺, ber. für C₂₂H₃₈NaO₅⁺ 405.26115)

DC LM 1: R_f = 0.30

Hygrophoron A¹² (37)

4,5-*trans*-4,5-Dihydroxy-5-(1-hydroxytridecyl)-2-cyclopenten-1-on

farbloses Öl

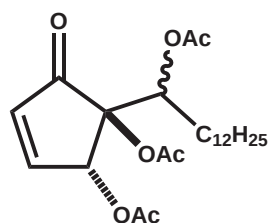
semisynthetisches Derivat von 31

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ¹H ppm: 7.646 *dd* (6.1/2.0) H-3, 6.366 *dd* (6.1/1.6) H-2, 4.873 *dd* (2.0/1.6) H-4, 3.859 *m* H-6, 1.7 *m* H-7, 1.20 – 1.33 *m* H-8 – H-17, 0.880 *t* (7.0) H-18

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ¹³C ppm: 205.7 C-1, 162.7 C-3, 133.1 C-2, 83.4 C-5, 79.5 C-4, 75.6 C-6, 32 – 22 C-7 – C-17, 14.0 C-18

ESI-FT-ICR-MS m/z 335.21881 ([M+Na]⁺, ber. für C₁₈H₃₂NaO₄⁺ 335.21928)

(–)-ESI-CID-MS (+20 eV) m/z (rel. int., %): 311 (7, [M–H][–]), 293 (21, [M–H–H₂O][–]), 265 (6, [M–H–H₂O–CO][–]), 255 (25, [M–H–C₃H₄O][–]), 251 (7), 249 (37, [M–H–CO₂][–]), 239 (15, [M–H–CO–CO₂][–]), 227 (44, [M–H–C₄H₄O₂][–]), 213 (100, [M–H–C₅H₆O₂][–]), 97 (21)

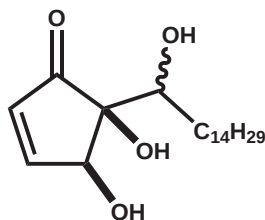
4,5,6-Tri-*O*-acetylhygrophoron **A**¹² (**39**)

4,5-*trans*-4,5-Diacetoxy-5-(1-hydroxytridecyl)-2-cyclopenten-1-on

farbloses Öl

semisynthetisches Derivat von **31**

¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ ¹ H ppm: 7.347 <i>dd</i> (6.4/2.1) H-3, 6.489 <i>dd</i> (6.4/1.8) H-2, 6.244 <i>dd</i> (2.1/1.8) H-4, 5.176 <i>t</i> (6.5) H-6, 2.135 <i>s</i> 4-OAc, 2.123 <i>s</i> 5/6-OAc, 1.983 <i>s</i> 5/6-OAc, 1.7 <i>m</i> H-7, 1.20 – 1.33 <i>m</i> H-8 – H-17, 0.880 <i>t</i> (7.0) H-18
¹³ C-NMR	(125 MHz, CDCl ₃) δ ¹³ C ppm: 197.6 C-1, 154.8 C-3, 135.4 C-2, 170.2 4-OAc, 169.5 5/6-OAc, 169.4 5/6-OAc, 84.3 C-5, 75.6 C-4, 72.1 C-6, 28.8 C-7, 31.9, 29.63, 29.61, 29.59, 29.53, 29.45, 29.39, 29.32, 25.8, 22.7 C-8 – C-17, 20.9 OAc, 20.8 OAc, 20.6 OAc, 14.0 C-18
ESI-FT-ICR-MS	<i>m/z</i> 461.25013 ([M+Na] ⁺ , ber. für C ₂₄ H ₃₈ NaO ₇ ⁺ 461.25097)
(+)-ESI-CID-MS	(-13 eV) <i>m/z</i> (rel. int., %): 439 (1, [M+H] ⁺), 379 (54, [M+H–HOAc] ⁺), 337 (100, [M+H–HOAc–CH ₂ CO] ⁺), 319 (6, [M+H–2 HOAc] ⁺), 295 (70, [M+H–HOAc–2 CH ₂ CO] ⁺), 277 (25, [M+H–2 HOAc–CH ₂ CO] ⁺), 259 (7, [M+H–3 HOAc] ⁺), 231 (3), 123 (9, [C ₇ H ₇ O ₂] ⁺)
$\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ cm ⁻¹	2955 (m), 2925 (s), 2854 (s), 1746 (s), 1731 (s), 1597 (vw), 1465 (w), 1434 (w), 1372 (m), 1355 (w), 1249 (s), 1225 (s), 1185 (w), 1155 (w), 1108 (w), 1073 (w), 1032 (m), 980 (w), 922 (w), 905 (w), 825 (w), 794 (w), 757 (w)
DC	LM 1: R _f = 0.75, LM 2: R _f = 0.62

Hygrophoron B¹⁴ (44)

4,5-*cis*-4,5-Dihydroxy-5-(1-hydroxypentadecyl)-2-cyclopenten-1-on

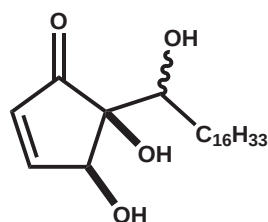
weißer Feststoff

isoliert aus *H. olivaceoalbus* (Fr.) Fr.

¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ ¹ H ppm: 7.644 <i>dd</i> (6.0/2.3) H-3, 6.301 <i>dd</i> (6.0/1.3) H-2, 4.727 <i>dd</i> (2.3/1.3) H-4, 3.777 <i>br d</i> (10.1) H-6, 3.718 <i>br s</i> 6-OH, 3.073 <i>br s</i> 4-OH, 2.196 <i>br s</i> 5-OH, 1.7 <i>m</i> H-7, 1.20 – 1.33 <i>m</i> H-8 – H-19, 0.880 <i>t</i> (7.0) H-20
¹³ C-NMR	(125 MHz, CDCl ₃) δ ¹³ C ppm: 207.3 C-1, 163.5 C-3, 133.5 C-2, 75.8 C-5, 73.3 C-6, 71.4 C-4, 31.2 C-7, 31.9, 29.68, 29.67, 29.65, 29.64, 29.61, 29.56, 29.51, 29.41, 29.35, 26.1, 22.7 C-8 – C-19, 14.1 C-20
ESI-FT-ICR-MS	<i>m/z</i> 363.24825 ([M+Na] ⁺ , ber. für C ₂₀ H ₃₆ NaO ₄ ⁺ 363.25058)
ESI-QqTOF-MS	(CE +15 eV, DP +20 V) <i>m/z</i> (rel. int., %): 341.2686 (4) (C ₂₀ H ₃₇ O ₄ ⁺), 323.2581 (100) (ber. für C ₂₀ H ₃₅ O ₃ ⁺ : 323.2581), 305.2492 (82) (ber. für C ₂₀ H ₃₃ O ₂ ⁺ : 305.2475), 287.2364 (27) (ber. für C ₂₀ H ₃₁ O ⁺ : 287.2369), 277.2525 (13) (ber. für C ₁₉ H ₃₃ O ⁺ : 277.2526), 269.2281 (8) (ber. für C ₂₀ H ₂₉ ⁺ : 269.2264), 259.2405 (30) (ber. für C ₁₉ H ₃₁ ⁺ : 259.2420), 165.0931 (26) (ber. für C ₁₀ H ₁₃ O ₂ ⁺ : 165.0910), 151.0743 (27) (ber. für C ₉ H ₁₁ O ₂ ⁺ : 151.0754), 123.0435 (35) (ber. für C ₇ H ₇ O ₂ ⁺ : 123.0441), 111.0431 (10) (ber. für C ₆ H ₇ O ₂ ⁺ : 111.0441).
(+)-ESI-CID-MS	(-15 eV) <i>m/z</i> (rel. int., %): 341 (3, [M+H] ⁺), 323 (100, [M+H–H ₂ O] ⁺), 305 (73, [M+H–2 H ₂ O] ⁺), 287 (30, [M+H–3 H ₂ O] ⁺), 259 (21, [M+H–3 H ₂ O–CO] ⁺), 245 (15), 165 (16), 147 (15), 123 (16, [C ₇ H ₇ O ₂] ⁺), 111 (10, [C ₆ H ₇ O ₂] ⁺)
(–)-ESI-CID-MS	(+20 eV) <i>m/z</i> (rel. int., %): 339 (9, [M–H] [–]), 321 (42, [M–H–H ₂ O] [–]), 277 (60, [M–H–H ₂ O–CO ₂] [–]), 241 (100, [M–H–C ₅ H ₆ O ₂] [–]), 295 (7, [M–H–CO ₂] [–]), 293 (10, [M–H–H ₂ O–CO] [–]), 283 (24, [M–H–C ₃ H ₄ O] [–]), 279 (10), 267 (21, [M–H–H ₂ O–C ₃ H ₂ O] [–]), 255 (23, [M–H–C ₄ H ₄ O ₂] [–]), 113 (16), 97 (45), 83 (13)

$[\alpha]_D^{23}$	+10.5° (MeOH; <i>c</i> 0.640)
$\nu_{\text{max}}^{\text{film}} \text{ cm}^{-1}$	3509 (m), 3445 (m), 3403 (m), 3372 (m), 2954 (m), 2916 (s), 2871 (m), 2849 (s), 1715 (s), 1696 (s), 1676 (w), 1653 (w), 1595 (w), 1470 (m), 1399 (w), 1355 (w), 1243 (w), 1214 (w), 1115 (m), 1102 (vw), 1078 (m), 1011 (w), 983 (w), 946 (w), 919 (vw), 900 (vw), 843 (m), 791 (w), 720 (w), 687 (w)
DC	LM 1: $R_f = 0.22$, LM 2: $R_f = 0.41$

Hygrophoron B¹⁶ (45)



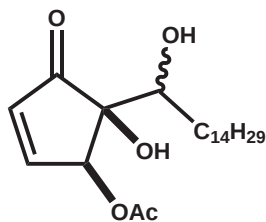
4,5-*cis*-4,5-Dihydroxy-5-(1-hydroxyheptadecyl)-2-cyclopenten-1-on

weißer Feststoff

isoliert aus *H. olivaceoalbus* (Fr.) Fr.

$^1\text{H-NMR}$	(500 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 7.644 <i>dd</i> (6.0/2.3) H-3, 6.301 <i>dd</i> (6.0/1.3) H-2, 4.727 <i>dd</i> (2.3/1.3) H-4, 3.777 <i>br d</i> (10.1) H-6, 3.718 <i>br s</i> 6-OH, 3.073 <i>br s</i> 4-OH, 2.196 <i>br s</i> 5-OH, 1.7 <i>m</i> H-7, 1.2-1.4 <i>m</i> H-8 – H-21, 0.880 <i>t</i> (6.9) H-22
ESI-FT-ICR-MS	m/z 391.28259 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{NaO}_4^+$ 391.28188)
(+)-ESI-CID-MS	(-15 eV) m/z (rel. int., %): 369 (7, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 351 (100, $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$), 333 (35, $[\text{M}+\text{H}-2 \text{H}_2\text{O}]^+$), 315 (31, $[\text{M}+\text{H}-3 \text{H}_2\text{O}]^+$), 287 (38, $[\text{M}+\text{H}-3 \text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$), 259 (12), 241 (21), 147 (18), 123 (15, $[\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_2]^+$), 111 (20, $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2]^+$)
(-)-ESI-CID-MS	(+20 eV) m/z (rel. int., %): 367 (24, $[\text{M}-\text{H}]^-$), 349 (48, $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$), 305 (42, $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^-$), 269 (100, $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2]^-$), 323 (3, $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$), 321 (9, $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^-$), 311 (18, $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{H}_4\text{O}]^-$), 295 (10, $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_2\text{O}]^-$), 283 (24, $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2]^-$), 113 (30), 97 (79), 95 (11), 83 (14)
DC	LM 1: $R_f = 0.22$, LM 2: $R_f = 0.41$

4-*O*-Acetylhygrophoron B¹⁴ (46)



4,5-*cis*-4-Acetoxy-5-hydroxy-5-(1-hydroxypentadecyl)-2-cyclopenten-1-on

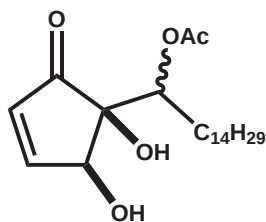
farbloses Öl

semisynthetisches Derivat von 44

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ¹H ppm: 7.588 *dd* (6.2/2.7) H-3, 6.438 *dd* (6.2/1.3) H-2, 5.722 *dd* (2.7/1.3) H-4, 3.818 *m* H-6, 2.156 *s* 4-OAc, 1.7 *m* H-7, 1.20 - 1.33 *m* H-8 – H-19, 0.880 *t* (7.0) H-20

ESI-FT-ICR-MS m/z 405.26155 ([M+Na]⁺, ber. für C₂₂H₃₈NaO₅⁺ 405.26115)

6-*O*-Acetylhygrophoron B¹⁴ (47)



4,5-*cis*-4,5-Dihydroxy-5-(1-acetoxypentadecyl)-2-cyclopenten-1-on

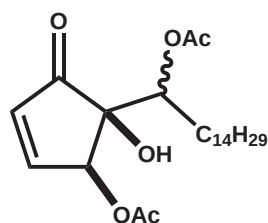
farbloses Öl

semisynthetisches Derivat von 44

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ¹H ppm: 7.640 *dd* (6.1/2.4) H-3, 6.300 *dd* (6.1/1.2) H-2, 5.177 *dd* (10.1/2.8) H-6, 4.793 *dd* (2.4/1.2) H-4, 2.000 *s* 6-OAc, 1.7 *m* H-7, 1.20 – 1.33 *m* H-8 – H-19, 0.880 *t* (7.0) H-20

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ¹³C ppm: 205.9 C-1, 162.8 C-3, 132.9 C-2, 170.6 6-OAc, 76.1 C-5, 73.4 C-6, 71.5 C-4, 32 – 22 C-7 – C-19, 20.5 6-OAc, 14.0 C-20

ESI-FT-ICR-MS m/z 405.26155 ([M+Na]⁺, ber. für C₂₂H₃₈NaO₅⁺ 405.26115)

4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron B¹⁴ (**48**)

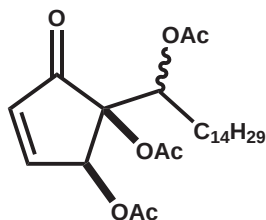
4,5-*cis*-4-Acetoxy-5-hydroxy-5-(1-acetoxypentadecyl)-2-cyclopenten-1-on

farbloses Öl

semisynthetisches Derivat von **44**

¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ ¹ H ppm: 7.550 <i>dd</i> (6.2/2.8) H-3, 6.438 <i>dd</i> (6.2/1.2) H-2, 5.785 <i>dd</i> (2.8/1.2) H-4, 5.086 <i>dd</i> (9.7/3.6) H-4, 2.730 <i>s</i> 5-OH, 2.151 <i>s</i> 4-OH, 2.062 <i>s</i> 6-OH, 1.7 <i>m</i> H-7, 1.20 – 1.33 <i>m</i> H-8 – H-19, 0.880 <i>t</i> (7.0) H-20
¹³ C-NMR	(125 MHz, CDCl ₃) δ ¹³ C ppm: 204.2 C-1, 157.7 C-3, 135.4 C-2, 170.4 6-OAc, 169.8 4-OAc, 77.1 C-5, 73.8 C-6, 72.5 C-4, 32 – 22 C-7 – C-19, 20.71 OAc, 20.70 OAc, 14.0 C-20
ESI-FT-ICR-MS	<i>m/z</i> 447.27131 ([M+Na] ⁺ , ber. für C ₂₄ H ₄₀ NaO ₆ ⁺ 447.27171)
(+)-ESI-CID-MS	(-13 eV) <i>m/z</i> (rel. int., %): 425 (23, [M+H] ⁺), 407 (100, [M+H-H ₂ O] ⁺), 365 (73, [M+H-HOAc] ⁺), 323 (38, [M+H-HOAc-CH ₂ CO] ⁺), 305 (51, [M+H-2 HOAc] ⁺), 287 (11, [M+H-2 HOAc-H ₂ O] ⁺), 189 (7), 123 (24, [C ₇ H ₇ O ₂] ⁺), 111 (2, [C ₆ H ₇ O ₂] ⁺)
(-)-ESI-CID-MS	(+20 eV) <i>m/z</i> (rel. int., %): 423 (4, [M-H] ⁻), 405 (22, [M-H-H ₂ O] ⁻), 381 (13, [M-H-CH ₂ CO] ⁻), 363 (100, [M-H-HOAc] ⁻), 361 (2, [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻), 351 (4, [M-H-H ₂ O-C ₃ H ₂ O] ⁻), 335 (19, [M-H-HOAc-CO] ⁻), 333 (12, [M-H-H ₂ O-CO-CO ₂] ⁻), 321 (73, [M-H-HOAc-CH ₂ CO] ⁻), 319 (15, [M-H-HOAc-CO ₂] ⁻), 303 (5, [M-H-2 HOAc] ⁻), 291 ([M-H-HOAc-CO-CO ₂] ⁻ , 35), 283 (11, [M-H-2 H ₂ O-HOAc-CO ₂] ⁻), 277 (18, [M-H-HOAc-CH ₂ CO-CO ₂] ⁻), 273 (25, [M-H-HOAc-H ₂ O-CO-CO ₂] ⁻), 197 (14), 181 (17), 139 (20, [C ₇ H ₇ O ₃] ⁻), 59 (48)
DC	LM 1: R _f = 0.57, LM 2: R _f = 0.52

4,5,6-Tri-*O*-acetylhygrophoron B¹⁴ (49)



4,5-*cis*-4,5-Diacetoxy-(1-acetoxypentadecyl)-2-cyclopenten-1-on

farbloses Öl

semisynthetisches Derivat von 44

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ¹H ppm: 7.432 *dd* (6.3/2.8) H-3, 6.470 *dd* (6.3/1.5) H-2, 5.967 *dd* (2.8/1.5) H-4, 5.227 *dd* (10.1/2.9) H-4, 2.102 *s* 4/5-OAc, 2.094 *s* 4/5-OAc, 2.002 *s* 6-OAc, 1.83 *m* H-7A, 1.69 *m* H-7B, 1.20 – 1.33 *m* H-8 – H-19, 0.880 *t* (7.0) H-20

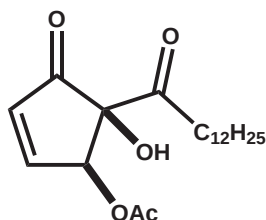
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ¹³C ppm: 200.4 C-1, 169.6 6-OAc, 169.2 4-OAc, 168.6 5-OAc, 154.7 C-3, 135.6 C-2, 79.1 C-6, 73.0 C-5, 70.7 C-4, 32 – 22 C-7 – C-19, 20.5 6-OAc, 20.3 4-OAc, 20.1 5-OAc, 14.0 C-20

ESI-FT-ICR-MS *m/z* 489.28213 ([M+Na]⁺, ber. für C₂₆H₄₂NaO₇⁺ 489.28227)

(+)-ESI-CID-MS (-13 eV) *m/z* (rel. int., %): 467 (2, [M+H]⁺), 407 (100, [M+H–HOAc]⁺), 365 (66, [M+H–HOAc–CH₂CO]⁺), 347 (3, [M+H–2 HOAc]⁺), 323 (9, [M+H–HOAc–2 CH₂CO]⁺), 305 (12, [M+H–2 HOAc–CH₂CO]⁺), 123 (3, [C₇H₇O₂]⁺)

$\nu_{\max}^{\text{film}}$ cm⁻¹ 5956 (m), 2922 (s), 2850 (s), 1760 (s), 1601 (w), 1468 (m), 1434 (m), 1371 (m), 1258 (s), 1122 (w), 1102 (w), 1047 (m), 1027 (m), 961 (w), 814 (w), 758 (w), 720 (w)

4-*O*-Acetylhygrophoron C¹² (50)



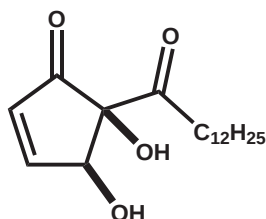
cis-4-Acetoxy-5-hydroxy-5-tridecanoyl-2-cyclopenten-1-on

weißer Feststoff

isoliert aus *H. pustulatus* (Pers.) Fr.

$^1\text{H-NMR}$	(500 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 7.802 <i>dd</i> (6.0/2.6) H-3, 6.537 <i>dd</i> (6.0/1.6) H-2, 5.734 <i>dd</i> (2.6/1.6) H-4, 4.064 <i>s</i> 5-OH, 2.595 <i>ddd</i> (17.9/8.1/6.7) H-7A, 2.439 <i>ddd</i> (19.7/8.1/6.7) H-7B, 2.138 <i>s</i> 4-OAc, 1.619 <i>m</i> H-8, 1.20 – 1.33 <i>m</i> H-9 – H-17, 0.880 <i>t</i> (7.0) H-18
$^{13}\text{C-NMR}$	(125 MHz, CDCl_3) δ ^{13}C ppm: 205.3 C-6, 201.2 C-1, 170.1 4-OAc, 160.0 C-3, 135.4 C-2, 82.6 C-5, 73.6 C-4, 37.0 C-7, 31.9, 29.62, 29.60, 29.56, 29.4, 29.32, 29.30, 28.95, 23.0, 22.7 C-9 – C-17, 20.3 4-OAc, 14.1 C-18
ESI-FT-ICR-MS	m/z 387.19523 ($[\text{M}+\text{Cl}]^-$, ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{32}^{35}\text{ClO}_5^-$ 387.19438)
(+)-ESI-CID-MS	(-15 eV) m/z (rel. int., %): 353 (15, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 335 (10, $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$), 311 (60, $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{CO}]^+$), 307 (100, $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$), 293 (52, $[\text{M}+\text{H}-\text{HOAc}]^+$), 275 (8, $[\text{M}+\text{H}-\text{HOAc}-\text{H}_2\text{O}]^+$), 265 (10, $[\text{M}+\text{H}-\text{HOAc}-\text{CO}]^+$), 197 (31, $[\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}]^+$), 139 (39, $[\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_3]^+$), 123 (5, $[\text{C}_9\text{H}_{11}]^+$), 97 (4, $[\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_2]^+$)
(-)-ESI-CID-MS	(+20 eV) m/z (rel. int., %): 351 (7, $[\text{M}-\text{H}]^-$), 333 (2, $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$), 323 (3, $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^-$), 309 (100, $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_2\text{CO}]^-$), 307 (3, $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$), 291 (19, $[\text{M}-\text{H}-\text{HOAc}]^-$), 265 (36, $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_2\text{CO}-\text{CO}_2]^-$)
$\nu_{\text{max}}^{\text{film}} \text{ cm}^{-1}$	3360 (br, m), 3092 (vw), 3020 (vw), 2950 (m), 2918 (s), 2871 (m), 2850 (s), 1746 (s), 1725 (s), 1689 (s), 1593 (w), 1463 (m), 1404 (w), 1373 (m), 1344 (m), 1315 (w), 1272 (w), 1260 (w), 1227 (m), 1198 (m), 1154 (m), 1112 (w), 1093 (m), 1066 (m), 1046 (w), 955 (vw), 930 (vw), 915 (w), 900 (w), 882 (vw), 845 (w), 826 (vw), 795 (w), 756 (m), 746 (m), 729 (w), 717 (m)
DC	LM 1: $R_f = 0.60$, LM 2: $R_f = 0.58$

Hygrophoron C^{12} (51)



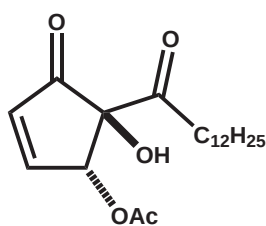
cis-4,5-Dihydroxy-5-tridecanoyl-2-cyclopenten-1-on

weißer Feststoff

isoliert aus *H. pustulatus* (Pers.) Fr.

$^1\text{H-NMR}$	(500 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 7.857 <i>dd</i> (6.0/2.4) H-3, 6.466 <i>dd</i> (6.0/1.3) H-2, 4.850 <i>ddd</i> (7.2/2.4/1.3) H-4, 4.646 <i>s</i> 5-OH, 3.046 <i>brd</i> (7.2) 4-OH, 2.452 <i>dt</i> (17.6/7.4) H-7A, 2.390 <i>dt</i> (17.6/7.3) H-7B, 1.612 <i>m</i> H-8, 1.22 – 1.32 <i>m</i> H-9 – H-17, 0.880 <i>t</i> (7.0) H-18
$^{13}\text{C-NMR}$	(125 MHz, CDCl_3) δ ^{13}C ppm: 205.7 C-6, 201.3 C-1, 164.8 C-3, 134.1 C-2, 82.4 C-5, 71.7 C-4, 37.1 C-7, 31.9, 29.61, 29.59, 29.5, 29.4, 29.33, 29.26, 29.0, 23.1, 22.7 C-9 – C-17, 14.1 C-18
ESI-FT-ICR-MS	m/z 345.18679 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{30}^{35}\text{ClO}_4$ 345.18381)
70 eV-EIMS vom Methylboronat	m/z (rel. int., %): 334 ($[\text{M}]^+$, 4), 197 (58), 151 (12), 138 (51), 137 (100), 123 (11), 109 (21), 96 (37), 95 (44), 85 (26), 71 (46), 57 (67)
$\nu_{\text{max}}^{\text{film}} \text{ cm}^{-1}$	3416 (br, w), 2954 (m), 2922 (s), 2852 (s), 1728 (m), 1711 (m), 1465 (w), 1438 (w), 1399 (w), 1377 (w), 1341 (w), 1256 (w), 1226 (w), 1199 (w), 1173 (w), 1159 (w), 1111 (w), 1078 (w), 1018 (w), 758 (w), 720 (w)
DC	LM 1: $R_f = 0.31$, LM 2: $R_f = 0.48$

4-*O*-Acetylhygrophoron D¹² (52)



trans-4-Acetoxy-5-hydroxy-5-tridecanoyl-2-cyclopenten-1-on

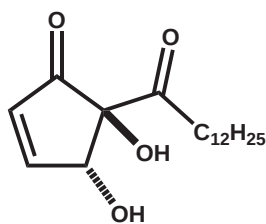
farbloses Öl

isoliert aus *H. latitabundus* Britz.

$^1\text{H-NMR}$	(500 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 7.701 <i>dd</i> (6.1/2.1) H-3, 6.591 <i>dd</i> (6.1/1.6) H-2, 5.827 <i>dd</i> (2.1/1.6) H-4, 4.622 <i>brs</i> 5-OH, 2.591 <i>ddd</i> (17.9/7.6/7.1) H-7A, 2.320 <i>ddd</i> (17.9/7.6/7.0) H-7B, 2.089 <i>s</i> 4-OAc, 1.566 <i>m</i> H-8, 1.24 – 1.26 <i>m</i> H-9 – H-17, 0.878 <i>t</i> (6.9) H-18
$^{13}\text{C-NMR}$	(125 MHz, CDCl_3) δ ^{13}C ppm: 202.7 C-6, 198.6 C-1, 169.5 4-OAc, 158.2 C-3, 136.0 C-2, 87.9 C-5, 80.4 C-4, 39.0 C-7, 32.0, 29.72, 29.70, 29.66, 29.50, 29.43, 29.42, 29.12, 23.3, 22.8 C-9 – C-17, 20.8 4-OAc, 14.3 C-18

ESI-FT-ICR-MS	m/z 375.21436 ($[M+Na]^+$, ber. für $C_{20}H_{32}NaO_5^+$ 375.21419)
(+)-ESI-CID-MS	(-15 eV) m/z (rel. int., %): 353 (13, $[M+H]^+$), 335 (3, $[M+H-H_2O]^+$), 311 (44, $[M+H-CH_2CO]^+$), 307 (8, $[M+H-H_2O-CO]^+$), 293 (42, $[M+H-HOAc]^+$), 265 (31, $[M+H-HOAc-CO]^+$), 197 (70, $[C_{13}H_{25}O]^+$), 139 (100, $[C_7H_7O_3]^+$), 97 (29)
(-)-ESI-CID-MS	(+20 eV) m/z (rel. int., %): 351 (33, $[M-H]^-$), 333 (36, $[M-H-H_2O]^-$), 323 (15, $[M-H-CO]^-$), 309 (26, $[M-H-CH_2CO]^-$), 307 (8, $[M-H-CO_2]^-$), 291 (35, $[M-H-HOAc]^-$), 265 (100, $[M-H-CH_2CO-CO_2]^-$), 263 (29, $[M-H-HOAc-CO]^-$), 305 (16, $[M-H-H_2O-CO]^-$), 289 (24), 279 (18), 239 (10), 139 (18, $[C_7H_7O_3]^-$), 113 (11)
$[\alpha]_D^{23}$	+111.7° (MeOH; c 0.470)
$\nu_{\max}^{\text{film}} \text{ cm}^{-1}$	3441 (br, m), 3081 (w), 2954 (m), 2923 (s), 2872 (m), 2853 (s), 1757 (s), 1746 (s), 1739 (s), 1731 (s), 1713 (s), 1591 (w), 1466 (m), 1401 (w), 1372 (m), 1349 (m), 1283 (w), 1224 (s), 1183 (w), 1143 (m), 1131 (m), 1093 (m), 1035 (m), 981 (w), 960 (w), 897 (w), 821 (w), 758 (w), 722 (w)
DC	LM 1: $R_f = 0.65$, LM 2: $R_f = 0.53$

Hygrophoron D¹² (53)



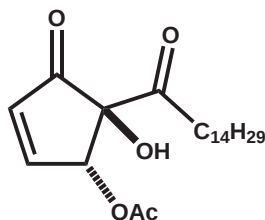
trans-4,5-Dihydroxy-5-tridecanoyl-2-cyclopenten-1-on

farbloses Öl

isoliert aus *H. latitabundus* Britz.

$^1\text{H-NMR}$	(500 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 7.722 <i>dd</i> (6.1/2.0) H-3, 6.446 <i>dd</i> (6.1/1.7) H-2, 4.942 <i>dd</i> (2.0/1.7) H-4, 2.643 <i>ddd</i> (18.3/8.0/6.9) H-7A, 2.464 <i>ddd</i> (18.3/8.0/6.5) H-7B, 1.65 <i>m</i> H-8, 1.2 – 1.4 <i>m</i> H-9 – H-17, 0.880 <i>t</i> (7.0) H-18
$^{13}\text{C-NMR}$	(125 MHz, CDCl_3) δ ^{13}C ppm: 205.8 C-6, 199.5 C-1, 162.7 C-3, 133.4 C-2, 91.5 C-5, 79.5 C-4, 39.2 C-7, 32.0, 29.74, 29.73, 29.68, 29.52, 29.45, 29.44, 29.0, 23.0, 22.8 C-8 – C-17, 14.1 C-18

ESI-FT-ICR-MS	m/z 333.20417 ($[M+Na]^+$, ber. für $C_{18}H_{30}NaO_4^+$ 333.20363)
(+)-ESI-CID-MS	(-15 eV) m/z (rel. int., %): 311 (76, $[M+H]^+$), 293 (83, $[M+H-H_2O]^+$), 265 (79, $[M+H-H_2O-CO]^+$), 215 (25, $[C_{13}H_{27}O_2]^+$), 197 (100, $[C_{13}H_{25}O]^+$), 123 (20, $[C_9H_{15}]^+$), 109 (19), 95 (38), 97 (40, $[C_5H_5O_2]^+$)
(-)-ESI-CID-MS	(+20 eV) m/z (rel. int., %): 309 (34, $[M-H]^-$), 291 (14, $[M-H-H_2O]^-$), 281 (49, $[M-H-CO]^-$), 265 (100, $[M-H-CO_2]^-$), 263 (56, $[M-H-H_2O-CO]^-$), 253 (30, $[M-H-2 CO]^-$), 247 (45, $[M-H-CO_2-H_2O]^-$), 237 (34, $[M-H-CO_2-CO]^-$), 235 (14), 113 (3)
ESI-QqTOF-MS	(CE -20 eV, DP -50 V) m/z (rel. int., %): 309.2071 (100) ($C_{18}H_{29}O_4^-$), 291.1967 (14) (ber. für $C_{18}H_{27}O_3^-$: 291.1966), 281.2107 (50) (ber. für $C_{17}H_{29}O_3^-$: 281.2122), 265.2179 (91) (ber. für $C_{17}H_{29}O_2^-$: 265.2173), 263.2032 (30) (ber. für $C_{17}H_{27}O_2^-$: 263.2017), 253.2164 (23) (ber. für $C_{16}H_{29}O_2^-$: 253.2173), 247.2096 (33) (ber. für $C_{17}H_{27}O^-$: 247.2067), 237.2224 (16) (ber. für $C_{16}H_{29}O^-$: 237.2224), 235.2072 (6) (ber. für $C_{16}H_{27}O^-$: 235.2067), 213.1879 (11) (ber. für $C_{13}H_{25}O_2^-$: 213.1860), 113.0254 (10) (ber. für $C_5H_5O_3^-$: 113.0244).
ESI-QqTOF-MS	(CE +20 eV, DP +50 V) m/z (rel. int., %): 311.2217 (100) ($C_{18}H_{31}O_4^+$), 293.2120 (21) (ber. für $C_{18}H_{29}O_3^+$: 293.2111), 265.2177 (19) (ber. für $C_{17}H_{29}O_2^+$: 265.2162), 251.2019 (4) (ber. für $C_{16}H_{27}O_2^+$: 251.2006), 215.1973 (5) (ber. für $C_{13}H_{27}O_2^+$: 215.2006), 197.1907 (60) (ber. für $C_{13}H_{25}O^+$: 197.1900), 139.0397 (62) (ber. für $C_7H_7O_3^+$: 139.0390), 123.1164 (18) (ber. für $C_9H_{15}^+$: 123.1168), 109.1022 (18) (ber. für $C_8H_{13}^+$: 109.1012), 97.0330 (6) (ber. für $C_5H_5O_2^+$: 97.0284), 95.0870 (13) (ber. für $C_7H_{11}^+$: 95.0855).
$\nu_{\max}^{\text{film}} \text{ cm}^{-1}$	3416 (br, m), 2952 (m), 2924 (s), 2853 (s), 1729 (s), 1712 (s), 1629 (w), 1464 (m), 1438 (w), 1406 (m), 1376 (m), 1236 (m), 1180 (m), 1149 (m), 1125 (m), 1080 (w), 1047 (w), 977 (w), 822 (vw), 722 (vw)
DC	LM 1: $R_f = 0.26$, LM 2: $R_f = 0.41$

4-*O*-Acetylhygrophoron D¹⁴ (54)*trans*-4-Acetoxy-5-hydroxy-5-pentadecanoyl-2-cyclopenten-1-on

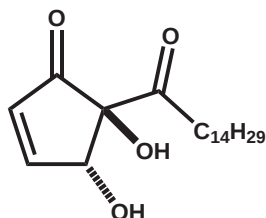
farbloses Öl

isoliert aus *H. latitabundus* Britz.

¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ ¹ H ppm: 7.700 <i>dd</i> (6.2/2.1) H-3, 6.591 <i>dd</i> (6.2/1.7) H-2, 5.826 <i>dd</i> (2.1/1.7) H-4, 4.613 <i>s</i> 5-OH, 2.590 <i>ddd</i> (17.9/7.2/7.1) H-7A, 2.319 <i>ddd</i> (17.9/7.5/6.7) H-7B, 2.088 <i>s</i> 4-OAc, 1.619 <i>m</i> H-8, 1.20 – 1.33 <i>m</i> H-9 – H-19, 0.878 <i>t</i> (6.8) H-20
¹³ C-NMR	(125 MHz, CDCl ₃) δ ¹³ C ppm: 202.7 C-6, 198.6 C-1, 169.5 4-OAc, 158.2 C-3, 136.0 C-2, 88.0 C-5, 80.4 C-4, 39.0 C-7, 32.0, 29.78, 29.76, 29.74, 29.73, 29.47, 29.51, 29.45, 29.44, 29.13, 23.3, 22.8: C-8 – C-19, 20.8 4-OAc, 14.3 C-20
ESI-FT-ICR-MS	<i>m/z</i> 403.24474 ([M+Na] ⁺ , ber. für C ₂₂ H ₃₇ NaO ₅ ⁺ 403.24604)
(+)-ESI-CID-MS	(-15 eV) <i>m/z</i> (rel. int., %): 339 (56, [M+H] ⁺), 321 (100, [M+H-H ₂ O] ⁺), 293 (47, [M+H-H ₂ O-CO] ⁺), 243 (27, [C ₁₅ H ₃₁ O ₂] ⁺), 225 (85, [C ₁₅ H ₂₉ O] ⁺), 123 (14, [C ₉ H ₁₅] ⁺), 109 (12), 97 (21, [C ₅ H ₅ O ₂] ⁺), 95 (14)
(-)-ESI-CID-MS	(+20 eV) <i>m/z</i> (rel. int., %): 337 (54, [M-H] ⁻), 319 (14, [M-H-H ₂ O] ⁻), 309 (49, [M-H-CO] ⁻), 293 (100, [M-H-CO ₂] ⁻), 291 (46, [M-H-H ₂ O-CO] ⁻), 281 (22, [M-H-2 CO] ⁻), 275 (40, [M-H-CO ₂ -H ₂ O] ⁻), 265 (24, [M-H-CO ₂ -CO] ⁻), 241 (10)
ESI-QqTOF-MS	(CE -20 eV, DP -50 V) <i>m/z</i> (rel. int., %): 337.2384 (100) (C ₂₀ H ₃₃ O ₄ ⁻), 319.2264 (10) (ber. für C ₂₀ H ₃₁ O ₃ ⁻ : 319.2279), 309.2432 (30) (ber. für C ₁₉ H ₃₃ O ₃ ⁻ : 309.2435), 293.2483 (62) (ber. für C ₁₉ H ₃₃ O ₂ ⁻ : 293.2486), 291.2350 (18) (ber. für C ₁₉ H ₃₁ O ₂ ⁻ : 291.2330), 281.2478 (13) (ber. für C ₁₈ H ₃₃ O ₂ ⁻ : 281.2486), 275.2387 (22) (ber. für C ₁₉ H ₃₁ O-: 275.2380), 265.2552 (8) (ber. für C ₁₈ H ₃₃ O-: 265.2537), 263.2407 (3) (ber. für C ₁₈ H ₃₁ O ⁻ : 263.2380), 241.2215 (6) (ber. für C ₁₅ H ₂₉ O ₂ ⁻ : 241.2173), 113.0256 (7) (ber. für C ₅ H ₅ O ₃ ⁻ : 113.0244).

ESI-QqTOF-MS	(CE +20 eV, DP +50 V) m/z (rel. int., %): 339.2530 (100) ($C_{20}H_{35}O_4^+$), 321.2445 (38) (ber. für $C_{20}H_{33}O_3^+$: 321.2424), 293.2495 (21) (ber. für $C_{19}H_{33}O_2^+$: 293.2475), 279.2326 (30) (ber. für $C_{18}H_{31}O_2^+$: 279.2319), 243.2326 (18) (ber. für $C_{15}H_{31}O_2^+$: 243.2319), 225.2231 (90) (ber. für $C_{15}H_{29}O^+$: 225.2213), 139.0401 (27) (ber. für $C_7H_7O_3^+$: 139.0390), 123.1176 (31) (ber. für $C_9H_{15}^+$: 123.1168), 109.1030 (30) (ber. für $C_8H_{13}^+$: 109.1012), 97.0310 (15) (ber. für $C_5H_5O_2^+$: 97.0284), 95.0880 (24) (ber. für $C_7H_{11}^+$: 95.0855).
$[\alpha]_D^{23}$	+98.7° (MeOH; c 0.475)
$\nu_{\max}^{\text{film}} \text{ cm}^{-1}$	3446 (br, m), 3080 (w), 2955 (m), 2923 (s), 2853 (s), 1734 (s), 1711 (s), 1591 (w), 1465 (m), 1400 (w), 1371 (m), 1326 (w), 1282 (w), 1225 (s), 1185 (w), 1131 (m), 1097 (m), 1086 (m), 1035 (m), 981 (w), 897 (w), 822 (w), 762 (vw); 721 (vw)
DC	LM 1: $R_f = 0.65$, LM 2: $R_f = 0.53$

Hygrophoron D¹⁴ (55)



trans-4,5-Dihydroxy-5-pentadecanoyl-2-cyclopenten-1-on

Reinheit ca. 50% (¹H-NMR)

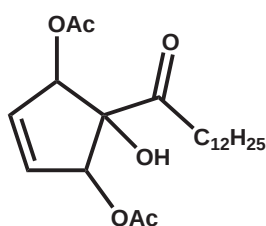
semisynthetisches Derivat von 54

¹ H-NMR	(400 MHz, CDCl ₃) δ ¹ H ppm: 7.736 <i>dd</i> (6.1/2.0) H-3, 6.455 <i>dd</i> (6.1/1.6) H-2, 4.953 <i>dd</i> (2.0/1.6)
ESI-FT-ICR-MS	m/z 361.23554 ($[M+Na]^+$, ber. für $C_{20}H_{34}NaO_4^+$ 361.23493)
(+)-ESI-CID-MS	(-15 eV) m/z (rel. int., %): 381 (2, $[M+H]^+$), 339 (20, $[M+H-CH_2CO]^+$), 321 (72, $[M+H-HOAc]^+$), 293 (17, $[M+H-HOAc-CO]^+$), 225 (58, $[C_{15}H_{29}O]^+$), 139 (100, $[C_7H_7O_3]^+$), 97 (11, $[C_5H_5O_2]^+$)

(–)-ESI-CID-MS (+20 eV) m/z (rel. int., %): 379 (48, $[M-H]^-$), 361 (21, $[M-H-H_2O]^-$), 351 (10, $[M-H-CO]^-$), 337 (21, $[M-H-CH_2CO]^-$), 335 (17, $[M-H-CO_2]^-$), 319 (24, $[M-H-HOAc]^-$), 293 (100, $[M-H-CH_2CO-CO_2]^-$), 291 (24, $[M-H-HOAc-CO]^-$), 317 (16), 307 (23), 139 (13, $[C_7H_7O_3]^-$), 113 (8)

DC LM 1: $R_f = 0.28$, LM 2: $R_f = 0.46$

1,4-Di-*O*-acetylhygrophoron **E**¹² (**56**)



1-(2,5-Diacetoxy-1-hydroxy-cyclopent-3-enyl)-tridecan-1-on

farbloses Öl

isoliert aus *H. latitabundus* Britz.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ¹H ppm: 6.190 *ddd* (6.1/1.9/1.1) H-3, 6.159 *ddd* (6.1/2.1/1.1) H-2, 5.724 *ddd* (2.0/1.9/1.1) H-4, 5.707 *ddd* (2.1/2.0/1.1) H-1, 4.003 *br s* 5-OH, 2.659 *ddd* (17.8/9.0/6.0) H-7A, 2.589 *ddd* (17.8/8.8/6.1) H-7B, 2.108 *s* 1-OAc, 2.018 *s* 4-OAc, 1.20 – 1.33 *m* H-8 – H-17, 0.881 *t* (7.0) H-18

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ¹³C ppm: 207.7 C-6, 170.4 1-OAc, 169.7 4-OAc, 134.5 C-3, 133.8 C-2, 86.2 C-4, 83.6 C-5, 77.5 C-1, 38.3 C-7, 32.0, 29.75, 29.73, 29.71, 29.59, 29.57, 29.45, 29.37, 23.7, 22.8 C-8 – C-17, 21.0 4-OAc, 20.8 1-OAc, 14.3 C-18

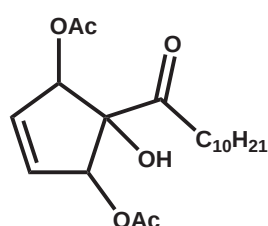
ESI-FT-ICR-MS m/z 419.24159 ($[M+Na]^+$, ber. für C₂₂H₃₆NaO₆⁺ 419.24041)

(+)-ESI-CID-MS (–15 eV) m/z (rel. int., %): 397 (68, $[M+H]^+$), 365 (10), 379 (13, $[M+H-H_2O]^+$), 347 (8), 337 (30, $[M+H-HOAc]^+$), 309 (11, $[M+H-HOAc-CO]^+$), 295 (71, $[M+H-HOAc-CO]^+$), 277 (15, $[M+H-HOAc-CO-H_2O]^+$), 249 (18), 197 (100, $[C_{13}H_{25}O]^+$), 97 (11, $[C_5H_5O_2]^+$)

(–)-ESI-CID-MS (+20 eV) m/z (rel. int., %): 395 (8, $[M-H]^-$), 335 (30, $[M-H-HOAc]^-$), 317 (10, $[M-H-HOAc-H_2O]^-$), 293 (71, $[M-H-HOAc-CH_2CO]^-$), 265 (100, $[M-H-HOAc-CH_2CO-CO]^-$), 237 (5), 59 (7)

$[\alpha]_D^{23}$	+80.3° (MeOH; <i>c</i> 0.395)
$\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ cm ⁻¹	3449 (br, m), 3073 (w), 2954 (m), 2924 (s), 2853 (s), 1744 (s), 1718 (s), 1465 (w), 1435 (w), 1372 (m), 1319 (vw), 1300 (vw), 1225 (s), 1154 (vw), 1114 (vw), 1024 (m), 967 (w), 915 (w), 831 (vw), 786 (vw), 721 (vw)
DC	LM 1: R_f = 0.72, LM 2: R_f = 0.64

1,4-Di-*O*-acetylhygrophoron **E**¹⁰ (**57**)



1-(2,5-Diacetoxy-1-hydroxy-cyclopent-3-enyl)-undecan-1-on

farbloses Öl

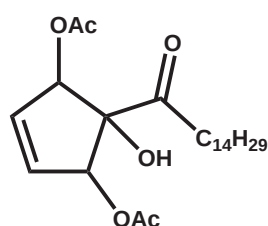
isoliert aus *H. latitabundus* Britz.

¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ ¹ H ppm: 6.190 <i>ddd</i> (6.1/1.9/1.1) H-3, 6.159 <i>ddd</i> (6.1/2.1/1.1) H-2, 5.724 <i>ddd</i> (2.0/1.9/1.1) H-4, 5.707 <i>ddd</i> (2.1/2.0/1.1) H-1, 4.003 <i>brs</i> 5-OH, 2.659 <i>ddd</i> (17.8/9.0/6.0) H-7A, 2.589 <i>ddd</i> (17.8/8.8/6.1) H-7B, 2.108 <i>s</i> 1-OAc, 2.018 <i>s</i> 4-OAc, 1.20 – 1.33 <i>m</i> H-8 – H-15, 0.881 <i>t</i> (7.0) H-16
--------------------	--

ESI-FT-ICR-MS	<i>m/z</i> 391.21037 ([M+Na] ⁺ , ber. für C ₂₀ H ₃₂ NaO ₆ ⁺ 391.20911)
---------------	---

DC	LM 1: R_f = 0.72, LM 2: R_f = 0.64
----	--

1,4-Di-*O*-acetylhygrophoron **E**¹⁴ (**58**)



1-(2,5-Diacetoxy-1-hydroxy-cyclopent-3-enyl)-pentadecan-1-on

farbloses Öl

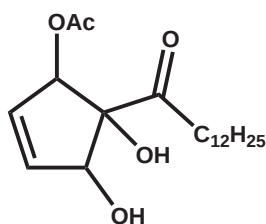
isoliert aus *H. latitabundus* Britz.

¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ ¹ H ppm: 6.190 <i>ddd</i> (6.1/1.9/1.1) H-3, 6.159 <i>ddd</i> (6.1/2.1/1.1) H-2, 5.724 <i>ddd</i> (2.0/1.9/1.1) H-4, 5.707 <i>ddd</i> (2.1/2.0/1.1) H-1, 4.003 <i>brs</i> 5-OH, 2.659 <i>ddd</i> (17.8/9.0/6.0) H-7A, 2.589 <i>ddd</i> (17.8/8.8/6.1) H-7B, 2.108 <i>s</i> 1-OAc, 2.018 <i>s</i> 4-OAc, 1.20 – 1.33 <i>m</i> H-8 – H-19, 0.881 <i>t</i> (7.0) H-20
--------------------	--

ESI-FT-ICR-MS m/z 447.27530 ($[M+Na]^+$, ber. für $C_{24}H_{40}NaO_6^+$ 447.27171)

DC LM 1: $R_f = 0.72$, LM 2: $R_f = 0.64$

1-*O*-Acetylhygrophoron **E¹²** (59)



1-(2-Acetoxy-1,5-dihydroxy- cyclopent-3-enyl)-tridecan-1-on

farbloses Öl

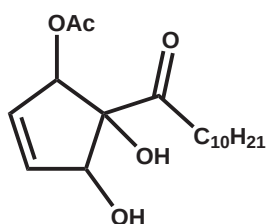
isoliert aus *H. latitabundus* Britz.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 6.192 ddd (6.0/2.0/1.0) H-3, 6.058 ddd (6.0/2.2/1.2) H-2, 5.659 ddd (2.2/1.5/1.0) H-1, 4.932 ddd (2.0/1.4/1.4) H-4, 2.698 ddd (17.7/8.2/6.7) 7A, 2.541 ddd (17.7/8.2/6.6) 7B, 2.018 s 1-OAc, 1.20 – 1.33 m H-8 – H-17, 0.881 t (7.0) H-18

ESI-FT-ICR-MS m/z 377.23029 ($[M+Na]^+$, ber. für $C_{20}H_{34}NaO_5^+$ 377.22984)

DC LM 1: $R_f = 0.46$, LM 2: $R_f = 0.55$

1-*O*-Acetylhygrophoron **E¹⁰** (60)



1-(2-Acetoxy-1,5-dihydroxy-cyclopent-3-enyl)-undecan-1-on

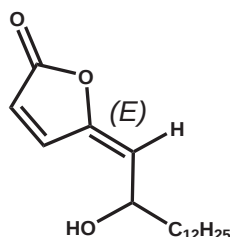
farbloses Öl

isoliert aus *H. latitabundus* Britz.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 6.192 ddd (6.0/2.0/1.0) H-3, 6.058 ddd (6.0/2.2/1.2) H-2, 5.659 ddd (2.2/1.5/1.0) H-1, 4.932 ddd (2.0/1.4/1.4) H-4, 2.698 ddd (17.7/8.2/6.7) 7A, 2.541 ddd (17.7/8.2/6.6) 7B, 2.018 s 1-OAc, 1.20 – 1.33 m H-8 – H-15, 0.881 t (7.0) H-16

ESI-FT-ICR-MS m/z 349.20050 ($[M+Na]^+$, ber. für $C_{18}H_{30}NaO_5^+$ 349.19854)

DC LM 1: $R_f = 0.46$, LM 2: $R_f = 0.55$

Hygrophoron F¹² (40)(5*E*)-5-(2-Hydroxytetradexylidene)-furan-2(5*H*)-on

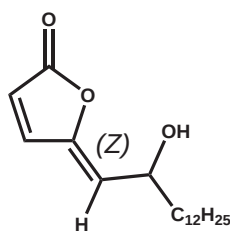
weißer Feststoff

isoliert aus *H. latitabundus* Britz.¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ ¹H ppm: 7.794 *dd* (5.6/0.8) H-3, 6.256 *dd* (5.6/1.8) H-2, 5.756 *ddd* (8.1/1.8/0.8) H-5, 4.52 *m* H-6, 1.7 *m* H-7, 1.2 – 1.4 *m* H-8 - H-17, 0.881 *t* (7.0) H-18¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ ¹³C ppm: 169.1 C-1, 150.3 C-4, 140.5 C-3, 121.0 C-2, 117.3 C-5, 68.3 C-6, 38.1 C-7, 32.0, 29.72, 29.71, 29.69, 29.62, 29.57, 29.5, 29.4, 25.3, 22.8 C-8 - C-17, 14.2 C-18

ESI-FT-ICR-MS

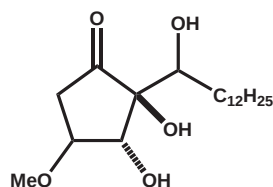
m/z 317.20921 ([M+Na]⁺, ber. für C₁₈H₃₀NaO₃⁺ 317.20872) $\nu_{\max}^{\text{film}}$ cm⁻¹

3487 (m), 3396 (br, m), 3269 (br, m), 3133 (w), 3100 (w), 3074 (w), 2953 (m), 2918 (s), 2850 (s), 1785 (m), 1751 (s), 1718 (w), 1669 (w), 1554 (w), 1466 (w), 1372 (vw), 1297 (vw), 1237 (w), 1195 (vw), 1122 (w), 1077 (w), 1064 (w), 1035 (w), 1019 (w), 1008 (vw), 920 (w), 908 (w), 894 (w), 840 (vw), 816 (w), 757 (w), 711 (w)

Hygrophoron G¹² (41)(5*Z*)-5-(2-Hydroxytetradexylidene)-furan-2(5*H*)-onisoliert aus *H. persoonii* Arnolds¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ ¹H ppm: 7.372 *dd* (5.5/0.4) H-3, 6.230 *dd* (5.5/0.7) H-2, 5.326 *ddd* (8.4/0.7/0.4) H-5, 4.793 *m* H-6, 1.7 *m* H-7, 1.2 – 1.4 *m* H-8 - H-17, 0.881 *t* (7.0) H-18

ESI-FT-ICR-MS

m/z 317.21078 ([M+Na]⁺, ber. für C₁₈H₃₀NaO₃⁺ 317.20872)

2,3-Dihydroxy-2-(1-hydroxytridecyl)-4-methoxycyclopentanon (**38**)

2,3-Dihydroxy-2-(1-hydroxytridecyl)-4-methoxycyclopentanon

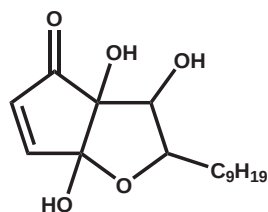
farbloses Öl

semisynthetisches Derivat von **31**

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 4.073 *ddd* (8.8/5.3/4.5) H-4, 2.956 *ddd* (19.4/8.8/0.7) 5A, 2.360 *ddd* (19.4/4.5/0.7) 5B, 3.435 *s* 4-OMe, 4.224 *dd* (5.3/0.7) H-3, 3.916 *ddd* (10.2/4.3/1.6) H-6

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ ^{13}C ppm: 214.6 C-1, 83.0 C-2, 82.6 C-3, 80.5 C-4, 73.2 C-6, 57.6 4-OMe, 41.9 C-5, 31-22 C-7 – C17, 14.4 C-18

ESI-FT-ICR-MS m/z 367.24501 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{NaO}_5^+$ 367.24549)

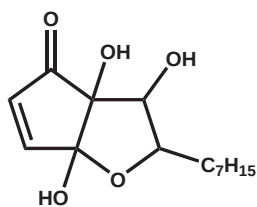
F-15784 (**86**)3,3a,6a-Trihydroxy-2-undecyl-2,3,3a,6a-tetrahydro-4H-cyclopenta[*b*]furan-4-onReinheit ca. 45% ($^1\text{H-NMR}$)nachgewiesen in *Rigidoporus lineatus* (Pers.) Ryvarden

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 7.573 *d* (6.2) H-3, 6.115 *d* (6.2) H-2

ESI-FT-ICR-MS m/z 321.16775 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NaO}_5^+$ 321.16724)

(–)-ESI-CID-MS (+20 eV) m/z (rel. int., %): 297 (4, $[\text{M}-\text{H}]^-$), 111 (100, $[\text{C}_5\text{H}_3\text{O}_3]^-$)

Homologes von F-15784 (87)



2-Heptyl-3,3a,6a-trihydroxy-2,3,3a,6a-tetrahydro-4*H*-cyclopenta[*b*]furan-4-on

Reinheit ca. 45% ($^1\text{H-NMR}$)

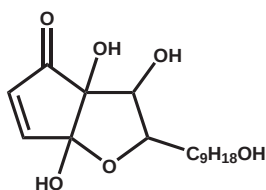
nachgewiesen in *Rigidoporus lineatus* (Pers.) Ryvarden

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 7.573 *d* (6.2) H-3, 6.113 *d* (6.2) H-2

ESI-FT-ICR-MS m/z 293.13624 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NaO}_5^+$ 293.13594)

($-$)-ESI-CID-MS (+20 eV) m/z (rel. int., %): 269 (3, $[\text{M}-\text{H}]^-$), 111 (100, $[\text{C}_5\text{H}_3\text{O}_3]^-$)

Hydroxy-Derivat von F-15784 (88)



3,3a,6a-Trihydroxy-2-(9-hydroxynonyl)-2,3,3a,6a-tetrahydro-4*H*-cyclopenta[*b*]furan-4-on

Reinheit ca. 50% ($^1\text{H-NMR}$)

nachgewiesen in *Rigidoporus lineatus* (Pers.) Ryvarden

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ^1H ppm: 7.566 *d* (6.2) H-3, 6.115 *d* (6.2) H-2

ESI-FT-ICR-MS m/z 337.16280 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NaO}_6^+$ 337.16216)

($-$)-ESI-CID-MS (+20 eV) m/z (rel. int., %): 313 (4, $[\text{M}-\text{H}]^-$), 111 (100, $[\text{C}_5\text{H}_3\text{O}_3]^-$)

Literaturverzeichnis

- Agelet, A. und J. Vallès, 2003. „Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part III. Medicinal uses of non-vascular plants.“ *Journal of Ethnopharmacology* 84 (2 – 3): 229 – 234.
- Antkowiak, R., W. Z. Antkowiak, I. Banczyk und L. Mikolajczyk, 2003. „A new phenolic metabolite, involutone, isolated from the mushroom *Paxillus involutus*.“ *Canadian Journal of Chemistry* 81 (1): 118 – 124.
- von Ardenne, R., H. Döpp, H. Musso und W. Steglich, 1974. „Über das Vorkommen von Muscaflavin bei Hygrocyben (Agaricales) und seine Dihydroazepin-Struktur.“ *Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences* 29C (9/10): 637 – 639.
- Arnold, N., H. Besl, A. Bresinsky und H. Kemmer, 1987. „Notizen zur Chemotaxonomie der Gattung *Dermocybe* in Bayern.“ *Zeitschrift für Mykologie* 53 (2): 187 – 194.
- Arnold, N., W. Steglich und H. Besl, 1996. „Zum Vorkommen von Pulvinsäure-Derivaten in der Gattung *Scleroderma*.“ *Zeitschrift für Mykologie* 62 (1): 69 – 73.
- Arnolds, E., 1990. „Tribus Hygrophoreae (Kühner) Bas et Arnolds.“ In: *Flora Agaricina Neerlandica*, C. Bas, T. W. Kuyper, M. E. Noordeloos und E. C. Vellinga [Editoren], Bd. 2, 115 – 133. Rotterdam: A. A. Balkema.
- Arnolds, E., 1995. „Tribus Hygrocybeae (additions).“ In: *Flora Agaricina Neerlandica*, C. Bas, T. W. Kuyper, M. E. Noordeloos und E. C. Vellinga [Editoren], Bd. 3, 30 – 34. Rotterdam: A. A. Balkema.
- Bachmann, A., B. Hause, H. Maucher, E. Garbe, K. Vörös, H. Weichert, C. Wasternack und I. Feussner, 2002. „Jasmonate-induced lipid peroxidation in barley leaves initiated by distinct 13-LOX forms of chloroplasts.“ *Biological Chemistry* 383 (10): 1645 – 1657.
- Bačinić, S., 2006 (in Vorbereitung). „Bioaktivitäts-Untersuchungen von *Hygrophorus*-Arten.“ Diplomarbeit, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale).
- Bai, Y., M. Q. Guo, F. R. Song, Z. Q. Liu und S. Y. Liu, 2004. „Studies on flavonoids from *Sophora flavescens* ait using ESI-MS.“ *Gaodeng Xueixiao Huaxue Xuebao* 25 (2): 284 – 288.
- Balazy, M., 2004. „Eicosanomics: targeted lipidomics of eicosanoids in biological systems.“ *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 73 (3 – 4): 173 – 180.
- Barth, H., G. Burger, H. Döpp, M. Kobayashi und H. Musso, 1981. „Konstitution und Synthese des Muscaflavins.“ *Liebigs Annalen der Chemie* (12): 1264 – 1279.

- Bas, C., 1990. „Tricholomataceae R. Heim ex Pouz.“ In: *Flora Agaricina Neerlandica*, C. Bas, T. W. Kuyper, M. E. Noordeloos und E. C. Vellinga [Editoren], Bd. 2, 65 – 70. Rotterdam: A. A. Balkema.
- Bas, C., 1998. „Orders and families in agarics and boleti.“ In: *Flora Agaricina Neerlandica*, C. Bas, T. W. Kuyper, M. E. Noordeloos und E. C. Vellinga [Editoren], Bd. 1, 40 – 49. Rotterdam: A. A. Balkema.
- Baute, M.-A., R. Baute und G. Deffieux, 1988. „Fungal enzymic activity degrading 1,4- α -D-glucans to 1,5-D-anhydrofructose.“ *Phytochemistry* 27 (11): 3401 – 3403.
- Baute, M.-A., G. Deffieux, R. Baute, A. Badoc, J. Vercauteren, J.-M. Léger und A. Neveu, 1991. „Fungal enzymic activity degrading 1,4- α -D-glucans to echinosporin (5-epipentenomycin I).“ *Phytochemistry* 30 (5): 1419 – 1423.
- Baute, M.-A., G. Deffieux und R. Baute, 1986. „Bioconversion of carbohydrates to unusual pyrone compounds in fungi: Occurrence of microthecin in morels.“ *Phytochemistry* 25 (6): 1472 – 1473.
- Benveniste, P., 1986. „Sterol biosynthesis“. *Annual Review of Plant Biology* 37: 275 – 308.
- Benveniste, P., 2004. „Biosynthesis and accumulation of sterols“. *Annual Review of Plant Biology* 55: 429 – 457.
- Berglund, M., 2001. „Structural studies of FR96001M - A new antibacterial compound produced by *Cyphellopsis anomala* TA96001.“ Diplomarbeit, Universität Lund, Schweden.
- Bernillon, J., J. Favre-Bonvin, M. T. Pommier und N. Arpin, 1989. „First isolation of (+)-epipentenomycin I from *Peziza* sp. carpophores.“ *Journal of Antibiotics* 42 (9): 1430 – 1432.
- Besl, H. und A. Bresinsky, 1997. „Chemosystematics of Suillaceae and Gomphidiaceae (suborder Suillineae).“ *Plant Systematics and Evolution* 206 (1 – 4): 223 – 242.
- Besl, H., A. Bresinsky, R. Herrmann und W. Steglich, 1980. „Chamonixin und Involutin, zwei chemosystematisch interessante Cyclopentandione aus *Gyrodon lividus* (Boletales).“ *Zeitschrift für Naturforschung C: Biosciences* 35c (9 – 10): 824 – 825.
- Besl, H., A. Bresinsky, W. Steglich und K. Zipfel, 1973. „Pilzpigmente XVII. Über Gyrocyanin, das bläuende Prinzip des Kornblumenröhrlings (*Gyroporus cyanescens*), und eine oxidative Ringverengung des Atromentins.“ *Chemische Berichte* 106 (10): 3223 – 3229.
- Bon, M., 1992. *Die Großpilzflora von Europa*. Bd. 1: *Hygrophoraceae*. Eching: IHW-Verlag
- Breheret, S., T. Talou, S. Rapior und J. M. Bessière, 1997a. „Composés volatils : un outil pour la chimiotaxinomie des Basidiomycètes.“ *Cryptogamie Mycologie* 18 (2): 111 – 114.

- Breheret, S., T. Talou, S. Rapior und J. M. Bessière, 1997b. „Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (Basidiomycetes).“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (3): 831 – 836.
- Bresinsky, A., 1996. „Abstammung, Phylogenie und Verwandtschaft im Pilzreich.“ *Zeitschrift für Mykologie* 62 (2): 147 – 168.
- Bresinsky, A. und A. Huber, 1967. „Schlüssel für die Gattung *Hygrophorus* (Agaricales) nach Exsikkatenmaterial.“ *Nova Hedwigia* 14: 143 – 185.
- Bresinsky, A. und I. Kronawitter, 1986. „Zur Kenntnis der Hygrocybenpigmente.“ *Zeitschrift für Mykologie* 52 (2): 321 – 334.
- Bruns, T. D., T. M. Szaro, M. Gardes, K. W. Cullings, J. J. Pan, D. L. Taylor, T. R. Horton, A. Kretzer, M. Garbelotto und Y. Li, 1998. „A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis.“ *Molecular Ecology* 7 (3): 257 – 272.
- Caddick, S., S. Cheung, L. M. Frost, S. Khan und Pairedeau G., 2000. „Synthesis of functionalised cyclopentenones via rearrangement of pyranones.“ *Tetrahedron Letters* 41 (35): 6879 – 6882.
- Candusso, M., 1997. *Fungi Europaei*. Bd. 6: *Hygrophorus s.l.* Alassio: Libreria Basso.
- Clark, M., R. D. Cramer III und N. J. van Opdenbosch, 1989. „Validation of the general purpose tripos 5.2 force field.“ *Journal of Computational Chemistry* 10 (8): 982 – 1012.
- Cordella, G., F. Senatore, P. Morrica und S. Di Donato, 1982. „Sterolic composition of three *Hygrophorus* species.“ *Studi Sassaresi, Sezione 2: Archivio Bimestrale di Scienze Mediche e Naturali* 60 (2): 277 – 278.
- Darnet, S. und A. Rahier, 2004. „Plant sterol biosynthesis: identification of two distinct families of sterol 4- α -methyl oxidases.“ *Biochemical Journal* 378 (3): 889 – 898.
- Dickinson, J. S. und R. C. Murphy, 2002. „Mass spectrometric analysis of leukotriene A₄ and other chemically reactive metabolites of arachidonic acid.“ *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 13 (10): 1227 – 1234.
- Domagk, G., 1935. „Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln.“ *Deutsche medizinische Wochenschrift* 61: 250.
- Döpp, H., W. Grob und H. Musso, 1971. „Über die Farbstoffe des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria*).“ *Naturwissenschaften* 58 (11): 566.
- Döpp, H. und H. Musso, 1973a. „Die Konstitution des Muscaflavins aus *Amanita muscaria* und über Betalaminsäure.“ *Naturwissenschaften* 60 (10): 477 – 478.
- Döpp, H. und H. Musso, 1973b. „Isolierung und Chromophore der Farbstoffe aus *Amanita muscaria*.“ *Chemische Berichte* 106 (11): 3473 – 3482.

- Edwards, R. L., G. C. Elsworth und N. Kale, 1967. „Constituents of the higher fungi, part IV. Involutin, a diphenyl-cyclopenteneone from *Paxillus involutus* (Oeder ex Fries).“ *Journal of the Chemical Society C* (6): 405 – 409.
- Edwards, R. L. und M. Gill, 1973. „Constituents of higher fungi. part XII. Identification of involutin as (–)-cis-5-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-cyclopent-2-enone and synthesis of (±)-cis-involutin trimethyl ether from isoxerocomic acid derivatives.“ *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1* (15): 1529 – 1537.
- Erwin, D. C. und O. K. Ribeiro, 1996. *Phytophthora - Diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Fabre, N., I. Rustan, E. de Hoffmann und J. Quetin-Leclercq, 2001. „Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry.“ *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12 (6): 707 – 715.
- Fam, S. S., L. J. Murphey, E. S. Terry, W. E. Zackert, Y. Chen, L. Gao, S. Pandalai, G. L. Milne, L. J. Roberts, N. A. Porter, T. J. Montine und J. D. Morrow, 2002. „Formation of highly reactive A-ring and J-ring isoprostane-like compounds (A₄/J₄-neuroprostanes) *in vivo* from docosahexaenoic acid.“ *Journal of Biological Chemistry* 277 (39): 36076 – 36084.
- Feling, R., 2000. „Konfiguration, Synthese und Biosynthese von 2,5-Diarylcyclopentenonen aus Pilzen der Ordnung *Boletales*.“ Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Feling, R., K. Polborn, W. Steglich, J. Mühlbacher und G. Bringmann, 2001. „The absolute configuration of the mushroom metabolites involutin and chamonixin.“ *Tetrahedron* 57 (37): 7857 – 7863.
- Fischer, M., M. Jarosch, M. Binder und H. Besl, 1997. „Zur Systematik der *Boletales*: *Suillus* und verwandte Gattungen.“ *Zeitschrift für Mykologie* 63 (2): 173 – 188.
- Fleming, A., 1922. „On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions.“ *Proceedings of the Royal Society Series B, Biological sciences* 93: 306 – 317.
- Fleming, A., 1929. „On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*.“ *British Journal of Experimental Pathology* 10 (3): 226 – 236.
- Fleming, A. und V. D. Allison, 1922. „Observations on a bacteriolytic substance (‘lysozyme’) found in secretions and tissues.“ *British Journal of Experimental Pathology* 3 (5): 252 – 260.
- Friedrich, Ch., 2005. „Kluger Blick in die Petrischale.“ *Pharmazeutische Zeitung* 150 (10): 899 – 901.
- Fugmann, B., 1985. „Neue Niedermolekulare Naturstoffe aus Höheren Pilzen (Basidiomyceten). Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese.“ Dissertation, Universität Bonn.

- Gartz, J., 1986. „Nachweis von Tryptaminderivaten in Pilzen der Gattungen *Gerronema*, *Hygrocybe*, *Psathyrella* und *Inocybe*.“ *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 181 (4): 275 – 278.
- Gasteiger, J. und M. Marsili, 1980. „Iterative partial equalization of orbital electronegativity - A rapid access to atomic charges.“ *Tetrahedron* 36 (22): 3219 – 3228.
- Gießen, H., 2003. „75 Jahre Penicillin.“ *Pharmazeutische Zeitung* 148 (37): 3284 – 3285.
- Gill, M. und W. Steglich, 1987. „Pigments of fungi (Macromycetes).“ *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 51.
- Gminder, A. und G. J. Kriegsteiner, 2001. *Die Großpilze Baden-Württembergs*. Bd. 3: *Blätterpilze: Ständerpilze 1* Stuttgart: Ulmer-Verlag.
- Gottstein, D., D. Gross und H. Lehmann, 1982. „Mikrobiotest mit *Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arth. zum Nachweis fungitoxischer Verbindungen auf Dünnschichtplatten.“ *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 20: 111 – 116.
- Gruber, G., 2002. „Isolierung und Strukturaufklärung von chemotaxonomisch relevanten Sekundärmetaboliten aus höheren Pilzen, insbesondere aus der Ordnung der *Boletales*.“ Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hankin, J., P. Wheelan und R. C. Murphy, 1997. „Identification of novel metabolites of prostaglandin E₂ formed by isolated rat hepatocytes.“ *Archives of Biochemistry and Biophysics* 340 (2): 317 – 330.
- Haselberger, H., 1986. „Chemische und ökologische Untersuchungen an Hygrophoraceen (Agaricales).“ Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Hesler, L. R. und A. H. Smith, 1963. *North American species of Hygrophorus*. Knoxville: The University of Tennessee Press.
- Hevko, J. M. und R. C. Murphy, 2001. „Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of cysteinyl eicosanoids: leukotriene C₄ and FOG₇.“ *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12 (7): 763 – 771.
- Heyn, G., 2004. „Dem Darmkrebs vorbeugen.“ *Pharmazeutische Zeitung* 149 (9): 22 – 28.
- Høiland, K., 1983. *Opera Botanica*. Bd. 71: *Cortinariius subgenus Dermocybe*. Copenhagen: Council for Nordic Publications in Botany.
- Hood, I., M. Ramsden, T. del Dot und M. Self, 1997. „*Rigidoporus lineatus* (Pers.) Ryvarden in fire salvaged logs stored under water sprinklers in south east Queensland.“ *Material und Organismen* 31 (2): 123 – 143.
- Justesen, U., 2001. „Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry.“ *Journal of Mass Spectrometry* 36 (2): 169 – 178.
- Kretzer, A. M. und T. D. Bruns, 1999. „Use of *atp6* in fungal phylogenetics: An example from Boletales.“ *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13 (3): 483 – 492.

- Kronawitter, I., 1984. „Die Gattung *Hygrocybe* (Agaricales) unter besonderer Berücksichtigung von Pigmentausrüstung und Sippengliederung.“ Dissertation, Universität Regensburg.
- Lee, S. H., M. V. Williams, R. N. DuBois und I. A. Blair, 2003. „Targeted lipidomics using electron capture atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.“ *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 17 (19): 2168 – 2176.
- MacLouf, H., H. Sors und M. Rigaud, 1977. „Recent aspects of prostaglandin biosynthesis: A review.“ *Biomedicine* 26 (6): 362 – 375.
- Margalit, A., K. L. Duffin und P. C. Isakson, 1996. „Rapid quantitation of a large scope of eicosanoids in two models of inflammation: Development of an electrospray tandem mass spectrometry method and application to biological studies.“ *Analytical Biochemistry* 235 (1): 73 – 81.
- Matsumoto, T., A. Ishiyama, Y. Yamaguchi, Masuma R., H. Ui, K. Shiomi, H. Yamada und S. Omura, 1999. „Novel cyclopentanone derivatives pentenocins A and B, with interleukin-1- β converting enzyme inhibitory activity, produced by *Trichoderma hamatum* FO-6903.“ *Journal of Antibiotics* 52 (8): 754 – 757.
- Maucher, H., B. Hause, I. Feussner, J. Ziegler und C. Wasternack, 2000. „Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development.“ *The Plant Journal* 21 (2): 199 – 213.
- Meixner, A., 1975. *Chemische Farbreaktionen von Pilzen*. Vaduz: Strauß und Cramer GmbH.
- Melot, J., 1979. „Éléments de la Flore Mycologique du Baar, I.“ *Bulletin de la Société Mycologique de France* 95 (3): 193 – 238.
- Morrica, P., S. Mustacchi, V. Santagada, A. Senatore und D. Serra, 1984. „Fatty acids and sterols in two *Hygrophorus* species.“ *Bollettino della Societa dei Naturalisti in Napoli* 91: 156 – 156.
- Moser, M. 1983. *Kleine Kryptogamenflora*. Bd. IIb/2 Basidiomyceten: *Die Röhrlinge und Blätterpilze*. 5. bearb. Aufl. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Mueller, L. A., U. Hinz und J.-P. Zryd, 1997. „The formation of betalamic acid and muscaflavin by recombinant dopa-dioxygenase from *Amanita*.“ *Phytochemistry* 44 (4): 567 – 569.
- Murphy, R. C., J. Fiedler und J. Hevko, 2001. „Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry.“ *Chemical Reviews* 101 (2): 479 – 526.
- Murphy, R. C., N. Khaselev, T. Nakamura und L. M. Hall, 1999. „Oxidation of glycerophospholipids from biological membranes by reactive oxygen species: liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of eicosanoid products.“ *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 731 (1): 59 – 71.
- Musso, H., 1979. „The pigments of fly agaric, *Amanita muscaria*.“ *Tetrahedron* 35 (24): 2843 – 2853.

- Naito, A., K. Furutani, F. Nagakawa, K. Kodama, A. Terahara und Y. Osawa, 1979. „Microtecín and its preparation.“ *Japanese Kokai Tokkyo Koho* JP 54122796 A2 19790922.
- Noble, M., D. Noble und R. A. Fletton, 1978. „G2201-C, a new cyclopentenedione antibiotic, isolated from the fermentation broth of *Streptomyces cattleya*.“ *Journal of Antibiotics* 31 (1): 15 – 18.
- Oda, Y., N. Mano und N. Asakawa, 1995. „Simultaneous determination of thromboxane B₂, prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ in whole blood by liquid chromatography/mass spectrometry.“ *Journal of Mass Spectrometry* 30 (12): 1671 – 1678.
- Ohira, S., H. Fujiwara, K. Maeda, M. Habara, N. Sakaedani, M. Akiyama und A. Kuboki, 2004. „Synthesis and structure of diastereomers of pentenocin B produced by *Trichoderma hamatum* FO-6903.“ *Tetrahedron Letters* 45 (8): 1639 – 1641.
- Qu, Y., H.-B. Zhang und J.-K. Liu, 2004. „Isolation and structure of a new ceramide from the basidiomycete *Hygrophorus eburnesus*.“ *Zeitschrift für Naturforschung B: Chemical Sciences* 59B (2): 241 – 244.
- Radulovic, N., D. N. Quang, T. Hashimoto, N. Nukada, M. Tanaka und Y. Asakawa, 2005. „Pregnane-type steroids from the inedible mushroom *Thelephora terrestris*.“ *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 53 (3): 309 – 312.
- Rapier, S., Y. Pelissier, C. Marion, C. Hamitouche, M. Milhau und J. M Bessière, 1997. „Volatile components of steam distillate from mushrooms (Basidiomycetes).“ *Rivista Italiana Eppos*: 607 – 610.
- Rasser, H.-F., 2001. „Neue antimikrobielle und weitere Sekundärmetabolite aus Submerskulturen von verschiedenen Basidiomyceten.“ Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Roth, B. L., M. Poot, S. T. Yue und P. J. Millard, 1997. „Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain.“ *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (6): 2421 – 2431.
- Seepersaud, M. und Y. Al-Abed, 2000. „The polyhydroxy cyclopentene, a total synthesis of (-)-pentenomycin.“ *Tetrahedron Letters* 41 (22): 4291 – 4293.
- Shono, T., Y. Matsumura, S. Yamane und M. Suzuki, 1980. „First synthesis of an epimer of (±)-pentenomycin I“. *Chemistry Letters* (12): 1619 – 1620.
- Si-Ammour, A., B. Mauch-Mani und F. Mauch, 2003. „Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: β -aminobutyric acid but not BTH protects potato and *Arabidopsis* from infection.“ *Molecular Plant Pathology* 4 (4): 237 – 248.
- Singer, R., 1986. *Agaricales in modern taxonomy*. 4. Aufl. Königstein: Koeltz Scientific Books.

- Smith III., A. B. und N. N. Pilla, 1980. „A stereospecific total synthesis of ($\pm$)-epipentenomycin I, ($\pm$)-epipentenomycin II and ($\pm$)-epipentenomycin III.“ *Tetrahedron Letters* 21 (49): 4691 – 4694.
- Steglich, W., A. Thilmann, H. Besl und A. Bresinsky, 1977. „Pilzpigmente 29. 2,5-Diarylcyclopentan-1,3-dione aus *Chamonixia caespitosa* (Basidiomycetes).“ *Zeitschrift für Naturforschung C: Biosciences* 32c (9 – 10): 46 – 48.
- Strack, D., T. Vogt und W. Schliemann, 2003. „Recent advances in betalain research.“ *Phytochemistry* 62 (3): 247 – 269.
- Straus, D. S. und Ch. K. Glass, 2001. „Cyclopentenone prostaglandins: New insight on biological activities and cellular targets.“ *Medical Research Reviews* 21 (3): 158 – 210.
- Takatsu, T., A. Yoshida, T. Yano und K. Tanaka, 2002. „Antifungal compound F-15784 manufacture with *Rigidoporus lineatus*.“ *Japanese Kokai Tokkyo Koho JP* 2002114771 A2 20020416
- Takatsuto, S., B. Ying, M. Morisaki und N. Ikekawa, 1982. „Microanalysis of brassinolide and its analogues by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.“ *Journal of Chromatography* 239: 233 – 241.
- Talou, T., S. Breheret/Hulin-Bertaud und A. Gaset, 2000. „Identification of the major key flavour compounds in odorous wild mushrooms.“ P. Schieberle und K.-H. Engel [Editoren], *Frontiers of Flavour Science [Proceedings of the Weurman Flavour Research Symposium]*, Bd. 9. Garching: Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 46 – 50.
- Teichert, A., 2004. „Fungitoxische Inhaltsstoffe aus Fruchtkörpern der Gattung *Hygrophorus* (Basidiomycetes).“ Diplomarbeit, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale).
- Teichert, A., T. Lübken, J. Schmidt, A. Porzel, N. Arnold und L. Wessjohann, 2005. „Unusual bioactive 4-oxo-2-alkenoic fatty acids from *Hygrophorus eburneus*.“ *Zeitschrift für Naturforschung B: Chemical Sciences* 60B (1): 25 – 32.
- Terradas, F. und H. Wyler, 1991. „2,3-secodopa and 4,5-secodopa, the biosynthetic intermediates generated from L-DOPA by an enzyme system extracted from the fly agaric, *Amanita muscaria* L., and their spontaneous conversion to muscaflavin and betalamic acid, respectively, and betalains.“ *Helvetica Chimica Acta* 74 (1): 124 – 140.
- Tuchinda, P., J. Udchachon, V. Reutrakul, T. Santisuk, W.C. Taylor, N.R. Farnsworth, J.M. Pezzuto und A.D. Kinghorn, 1991. „Bioactive butenolides from *Melodorum fruticosum*.“ *Phytochemistry* 30 (8): 2685 – 2689.
- Umino, K., T. Furumai, N. Matsuzawa, Y. Awataguchi, Y. Ito und T. Okuda, 1973. „Studies on pentenomycins. I. Production, isolation and properties of pentenomycins I and II, new antibiotics from *Streptomyces eurythermus* MSRL 0738.“ *Journal of Antibiotics* 26 (9): 506 – 512.

- Wakita, S., 1977. „Sterols in the mushrooms.“ *Science Reports of the Yokohama National University, Section 2: Biology and Geology* 24: 33 – 66.
- Wood, W. F., J. Smith, K. Wayman und D. L. Largent, 2003. „Indole and 3-chloroindole: the source of the disagreeable odor of *Hygrophorus paupertinus*.“ *Mycologia* 95 (5): 807 – 808.
- Yokokawa, H. und T. Mitsuhashi, 1981. „The sterol composition of mushrooms.“ *Phytochemistry* 20 (6) 1349 – 1351.
- Zhang, J. und J. S. Brodbelt, 2003. „Structural characterization and isomer differentiation of chalcones by electrospray ionization tandem mass spectrometry.“ *Journal of Mass Spectrometry* 38 (5): 555 – 572.

A. Anhang

Tabelle A.1. Makrochemische Reaktionen nach Bas (1990), Bon (1992), Candusso (1997), Meixner (1975) und Moser (1983).

Art	Pilzteil	Reagenz	Farbe	Literatur
<i>H. arbustivus</i>	Lamellen	H ₂ SO ₄	purpurrosa	Meixner (1975)
<i>H. arbustivus</i> var. <i>quercetorum</i>	Hutzentrum	NH ₄ OH KOH	entfärbend gelb	Candusso (1997) Candusso (1997)
<i>H. agathosmus</i>	Fruchtfleisch	Phenol, Guajak, Formol	keine Reaktion	Meixner (1975)
		Sulfovanillin	violett	Meixner (1975)
			rosa oder violett	Bon (1992)
		Sulfoformol	bald hellblau	Meixner (1975)
	Lamellen	H ₂ SO ₄	purpurrot	Meixner (1975)
<i>H. camarophyllus</i>	Fruchtfleisch	Phenol	rasch braun	Meixner (1975)
		Phenolanilin	weinrot	Meixner (1975)
		Guajak	langsam blassblau	Meixner (1975)
		Lactophenol	violett, dann braun	Meixner (1975)
<i>H. caprinus</i>	Fruchtfleisch	Guajak	± grün bis bläulich	Bon (1992)
<i>H. chrysaspis</i>	Fruchtfleisch	KOH	gelbbraun ¹	Meixner (1975)
<i>H. chrysodon</i>	Fruchtkörper	NaOH, KOH, NH ₄ OH	gilbend, dann orange-rotbraun	Bon (1992)
	Fruchtfleisch	KOH	gelb	Meixner (1975)
		Phenol	braun	Meixner (1975)
		Phenolanilin	rotbraun	Meixner (1975)
		Guajak	langsam blau	Meixner (1975)
			± grün bis bläulich	Bon (1992)
		Anilin	gelb	Meixner (1975)

¹nur solange der Fruchtkörper noch rein weiß ist

Tabelle A.1. Fortsetzung: Makrochemische Reaktionen.

Art	Pilzteil	Reagenz	Farbe	Literatur
<i>H. cossus</i>	Fruchtkörper	KOH, NaOH	negativ	Candusso (1997)
		KOH	gelb	Moser (1983)
	Fruchtfleisch, Stielrinde	KOH	keine Reaktion oder nur schwach	Meixner (1975)
	Fruchtfleisch	Phenolanilin	weinrot	Meixner (1975)
		Guajak	langsam blau	Meixner (1975)
			grün bis bläulich	Bon (1992)
	Fruchtfleisch, Stielrinde, Lamellen	Formol	violettbraun	Meixner (1975)
<i>H. dichrous</i>	interzelluläres Pigment	NH ₄ OH	blaugrün	Moser (1983)
	Hyphen der Huthaut	NH ₄ OH	intensiv blaugrün	Meixner (1975)
<i>H. discoxanthus</i>	Fruchtkörper	NaOH, KOH, NH ₄ OH	gilbend, dann orange-rotbraun	Bon (1992)
	Hut	KOH	orange-braun	Bas (1990)
	Fleisch, Hut, Stielbasis	KOH	zitronengelb bis rostbraun	Candusso (1997)
<i>H. eburneus</i>	Stielbasis	KOH	fleischfarben - orange	Moser (1983)
	Fruchtkörper	NaOH, KOH, NH ₄ OH	gilbend, dann orange-rotbraun	Bon (1992)
	Huthaut	KOH	ocker, dann braun	Meixner (1975)
		Phenolanilin	keine Reaktion	Meixner (1975)
		H ₂ SO ₄	keine Reaktion	Meixner (1975)
	Fruchtfleisch	Guajak	blau	Meixner (1975)
			grün bis bläulich	Bon (1992)
<i>H. eburneus</i> var. <i>quercetorum</i>	Fleisch	KOH	ocker, braun-ocker	Candusso (1997)
			ocker, rotbraun (statt orange, orangebraun)	Bas (1990)

Tabelle A.1. Fortsetzung: Makrochemische Reaktionen.

Art	Pilzteil	Reagenz	Farbe	Literatur
<i>H. eburneus</i> var. <i>eburneus</i>	Stielbasis	KOH	orange, orangebraun	Bas (1990)
			orange, orangebraun	Candusso (1997)
<i>H. erubescens</i>	Fruchtkörper	NaOH, KOH, NH ₄ OH	grünlich-gelb	Bon (1992)
	Fruchtfleisch	KOH	gelblich	Meixner (1975)
	Huthaut	KOH	leicht grünlich gelblich	Meixner (1975)
		Phenol, Guajak	keine Reaktion	Meixner (1975)
	Fruchtfleisch	FeSO ₄	langsam gräulich	Meixner (1975)
<i>H. fuscoalbus</i>	Stielrinde	KOH	sofort ockergelb	Meixner (1975)
	Fruchtfleisch	Phenolanilin, Guajak	keine Reaktion	Meixner (1975)
<i>H. gliocyclus</i>	Fruchtkörper	NaOH, KOH, NH ₄ OH	gilbend, dann orange-rotbraun (flüchtig)	Bon (1992)
	Fruchtkörper	KOH	keine Reaktion	Meixner (1975)
	Huthaut	KOH	flüchtig ockergelb	Meixner (1975)
	Fruchtfleisch	Phenol	keine Reaktion	Meixner (1975)
			langsam blaugrün	Meixner (1975)
		Guajak	grün bis bläulich	Bon (1992)
			sofort violettrot	Meixner (1975)
		Sulfovanillin	rosa oder violett	Bon (1992)
			keine Reaktion	Meixner (1975)
<i>H. hedrychii</i>	Stielbasis, Hut	KOH, NaOH	blaß ocker	Bas (1990)
<i>H. hyacinthinus</i>	Fruchtkörper	Sulfovanillin	rosa oder violett	Bon (1992)
<i>H. hypothejus</i>	Fruchtfleisch	KOH, Phenol, Phe- nolanilin, Guajak	keine Reaktion	Meixner (1975)

Tabelle A.1. Fortsetzung: Makrochemische Reaktionen.

Art	Pilzteil	Reagenz	Farbe	Literatur
<i>H. latitabundus</i>	Fruchtkörper	NaOH, KOH, NH ₄ OH	gilbend, dann orange-rotbraun (schwach)	Bon (1992)
	Stielbasis, Hutrand	NH ₄ OH	orange	Bon (1992)
	Stielspitze	KOH	gelb	Bas (1990)
	Hut, Stielbasis	KOH	kräftig orange	Bas (1990)
	Stielspitze	KOH	gelb	Candusso (1997)
	Stielbasis	KOH	orange	Candusso (1997)
	Stiel	NaOH	gelb-ocker	Candusso (1997)
	Stielbasis, Hut	NH ₄ OH	orange	Candusso (1997)
	Fruchtkörper	Sulfovanillin	rosa oder violett	Bon (1992)
<i>H. lucorum</i>	Fruchtfleisch	Guajak	keine Reaktion	Meixner (1975)
		Sulfovanillin	violett	Meixner (1975)
			rosa oder violett	Bon (1992)
<i>H. limacinus</i>	Huthaut, Stielrinde	KOH	ockergelb	Meixner (1975)
	Fruchtfleisch	Phenol, Guajak	keine Reaktion	Meixner (1975)
		Sulfovanillin	violett	Meixner (1975)
<i>H. ligatus</i>	Fruchtkörper	NaOH, KOH, NH ₄ OH	gilbend, dann orange-rotbraun	Bon (1992)
<i>H. marzuolus</i>	Fruchtfleisch	Guajak	keine Reaktion	Meixner (1975)
<i>H. melizeus</i>	Fruchtfleisch	KOH	gelbbraun	Meixner (1975)
<i>H. nemoreus</i>	Huthaut	KOH	bleicht	Meixner (1975)
	Fruchtfleisch	Guajak	keine Reaktion	Meixner (1975)
<i>H. olivaceoalbus</i>	Fleisch	NaOH	rot-orange	Candusso (1997)
	Stielrinde	KOH	sofort hellgelb	Meixner (1975)
	Fruchtfleisch	Phenol, Guajak	keine Reaktion	Meixner (1975)
		H ₂ SO ₄	rot	Meixner (1975)

Tabelle A.1. Fortsetzung: Makrochemische Reaktionen.

Art	Pilzteil	Reagenz	Farbe	Literatur
<i>H. penarius</i>	nur Stiel	NaOH, KOH, NH ₄ OH	gilbend, dann orange-rotbraun	Bon (1992)
	Stielbasis	KOH	gelb, orange	Bas (1990)
	Fruchtfleisch	KOH	gelb	Meixner (1975)
		Guajak	langsam blaß grünlich	Meixner (1975)
<i>H. persoonii</i>	Fruchtkörper	NH ₄ OH	olivgrün, bläulich	Bon (1992)
	Hut	NH ₄ OH	negativ, gelegentlich blau-grün	Bas (1990)
		KOH	gelb-braun	Bas (1990)
	Stielbasis	KOH	orange-rot	Bas (1990)
	Fleisch	NaOH	Grün	Candusso (1997)
	Fruchtkörper	NH ₄ OH	sofort grün-blau	Candusso (1997)
<i>H. poetarum</i>	Stielbasis	Guajak	blau-grün	Meixner (1975)
<i>H. pudorinus</i>	Fruchtkörper	NaOH, KOH, NH ₄ OH	orange-rot	Bon (1992)
	Fruchtfleisch, Stielrinde	KOH	lebhaft rotorange	Meixner (1975)
	Fruchtfleisch	Phenol	keine Reaktion	Meixner (1975)
		Guajak	langsam blaugrau	Meixner (1975)
			grün bis bläulich	Bon (1992)
<i>H. pustulatus</i>	Stielbasis	KOH	violett	Meixner (1975)
			rosa oder violett	Bon (1992)
	Fruchtfleisch	Guajak	langsam blau	Meixner (1975)
			grün bis bläulich	Bon (1992)
		Sulfovanillin	violett	Meixner (1975)
<i>H. queletii</i>	Fruchtkörper	NaOH, KOH, NH ₄ OH	gilbend, dann orange-rotbraun	Bon (1992)
	Fleisch	KOH	gelb	Moser (1983)

Tabelle A.1. Fortsetzung: Makrochemische Reaktionen.

Art	Pilzteil	Reagenz	Farbe	Literatur
<i>H. russula</i>	Fleisch	NaOH, KOH, NH ₄ OH	grünlich-gelb (schwach)	Bon (1992)
	Fruchtfleisch	KOH	sofort grünlich gelb	Meixner (1975)
		Phenol, Guajak	keine Reaktion	Meixner (1975)
	Huthaut	KOH	schmutzig weiß	Meixner (1975)

Lebenslauf

Name Tilo Lübken
Geburtsdatum 10. 09. 1975
Geburtsort Eberswalde-Finow

Schulbildung

Sept. 1982 – Polytechnische Oberschule, Eberswalde-Finow
Juli 1990
Sept. 1990 – Carl-Friedrich-Gauß-Gymnasium (mathematisch, naturwissenschaftlich,
Aug. 1995 technische Richtung), Frankfurt (Oder)
24. 06. 1995 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Okt. 1995 – Studium der Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Aug. 2000 Abschluss: Diplom-Chemiker
Diplomarbeit: Chemisch-analytische Untersuchungen zum Gehalt von
Polyphenolen und anderen Inhaltsstoffen in Weinsorten
aus Sachsen und Sachsen-Anhalt
Betreuer: Prof. Dr. W. Lorenz
März 2001 – Experimentelle Arbeiten zur Dissertation in der Abteilung Natur- und
Nov. 2005 Wirkstoffchemie am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale)

Tätigkeiten

Aug. 2000 – Wissenschaftliche Hilfskraft im Fachbereich Chemie,
Febr. 2001 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
März 2001 – Wissenschaftlicher Angestellter am Leibniz-Institut für
Nov. 2005 Pflanzenbiochemie Halle (Saale)

Halle (Saale), den 11. November 2005

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Tilo Lübken, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit wurde an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Tilo Lübken

