



universität  
wien

# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Isolierung und Charakterisierung von Triterpenen aus  
Chaga (*Inonotus obliquus*)“

verfasst von / submitted by

Adele Kellner, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2023 / Vienna 2023

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Judith M. Rollinger

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Dr. Benjamin Kirchweger







## Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Masterarbeit unterstützt und motiviert haben.

Zuerst gebührt mein Dank Univ.-Prof.Dr. Judith M. Rollinger, die meine Masterarbeit betreut und begutachtet hat. Für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Mitbetreuer Dr. Benjamin Kirchweger bedanken für die enorme Unterstützung bei der Durchführung des praktischen Teils im Labor und bei der Verfassung der Masterarbeit.

Weiters möchte ich mich auch bei Martin Zehl, Fakultät für Chemie an der Universität Wien sowie bei Nicolas Coudevylle, Division der Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien für die NMR-Messungen bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Verena Dirsch bedanken für die Aktivitätsmessungen, die bereits im Rahmen des Projekts im Vorfeld durchgeführt wurden.

Danke auch der gesamten Pharmakognosie Abteilung für die Unterstützung und für die schöne und lustige Zeit die ich mit euch verbringen durfte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich in all meinen Entscheidungen unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich noch all denjenigen danken, die nicht nur in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit, sondern auch während des gesamten Studiums für mich da waren, insbesondere meiner Schwester und meinem Partner.



# INHALTSVERZEICHNIS

---

|       |                                                                                            |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.    | Abstract .....                                                                             | 11 |
| 2     | Zusammenfassung.....                                                                       | 12 |
| 3     | Zielsetzung.....                                                                           | 13 |
| 4     | Einleitung.....                                                                            | 14 |
| 4.1   | <i>Inonotus obliquus</i> .....                                                             | 14 |
| 4.2   | ROR <sub>yt</sub> Rezeptor.....                                                            | 18 |
| 5     | Ergebnisse und Diskussion .....                                                            | 20 |
| 5.1   | Ermittlung des optimalen Extraktionsmittels für Triterpene .....                           | 20 |
| 5.2   | Extraktion im großen Maßstab .....                                                         | 22 |
| 5.3   | Flüssig- Flüssig Extraktion .....                                                          | 23 |
| 5.4   | Fraktionierung der DCM- Fraktion und Isolierung der Inhaltsstoffe .....                    | 26 |
| 5.4.1 | Fraktionierung mittels Flash- Chromatographie (FC).....                                    | 26 |
| 5.4.2 | Präparative SFC der Fraktion IO_LS_DCM_12.....                                             | 31 |
| 5.4.3 | Aufreinigung der Fraktion IO_LS_DCM_12_1 mittels Flash-Chromatographie. 37                 |    |
| 5.4.4 | Auftrennung der Fraktion IO_LS_DCM_12_5 mittels Größenausschluss-<br>Chromatographie ..... | 38 |
| 5.4.5 | Auftrennung der Fraktion IO_LS_DCM_13 mittels Größenausschluss-<br>Chromatographie .....   | 39 |
| 5.4.6 | Flash- Chromatographie der Fraktion IO_LS_DCM_14 .....                                     | 40 |
| 6     | Schlussfolgerung und Ausblick .....                                                        | 42 |
| 7     | Material und Methoden.....                                                                 | 44 |
| 7.1   | Ausgangsmaterial.....                                                                      | 44 |
| 7.2   | Ermittlung des optimalen Extraktionsmittels für Triterpene .....                           | 44 |
| 7.3   | Extraktion mit Aceton im Großmaßstab.....                                                  | 45 |
| 7.4   | Chromatographie.....                                                                       | 45 |

|       |                                                                    |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------|----|
| 7.4.1 | Dünnschichtchromatographie.....                                    | 45 |
| 7.4.2 | UPC <sup>2</sup> – Superkritische Flüssigkeitschromatographie..... | 45 |
| 7.4.3 | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....                     | 48 |
| 7.4.4 | Flash-Chromatographie.....                                         | 49 |
| 7.4.5 | Größenausschluss-Chromatographie.....                              | 51 |
| 7.5   | Massenspektrometrie.....                                           | 52 |
| 7.6   | Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....                           | 52 |
| 8     | Literaturverzeichnis.....                                          | 53 |
|       | Anhang.....                                                        | 55 |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                    |                                                              |
|--------------------|--------------------------------------------------------------|
| CD                 | Cluster of differentiation                                   |
| CDCl <sub>3</sub>  | Deuteriertes Chloroform                                      |
| CD <sub>3</sub> OD | Deuteriertes Methanol                                        |
| CO <sub>2</sub>    | Kohlenstoffdioxid                                            |
| DC                 | Dünnschichtchromatographie                                   |
| DCM                | Dichlormethan                                                |
| ELSD               | Evaporative light scattering detector (= Lichtstreudetektor) |
| FC                 | Flash-Chromatographie                                        |
| et al.             | et alii (lat.)                                               |
| EtOAc              | Ethylacetat                                                  |
| EtOH               | Ethanol                                                      |
| FDA                | Food and Drug Administration                                 |
| HMBC               | Heteronuclear multiple bond correlation                      |
| HSQC               | Heteronuclear single quantum coherence                       |
| IL-17              | Interleukin-17                                               |
| IPA                | Isopropanol                                                  |
| m/z                | Mass-to-charge ratio                                         |
| MeOH               | Methanol                                                     |
| MS                 | Massenspektrometrie                                          |
| NCoA-1             | Nuclear Rezeptor Coactivator 1                               |
| NCoR               | Nuclear receptor co-repressor 1                              |
| NMR                | Nuclear magnetic resonance (= Kernspinresonanzspektroskopie) |

|                  |                                                                                                              |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PDA              | Photo diode array detector (= Photodiodenzeilen Detektor)                                                    |
| R <sub>t</sub>   | Retentionszeit                                                                                               |
| ROR <sub>γ</sub> | Retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma (= Retinsäure-Rezeptor verwandte Orphan-Rezeptor-gamma) |
| SFC              | Superkritische Flüssigkeitschromatographie                                                                   |
| SMRT 22          | Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor 22                                          |
| SPE              | Solid-phase Extraction (=Festphasenextraktion)                                                               |
| SRC-1            | Steroid receptor coactivator 1                                                                               |
| UPLC             | Ultra performance liquid chromatography<br>(=Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)                       |

## 1. Abstract

---

*Inonotus obliquus*, commonly known as chaga, is a parasitic fungus that occurs mainly on birch trees and has been used for centuries as traditional medicine. The sclerotia used for this purpose are believed to have anti-inflammatory, anti-cancer, and anti-diabetic effects. Previously, the retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma (ROR<sub>γt</sub>) and the Takeda G-protein-coupled receptor 5 (TGR-5) have been identified as possible target proteins. Both receptors are promising drug targets against inflammatory and metabolic diseases and are modulated by chaga triterpenes. Two previously isolated lanostane triterpenes which were presumably acetylated derivatives of inonotsutriol A (**1**, **2**) have been shown to be potent modulatory ligands at the ROR<sub>γt</sub> in a previously performed bioactivity screening.

The aim of this work was therefore to reisolate these two compounds in sufficient quantities and purities to unambiguously characterize their structure. A further aim is to identify and isolate further congeners of these compounds to probe the bioactive chemical space of this structural compound class, especially at the ROR<sub>γt</sub> receptor.

To achieve these goals, an acetone extract was prepared from > 3 kg of ground and dried Chaga sclerotia. Using liquid-liquid partitioning and dry-load normal phase flash chromatography, 16 phenol-depleted fractions were prepared. One of the sought triterpenoids was identified in fraction 12 and recovered by two additional chromatographic methods, preparative SFC and RP-UPLC. In addition, four further chaga triterpenoids have been isolated and identified; these are: Inotodiol (**3**), trametenolic acid (**4**), inonotsutriol A (**5**), and lanosterol (**9**).

Further studies will reveal their potential to modulate the ROR<sub>γt</sub> receptor. Thus, this study makes an important contribution to our understanding of the therapeutic potential of *Inonotus obliquus*.

## 2 Zusammenfassung

---

*Inonotus obliquus*, gemeinhin als Chaga bekannt, ist ein parasitärer Pilz, der hauptsächlich auf Birken vorkommt und seit Jahrhunderten als traditionelle Medizin verwendet wird. Den zu diesem Zweck verwendeten Sklerotien wird eine entzündungshemmende, krebshemmende und antidiabetische Wirkung zugeschrieben. Bisher wurden der Retinsäure-Rezeptor-verwandte Orphan-Rezeptor-gamma ( $ROR_{\gamma t}$ ) und der Takeda G-Protein-gekoppelte Rezeptor 5 (TGR-5) als mögliche Zielproteine identifiziert. Beide Rezeptoren sind vielversprechende Zielproteine für Medikamente gegen Entzündungs- und Stoffwechselkrankheiten und werden durch Chaga-Triterpenoide moduliert. Zwei zuvor isolierte Lanostan-Typ Triterpene, bei denen es sich vermutlich um acetylierte Derivate von Inonotsutriol A (**1**, **2**) handelt, haben sich in früheren Bioaktivitäts-Screenings als potente modulierende Liganden am  $ROR_{\gamma t}$  erwiesen.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, diese beiden Verbindungen in ausreichender Menge und Reinheit zu isolieren, um ihre Struktur eindeutig zu charakterisieren. Außerdem sollten potenzielle neue Triterpene gefunden werden, die an den beiden Rezeptoren, insbesondere am  $ROR_{\gamma t}$ -Rezeptor, getestet werden sollten.

Um diese Ziele zu erreichen, wurde aus über 3 kg gemahlenen und getrockneten Chaga-Sklerotien ein Aceton-Extrakt hergestellt. Mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion und Normalphasen-Flash-Chromatographie wurden 16 phenolarme Fraktionen hergestellt. Eines der gesuchten Triterpene wurde in Fraktion 12 identifiziert und durch zwei weitere chromatographische Schritte, präparative SFC und RP-UPLC, wiedergewonnen. Darüber hinaus wurden vier weitere Chaga-Triterpene isoliert und identifiziert; diese sind: Inotodiol (**3**), Inonotsutriol A (**4**), Trametanolsäure (**5**) und Lanosterol (**9**).

Weitere Studien werden ihr Potenzial zur Modulation des  $ROR_{\gamma t}$ -Rezeptors aufzeigen. Somit leistet diese Studie einen wichtigen Beitrag zu unserem Verständnis des therapeutischen Potenzials von *Inonotus obliquus*.

### 3 Zielsetzung

---

*Inonotus obliquus* (Ach. ex Persoon:Fr.) Pilát wird in Nordeuropa, Japan und China traditionell bereits seit vielen Generationen für die Heilung von Krankheiten wie Diabetes, Autoimmunerkrankungen aber auch Krebs angewendet. Seine traditionelle Verwendung ist jedoch weder durch klinische Studien unterstützt noch gibt es eine umfassende mycochemische und molekularbiologische Grundlage für die beschriebenen Aktivitäten. Um die wirksamen Bestandteile des Pilzes aufzudecken und deren molekularen Wirkmechanismus zu erforschen, ist es notwendig, Inhaltstoffe zu isolieren und zu charakterisieren, sowie diese weiters *in-vitro* auszutesten. Im Falle der Chaga Triterpene sind besonders Wirkungen am ROR<sub>yt</sub> und and dem TGR-5 Rezeptor zu erwarten. So wurden in einer vorangegangenen Masterarbeit bereits vielversprechende Triterpene wie das vermeintliche 21, 22 - Diacetyloxy – Inonotsutriol A (**1**) und 16,21 – Diacetyloxy – Inonotsutriol A (**2**) isoliert. Diese wurden jedoch nicht in ausreichender Menge und Reinheit für eine gänzliche Charakterisierung isoliert.

Das Ziel dieser Arbeit ist vorrangig die Reisolierung dieser Substanzen, aber auch das Auffinden weiterer Triterpene dieser Stoffklasse für die Austestung an verschiedenen Rezeptoren, vor allem am ROR<sub>yt</sub> Rezeptor.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein frisch hergestellter Extrakt mithilfe verschiedener chromatographischer Trennmethode in Fraktionen und Unterfraktionen aufgetrennt. Diese wurden anschließend weiter aufgereinigt, um Reinstoffe zu erhalten. Hierbei wurden die erhaltenen Chromatogramme mit Isolaten der vorangegangenen Masterarbeit verglichen, um die vielversprechenden Triterpene ausfindig zu machen.

Die Reinheit wurde mittels UPC<sup>2</sup> bzw. UPLC und einem Lichtstreuendetektor (ELSD) ermittelt. Die Strukturen der isolierten Triterpene wurden später von Benjamin Kirchweber mithilfe von Massenspektrometrie (MS) und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) aufgeklärt.

## 4 Einleitung

---

### 4.1 *Inonotus obliquus*

Der Weißfäulepilz namens *Schiefer Schillerporling*, *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát, gemeinhin als Chaga bekannt, ist ein holzparasitierender und sklerotienbildender Pilz aus der Familie der Hymenochaetaceae der Basidiomyceten (Abbildung 1).



Abbildung 1 *Inonotus obliquus* auf einer Birke

Er wächst hauptsächlich auf lebenden Birkenstämmen, überwiegend zwischen den Breitengraden 45°N und 50°N.<sup>1,2</sup> *I. obliquus* infiziert etwa 30 bis 50 Jahre alte Bäume durch Wunden in der Rinde. Nach der Infektion kann er noch weitere 30 bis 80 Jahre am Stamm wachsen. Einige Jahre nach dem Eindringen in den Stamm bildet er Sklerotien, also vegetative und ungeschlechtliche Überdauerungsorgane. Das innere dieser Sklerotien besteht aus rostbraunem dichten Mycel. Nach vielen Jahren stirbt der Wirtsbaum ab und es wächst im morschen Stamm eine Fruchtschicht. Diese bildet sexuelle Sporen zur Fortpflanzung.<sup>3</sup>

Als Reaktion auf zahlreiche Stressfaktoren in seiner natürlichen Umgebung hat *I. obliquus* komplexe Abwehrmechanismen entwickelt. Zu diesen Mechanismen gehört die Produktion verschiedener bioaktiver Substanzen: Antioxidantien, Triterpene, Ergosterol und dessen Peroxid, Sesquiterpene, Benzoesäurederivate, Hispidinanaloga und Melanine.<sup>3</sup>

In Osteuropa ist eine Verwendung des Chaga-Pilzes als traditionelles Heilmittel seit dem 12. Jahrhundert nachgewiesen. Die Sklerotien wurden aufgrund ihrer zugeschriebenen antiparasitären, antituberkulösen, entzündungshemmenden und gastrointestinalen Eigenschaften eingesetzt, zum Beispiel zur Behandlung von Magen-Darm-Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diabetes- am häufigsten in Form von Aufgüssen, Inhalationen oder wässrigen Mazeraten.<sup>1-3</sup>

Es gibt bereits zahlreiche Verfahren zur Extraktion von Substanzen aus dem Chaga- Pilz. Die Verwendung von wässrigen oder ethanolischen Extraktionsmitteln wäre dem in der Volksmedizin verwendeten Methoden am ähnlichsten und ermöglicht die direkte Anwendung. Jedoch sind organische Lösungsmittel wie Methanol, Aceton oder auch Ethylacetat notwendig, um auch in Wasser- oder Ethanol unlösliche Stoffe zu isolieren.<sup>3</sup> Eine weitere Möglichkeit wäre die Extraktion mit superkritischem CO<sub>2</sub>. Nghia Huynh und MitarbeiterInnen<sup>4</sup> haben verschiedene Temperatur-Druck Kombinationen getestet und zeigten, dass diese Methode eine umweltfreundliche Alternative zur Extraktion mit organischen Lösungsmitteln darstellt. Zu erwähnen ist jedoch, dass die Ausbeute an Triterpenen bei der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln höher war.<sup>4</sup>

Die lipophile Fraktion der Sekundärmetaboliten besteht hauptsächlich aus Lanostan Triterpenen. Bei den wichtigsten Triterpenen handelt es sich um Inotodiol (**3**) und Trametanolsäure (**4**).<sup>5</sup> Auch pentazyklische Triterpene wie zB. Inonotsutriol A (**5**) Inonotsutriol B (**6**) oder Inonotsuoxide A sind in Chaga zu finden.<sup>6</sup> Es werden immer noch neue Triterpene in *I. obliquus* entdeckt. Chao Liu und MitarbeiterInnen<sup>7</sup> isolierten im Jahr 2013 insgesamt 30 Triterpene darunter 8 neue. Fenqin Zhao und MitarbeiterInnen<sup>6</sup> haben 2015 über 20 Triterpene aus Chaga isoliert. Unter anderem auch drei neue Triterpene vom Lanostan Typ.<sup>6</sup> Darüber hinaus sind auch Triterpene vom Lupan Typ wie Betulin (**7**) oder Betulinsäure (**8**) in den Sklerotien von Chaga häufig beschrieben.<sup>8</sup> Rein Drenkhan und MitarbeiterInnen<sup>8</sup> haben *I. obliquus* von verschiedenen Wirtspflanzen (*Alnus* und *Betula*- Arten) gesammelt. Es gab eine signifikante Variation im Gehalt an Inotodiol (**3**) und Lanosterol (**9**) innerhalb der Proben der gleichen Baumart, aber der Gehalt der verschiedenen Substanzen unterschied sich nicht signifikant zwischen Proben von *Alnus incana* und *Betula pendula*. Betulin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucan sowie die gesamten Polyphenole und Flavonole waren in den Sklerotien von *Betula* und *Alnus* vertreten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *I. obliquus* selbst sowohl auf den Baumarten *Betula* als auch *Alnus* die eigentliche Quelle dieser Verbindungen sein könnte.<sup>8</sup>

Wie oben bereits erwähnt können sich die Inhaltstoffmuster auch aufgrund der geografischen Herkunft der Pilze unterscheiden. Antoine Géry und seine MitarbeiterInnen<sup>9</sup> haben die Konzentration von Inotodiol (**3**), Betulin (**7**) und Betulinsäure (**8**) in Extrakten aus ukrainischen, französischem und kanadischen Chaga verglichen und konnten zeigen, dass es regionale Unterschiede gibt (Tabelle 1). Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass die unterschiedliche Konzentration dieser Metaboliten nicht nur auf Umweltfaktoren (Klima, Wirtsbaum usw.),

sondern auch auf die Konservierungstechnik und die Zeitspanne zwischen der Ernte und der Herstellung der Extrakte zurückzuführen sein können.<sup>9</sup> Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Triterpenmuster von Chaga sehr komplex ist.

Tabelle 1 Quantifizierung von Betulin, Betulinsäure und Inotodiol in verschiedenen Zubereitungen von Chaga<sup>9</sup>

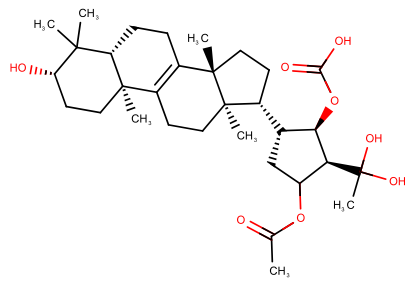
|                            | Zubereitung        | Betulin<br>(mg/L) | Betulinsäure<br>(mg/L) | Inotodiol<br>(mg/L) |
|----------------------------|--------------------|-------------------|------------------------|---------------------|
| <b>Kanadischer Chaga</b>   | Cyclohexanextrakt  | 0,15              | 0,12                   | 8,27                |
|                            | Ethylacetatextrakt | 13,45             | 5,12                   | 464,86              |
| <b>Ukrainischer Chaga</b>  | Cyclohexanextrakt  | 0,78              | 0,14                   | 41,37               |
|                            | Ethylacetatextrakt | 0,88              | 1,12                   | 147,56              |
| <b>Französischer Chaga</b> | Cyclohexanextrakt  | 6,48              | 0,37                   | 373,02              |
|                            | Ethylacetatextrakt | 1100              | 52,92                  | 11,70               |

Für viele Triterpene ist eine Bioaktivität bereits bekannt. Xia Zhang und MitarbeiterInnen<sup>10</sup> haben gezeigt, dass Inotodiol (**3**) sich als schützend gegen Streptozotocin-induzierten Diabetes bei Ratten durch Senkung des Blutzuckerspiegels auswirkt. Es verbesserte auch die Überlebensrate der Tiere. Außerdem reduzierte Inotodiol (**3**) die Schädigung der Bauchspeicheldrüse, die durch Streptozotocin verursacht wird.<sup>10</sup> Christian W. Wold und MitarbeiterInnen<sup>11</sup> belegten die entzündungshemmende und immunmodulatorische Wirkung von Melanin und Triterpenen aus *I. obliquus in vitro*.

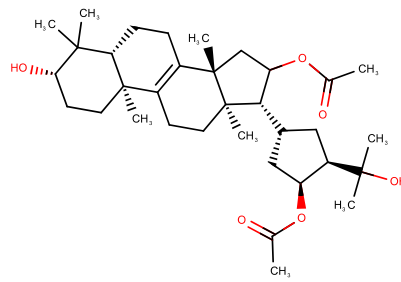
Diese Arbeit beschäftigt sich in erster Linie mit diesen Triterpenen und deren Isolierung. Alle in der Arbeit beschriebenen Substanzen aus *I. obliquus* sind in Abbildung 2 dargestellt.

In einer vorangegangenen Masterarbeit<sup>12</sup> wurden aus CO<sub>2</sub>-Ethanol Extrakten finnischer Chaga Sklerotien unter anderem zwei möglicherweise neue Triterpene (Abbildung 2: **1,2**) isoliert die eine potente Aktivität als inverse Agonisten am ROR<sub>γ</sub> Rezeptor zeigten. Bei diesen Triterpenen handelt es sich vermutlich um 21, 22 - Diacetyloxy – Inonotsutriol A (**1**) und 16,21 – Diacetyloxy – Inonotsutriol A (**2**). Die genaue Position und stereochemische Konfiguration der Diacetyloxy Gruppen konnte aber nicht bewiesen werden. Diese würden sich nur durch eine scharfe Auflösung von 2D NOESY Korrelationen bestimmen lassen, welche Reinsubstanz in höherer Konzentration und Reinheit benötigt. Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Reisolierung dieser Substanzen, in ausreichender Menge und Reinheit, aber auch das Auffinden potenzieller neuer Triterpene für die Austestung an verschiedenen Rezeptoren, vor allem am ROR<sub>γt</sub> Rezeptor. Die inhibitorische Wirkung am ROR<sub>γt</sub> Rezeptor, könnte die antiinflammatorische

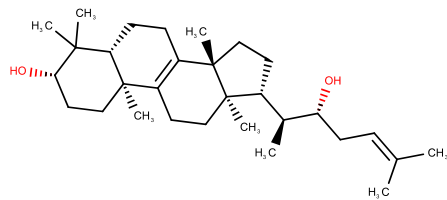
Wirkung von Chaga mitbestimmen und damit auch die traditionelle Anwendung des *I. obliquus* begründen und untermauern.



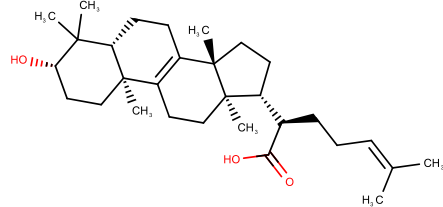
21, 22- Diacetyloxy- Inonotsutriol 1 (1)



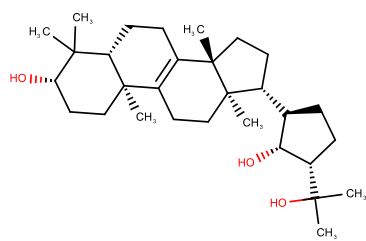
16, 21- Diacetyloxy- Inonotsutriol 2 (2)



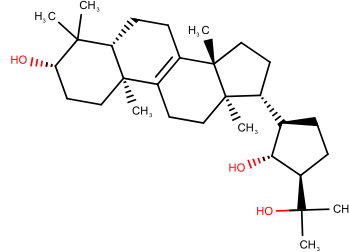
Inotodiol (3)



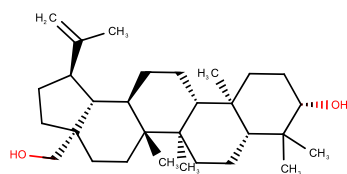
Trametenolsäure (4)



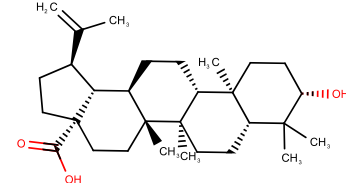
Inonotsutriol A (5)



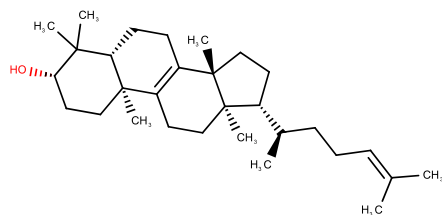
Inonotsutriol B (6)



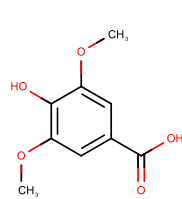
Betulin (7)



Betulinsäure (8)



Lanosterol (9)



Syringasäure (10)

Abbildung 2 Name und Struktur ausgewählter Chaga Triterpene sowie Syringasäure, einer wichtigen Komponente der Phenolfraction

## 4.2 ROR<sub>γt</sub> Rezeptor

Nukleäre Rezeptoren (NR) sind eine große Familie von ligandengesteuerten Transkriptionsfaktoren, zu denen die Rezeptoren vieler physiologisch relevanter Liganden wie Steroidhormone, Schilddrüsenhormone, Lipide und Fettsäuren gehören.<sup>13</sup> Die hohe Relevanz der nukleären Rezeptoren in der Pharmazie erkennt man vor allem an der Tatsache, dass 13% aller bereits von der FDA zugelassenen Arzneimitteln die NR als Ziel haben.<sup>14</sup> Als wichtiges Target für die Entwicklung potenzieller neuer Arzneimittel hat sich der mit dem Retinsäure-Rezeptor verwandte Orphan-Rezeptor-gamma, ROR<sub>γ</sub>, herausgestellt. ROR<sub>γ</sub> ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Regulierung der Zelldifferenzierung von proinflammatorische T-Helferzelle 17 (Th17). Außerdem wirkt ROR<sub>γ</sub> auch als Hauptregulator bei der hepatischen Glukoneogenese. Dieser Prozess ist zentral bei der Entwicklung von Stoffwechselstörungen wie zB. dem Typ-2 Diabetes.<sup>13</sup>

Es gibt zwei Formen des ROR<sub>γ</sub> Rezeptors, ROR<sub>γ</sub> (ROR<sub>γ1</sub>) und ROR<sub>γt</sub> (ROR<sub>γ2</sub>); letztere ist eine Thymus-spezifische Isoform, die sich nur in ihrer N-terminalen Sequenz unterscheidet. Die Strukturen der ROR-Unterfamilie enthalten vier verschiedene Domänen, einschließlich einer variablen N-terminalen Aktivierungsfunktionshelix 1 -Domäne, einer hoch konservierten DNA-Bindungsdomäne, einer flexiblen Scharnierregion und einer C-terminalen Ligandenbindungsdomäne.<sup>15</sup>

ROR<sub>γ</sub> und insbesondere seine Isoform ROR<sub>γt</sub> werden intensiv beforscht, da sie mit verschiedenen Entzündungs- und Autoimmunkrankheiten in Verbindung stehen. Zu diesen Krankheiten gehört zum Beispiel Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Asthma und Krebs. Diese Wirkung ist auf die Rolle von ROR<sub>γt</sub> als kritischer Regulator der Th17-Zelldifferenzierung zurückzuführen.<sup>15</sup>

Die Agonisten ROR<sub>γt</sub> sind potenzielle Wirkstoffe für die Tumormimmuntherapie, Inhibitoren für Autoimmunkrankheiten. Der Grund dafür ist, dass ROR<sub>γt</sub> für die Differenzierung von Th17 Zellen und für die Produktion von IL-17 zuständig ist. Einerseits vermittelt das von den Th17-Zellen produzierte IL-17 die Mobilisierung von Neutrophilen und induziert somit Entzündungsreaktionen von Geweben. Andererseits bewirkt die Th17-Zelldifferenzierung und IL-17 durch die Aktivierung von CD8+ T-Zellen eine Antitumorwirkung. ROR<sub>γt</sub> reguliert IL-17-Faktoren durch verschiedene regulatorische Faktoren, einschließlich Co-Aktivatoren (NCoA-1, oder SRC-1) und Co-Repressoren (NCoR, oder SMRT22). Agonisten von ROR<sub>γt</sub> helfen bei der

Rekrutierung des Co-Aktivators SRC-1, während die Inhibitoren die Bindung von SRC-1 blockieren. Daher ist ROR<sub>γt</sub> sowohl an Entzündungen als auch an Krebs beteiligt. Agonisten von ROR<sub>γt</sub> welche die Th17-Zelldifferenzierung fördern sind also potenzielle Wirkstoffe für die Tumorummuntherapie, während Inhibitoren für die Behandlung von Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden könnten. Ein natürlicher endogener Inhibitor von ROR<sub>γt</sub> ist 7-Ketocholesterol, ein endogener Agonist wäre zum Beispiel 25-Hydroxycholesterol.<sup>16</sup>

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Ermittlung des optimalen Extraktionsmittels für Triterpene

Zur Identifizierung eines geeigneten Extraktionsmittels für Triterpene wurde die Droge mit vier verschiedenen organischen Lösungsmitteln extrahiert. Es wurde ein kleines Aliquot von 500 mg getrockneten und grob gemahlenen Sklerotien mit Ethanol (EtOH) (E1) Dichlormethan (DCM) (E2), Aceton (E3) und Hexan (E4) extrahiert. Die größte Ausbeute an Extrakt wurde mit EtOH erzielt (Tabelle 2). Zur Entfernung der Pigmente wurde mit den Extrakten E1, E2 und E3 eine Festphasenextraktion (SPE) mit Polyamid Gel (CC-6) durchgeführt. Da sich diese Arbeit auf die Extrahierung und Isolierung von Triterpenen fokussierte, war die SPE notwendig, um die störenden Pigmente aus dem Extrakt zu entfernen. Für E4 war das nicht nötig, da er farblos war. Für ihn wurde auch die höchste relative Konzentration an Triterpenen erzielt jedoch auch die geringste Gesamtausbeute (0,12%). Aceton war am geeignetsten als Extraktionsmittel mit einer höheren Ausbeute (0,5% nach SPE) als Hexan und einer nur leicht geringeren relativen Konzentration an Triterpenen (Tabelle 2, Abbildung 3 & Anhang A1). Mit EtOH wurde mit 1,1% die größte Ausbeute erzielt. Jedoch waren in diesem Extrakt auch die meisten Pigmente (0,3%) und die niedrigste Konzentration an Triterpenen (Abbildung 3 & Anhang A1).

Die erzielten Extraktionsausbeuten waren im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte. So wurde eine Extraktionsausbeute von 0,43% der Trockenmasse mit EtOH erzielt.<sup>6</sup> Mit der Folch Methode konnten sogar 1,21% Extraktionsausbeute erzielt werden, jedoch wurden die Pigmente bei diesem Verfahren nicht entfernt.<sup>4</sup> Für CO<sub>2</sub> Extraktion wurden in der Literatur Extrakt Ausbeuten von 0,06% bis 0,14% beschrieben.<sup>4</sup>

*Tabelle 2 Ausbeute der verschiedenen im Vorversuch hergestellten Extrakte in mg und Extrakt Ausbeute (% des Ausgangsmaterials)*

| Name des Extraktes | Extraktionsmittel | Ausbeute (mg) | Ausbeute nach SPE (mg) | Ausbeute (%) | Ausbeute nach SPE (%) |
|--------------------|-------------------|---------------|------------------------|--------------|-----------------------|
| E1                 | EtOH              | 5,46          | 4,11                   | 1,09         | 0,82                  |
| E2                 | DCM               | 1,68          | 1,53                   | 0,34         | 0,30                  |
| E3                 | Aceton            | 3,06          | 2,51                   | 0,61         | 0,50                  |
| E4                 | Hexan             | 0,62          | -                      | 0,12         | -                     |

Die im Vorversuch hergestellten Extrakte wurden mit der superkritischen Hochleistungschromatographie (SFC) getrennt und mithilfe eines gekoppelten

Photodiodenzeilen Detektors (PDA) und einem ELSD analysiert. Ziel der Analyse war es das geeignete Extraktionsmittel für die Isolierung der Triterpene zu finden.

Als Referenzen wurden Triterpen Isolate einer vorangehenden Masterarbeit<sup>12</sup> verwendet. Diese wurden auf 0,5 mg/ml verdünnt. Bei den Reinsubstanzen handelte es sich um Inonotsutriol A (**5**), Trametanolsäure (**4**) und Inotodiol (**3**). Mit Rt 5,74 war Inotodiol die Hauptsubstanz in allen hergestellten Extrakten. Außerdem war in jeder Probe Trametanolsäure (**4**) mit Rt 6,24, enthalten, in E4 jedoch in geringerer Konzentration. Inonotsutriole (**5,6**) waren ebenfalls in allen Extrakten enthalten. Der Gehalt der Inonotsutriole (Rt von 6,97), am höchsten in E4, dann in Ep3, Ep2 und am geringsten in Ep1. (Abbildung 3). Ep1 - Ep3 beschreiben hierbei E1 - E3 nach der SPE mit Polyamid.

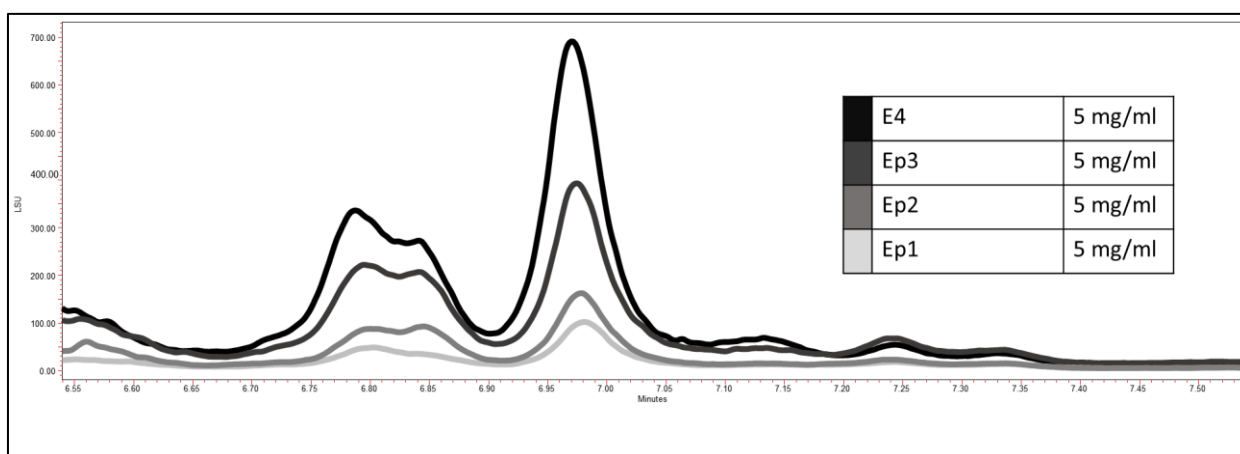


Abbildung 3 UPC<sup>2</sup> Analyse der gewonnenen Extrakte, Chromatogramme von den SPE Extrakten Ep1-Ep3 und E4, (ELSD-Detektion, Waters UPC<sup>2</sup>, Torus 1-AA-Säule, 40°C, Co-Lösungsmittel B = Methanol, 1,2 ml Fluss und einem Gradienten beginnend mit 0% B nichtlinear bis 50% bei Minute 12 (Tabelle 10)

## 5.2 Extraktion im großen Maßstab

Die Extraktion im großen Maßstab erfolgte wie oben bereits beschrieben, mit Aceton. 3439,0 g Material wurden vermahlen (Porengröße 0,75 mm) und anschließend mazeriert. Es waren insgesamt 3 Durchläufe notwendig, um das Material erschöpfend zu extrahieren. (Tabelle 3). Die relative Gesamtausbeute war mit 1,01% höher als die Ausbeute der Extraktion in kleinem Maßstab die bei 0,61% lag. Grund hierfür wird die wiederholte Extraktion desselben Materials sein. So war die Ausbeute des Extraktes im großen Maßstab nach der ersten Mazeration bei 0,56%– also ähnlich den im Vorverlauf ermittelten Wert. Zusätzlich war der Mahlgrad mit 0,75 mm niedrig gewählt, die zu extrahierende Oberfläche des Materials wurde somit vergrößert.

Der Extrakt hatte eine gelblich-orange Farbe und beinhaltete viele Schwebstoffe. Um diese zu entfernen waren mehrmalige Filtrationsschritte notwendig, um den klargelben Extrakt zu erhalten (Abbildung 4B). Abgedampft hatte der Extrakt eine braune Farbe und eine körnige Struktur mit leicht klebriger Konsistenz. Der resultierende Extrakt hat die Bezeichnung IO\_LS und wurde mit der UPC<sup>2</sup> analysiert.

Tabelle 3 Ausbeuten einzelner Durchläufe und Gesamtausbeute des Extraktes im großen Maßstab

|                     | Ausbeute in g | Ausbeute in % |
|---------------------|---------------|---------------|
| <b>1. Durchlauf</b> | 19,37         | 0,56          |
| <b>2. Durchlauf</b> | 9,44          | 0,27          |
| <b>3. Durchlauf</b> | 6,12          | 0,18          |
| <b>Insgesamt</b>    | 34,93         | 1,01          |

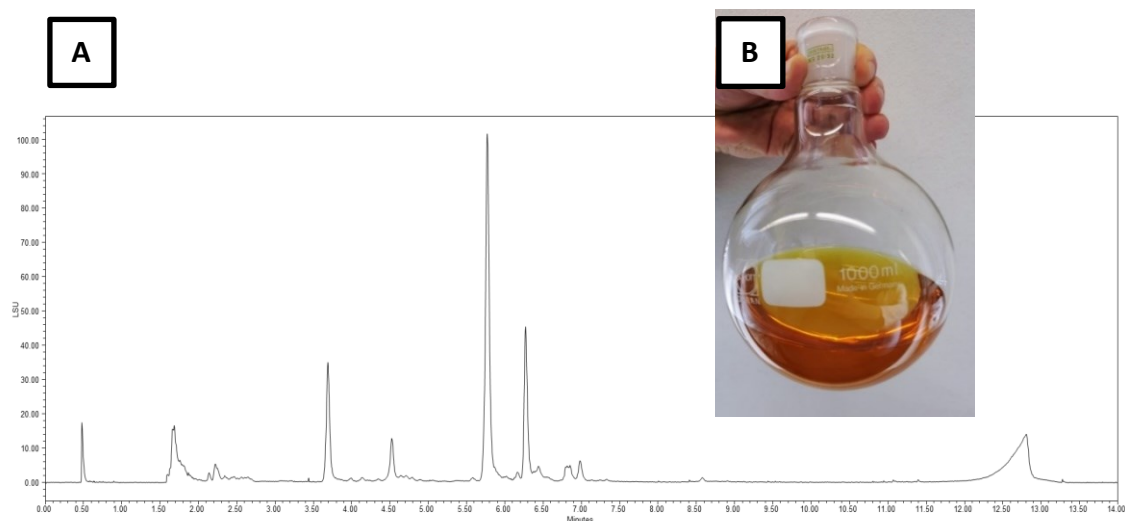


Abbildung 4. **A** UPC<sup>2</sup>-Analyse des Extraktes im großen Maßstab (ELSD-Detektion, Waters UPC<sub>2</sub>, Torus 1-AA-Säule, 40°C, Co-Lösungsmittel B = Methanol, 1,2 ml Fluss mit einem Gradienten beginnend mit 0% B nichtlinear bis 50% bei Minute 12, 0,5 Minuten Spülen und 1,5 Minuten reequilibrieren (Tabelle 10)). **B** Geloester Rohextrakt LS\_UP nach dem Filtrieren.

Auf dem mittels SFC erstellten Chromatogramm von IO\_LS (Abbildung 4) ist bei einer Retentionszeit von 12.5 min ein breiter, unsymmetrischer Peak erkennbar. Dieser lässt auf hydrophile Substanzen schließen, die sich nur sehr schlecht mit sehr hohen % an Modifier von der Säule eluieren ließen. Die recht dunkle Farbe des trockenen Extraktes und die schlechte Löslichkeit sprechen für kondensierte Polyphenole oder Melanine.<sup>17</sup> Andere phenolische Verbindungen wurden bereits in den Sklerotien von Chaga gefunden, darunter neben den bereits erwähnten Polyphenolen, Flavonoide und Phenolcarbonsäuren zB. wurde von Byung Soon Hwang und MitarbeiterInnen<sup>18</sup> unter anderem Syringasäure (**10**) und Protocatechusäure isoliert.<sup>16</sup> Auch das Triterpen Trametanolsäure (**4**) hat sich in diesem Projekt als störend erwiesen, da es in hoher Konzentration im Extrakt vorkommt und ähnliche Eigenschaften wie die zu isolierenden Triterpene hatte. Aufgrund dessen wurde entschieden, den Rohextrakt mittels Flüssig- Flüssig Verteilung zwischen einer wässrigen Natronlauge und einer organischen Phase (DCM) zu trennen.

### 5.3 Flüssig- Flüssig Extraktion

Um die Reinstoffe zu erhalten und diese von störenden Pigmenten, Phenolen aber auch **4** zu befreien war der erste Schritt nach der Extraktion die Abtrennung dieser sauren Inhaltsstoffen mittels Flüssig-Flüssig Extraktion im Scheidetrichter. Eine Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte der Extraktion und der Flüssig-Flüssig Extraktion wird auf Abbildung 5 dargestellt.

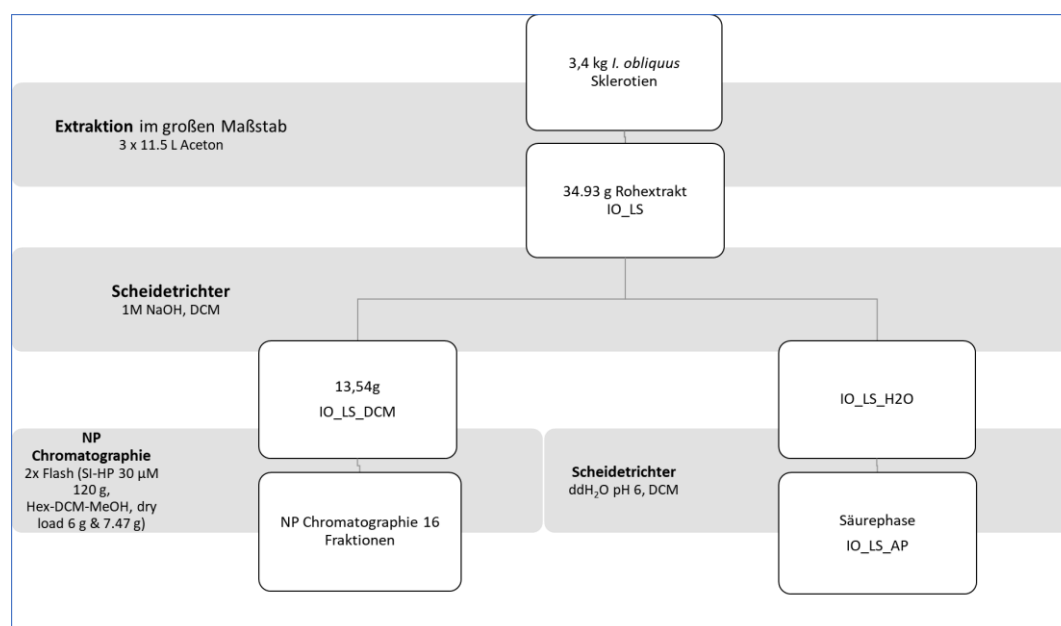


Abbildung 5 Extraktions- und Fraktionierungs-Schema des Chaga Rohextraktes IO\_LS

Für die Flüssig-Flüssig Extraktion wurde der Rohextrakt in DCM gelöst. Die Flüssig-Flüssig Extraktion erfolgte mit 1 M NaOH da sich hiermit die störende Trametanolsäure (**4**) und die Pigmente abtrennen ließen. Die Flüssig-Flüssig Verteilung zwischen 1 M NaHCO<sub>3</sub> und DCM hatte im Vorversuch nur die Pigmente abgetrennt, jedoch nicht **4**.

Die NaOH-Phase wurde gesammelt und nach der Neutralisation mit konzentrierter Salzsäure (pH 6-7) mit DCM ausgeschüttelt. Hierbei konnte man anhand der dunkelbraunen Farbe der NaOH-Phase erkennen, dass sich die Pigmente gut trennten (Abbildung 6). Auch die Trennung der Trametanolsäure (**4**) ist auf den UPC<sup>2</sup> Chromatogrammen der Säurephase gut erkennbar. (Tabelle 4) In der vorangegangenen Arbeit<sup>12</sup> wurde zusätzlich **10** beschrieben. Diese Substanz hatte eine Rt von 5,47. Im SFC-Chromatogramm von IO\_LS und der Säurephase (Tabelle 4) findet sich ein Peak bei Rt 5,57. Es kann also vermutet werden, dass es sich bei diesem Peak um **10** handelt. Diese wurde nach der Flüssig-Flüssig Extraktion in die NaOH-Phase überführt und somit aus der DCM-Phase entfernt.

Weiters bestand die Gefahr, dass das Ausschütteln mit 1 M NaOH-Phase, zur Verseifung der Acetyloxy Gruppen der zu isolierenden Substanzen **1** und **2**. Jedoch wurde keine Änderung der Peaks im Bereich zwischen Rt 6,7 und 7,2, in dem wir die (acetylierten) Inonotsutriole erwartet hatten festgestellt. Wir schlussfolgerten daher, dass die Acetyloxy Gruppen von **1** und **2** ausreichend stabil sind.

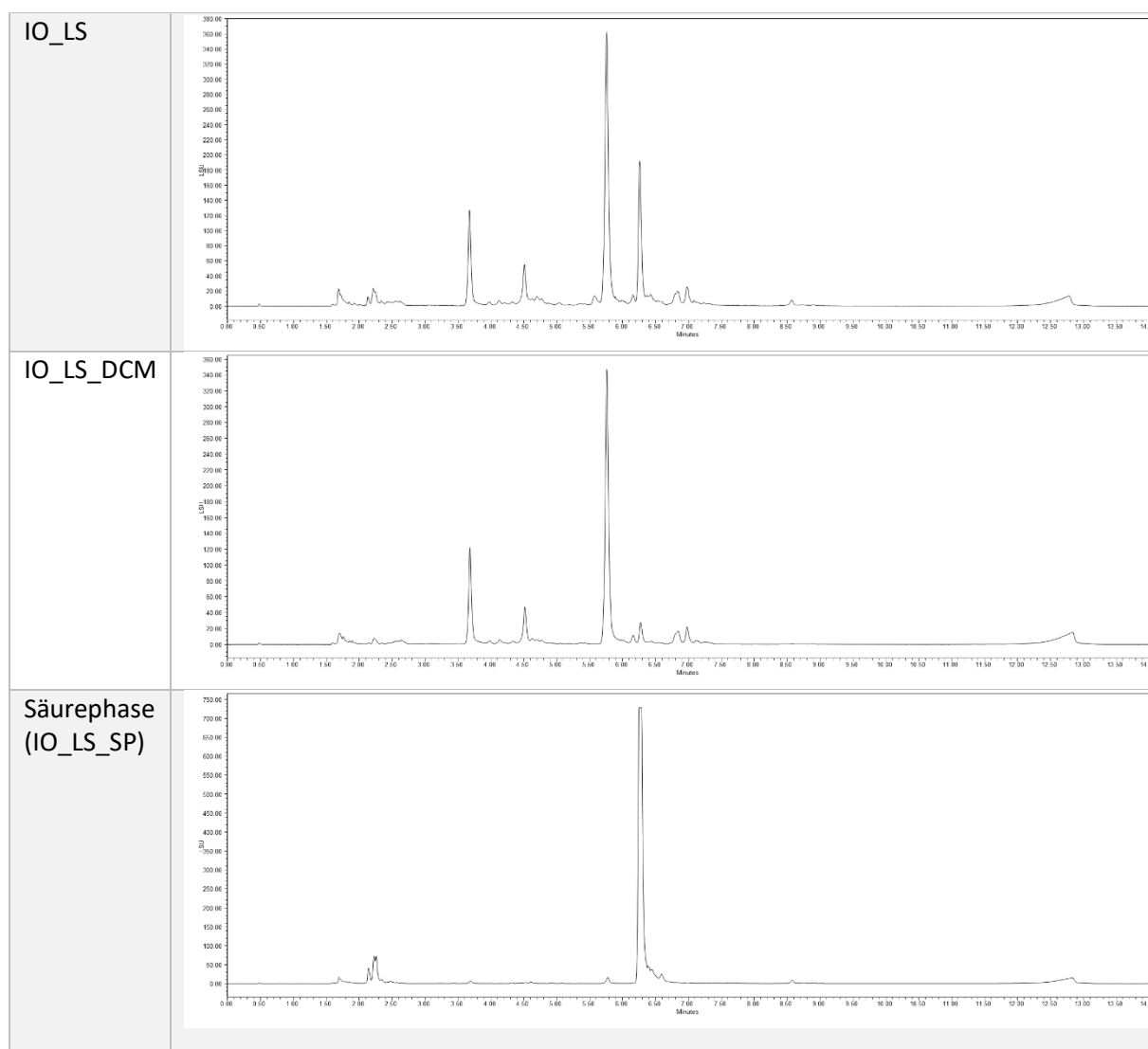


Abbildung 6 Abbildung eines Scheidetrichters nach der Flüssig- Flüssig Extraktion. Zu sehen ist die obere, NaOH-Phase mit beinhalteten Pigmenten und Phenolen und die untere, von Pigmenten und Trametanolsäure befreite DCM-Phase (IO\_LS\_DCM)

Insgesamt wurden für die Flüssig-Flüssig Extraktion 22,68 g Extrakt verwendet, nach diesem Schritt blieben 13,47 g des gereinigten Extraktes IO\_LS\_DCM zur weiteren Fraktionierung übrig.

Als Inhaltstoffe von *I. obliquus* wurden auch andere Triterpensäuren beschrieben, unter anderem die Betulinsäure (7). Diese war jedoch in diesem Extrakt nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden, da sie auf durchgeführten DCs nicht nachweisbar war (Anhang A2). Die möglichen Gründe für das Fehlen dieser Substanz sind vielfältig. Eine Erklärung könnte das Fehlen von Bestandteilen der Birke im Extraktionsmaterial sein. Ein anderer möglicher Grund wären unterschiedliche Chemotypen von *I. obliquus* oder unterschiedliche klimatischen Bedingungen.<sup>9</sup>

Tabelle 4 UPC<sup>2</sup> Analyse der aus der Flüssig Flüssigextraktion gewonnenen Fraktionen. Chromatogramme von IO\_LS, IO\_LS\_DCM, Säurephase (ELSD-Detektion, Waters UPC<sup>2</sup>, Torus 1-AA-Säule, 40°C, Co-Lösungsmittel B = Methanol, 1.2 ml Fluss mit einem Gradienten beginnend mit 0% B nichtlinear bis 50% bei Minute 12, 0,5 Minuten Spülen und 1,5 Minuten reequilibrieren (Tabelle 10)



T. Bäumer<sup>12</sup> hatte bereits einige Substanze aus *Chaga* isoliert und charakterisiert. Anhand der Zuordnung der Retentionszeiten der bereits isolierten Referenzsubstanzen<sup>12</sup> mit SFC-Chromatogrammen dieser Arbeit, konnte man folgende Substanzen in IO\_LS\_DCM nachweisen: Inotodiol (**3**) als Haupts substanz bei Rt 5.5, Inonotustriol A bei Rt 7.0 (**5**), die vermeintlichen Triterpene **1** und **2** bei Rt 6.8. Ebenfalls war bei Rt=6.8 ein kleiner Peak der Trametanolsäure (**4**), welche nicht vollständig abgetrennt wurde, erkennbar. Weitere Triterpene die hier zugeordnet werden können sind, **9** bei einer Rt von 3,8 und 4,3- $\beta$ -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al bei Rt 4,5. In der vorangegangenen Arbeit<sup>12</sup> wurde zusätzlich **10** beschrieben, diese Substanz hatte eine Rt von 5,47. im SFC-Chromatogramm von IO\_LS und der Säurephase IO\_LS\_SP (Tabelle 4) findet sich ein Peak bei Rt 5,57. Es kann also vermutet werden, dass es sich bei diesem Peak um **10** handelt. Diese wurde nach der Flüssig-Flüssig Extraktion in die NaOH-Phase überführt und somit vollständig aus IO\_LS\_DCM entfernt.

## 5.4 Fraktionierung der DCM- Fraktion und Isolierung der Inhaltsstoffe

### 5.4.1 Fraktionierung mittels Flash- Chromatographie (FC)

Um eine weitere Auftrennung zu ermöglichen, erfolgte die Fraktionierung mittels FC. Nach einigen Vorversuchen mit 50-70 mg Dry-Load Probe und verschiedenen Gradienten (Anhang, A3) wurde ein Gradient bestehend aus Hexane-DCM-MeOH gewählt. Danach wurden zwei Läufe mit 6 g und 7,47 g Dry Load Probe und optimierten Gradienten durchgeführt (Anhang A4 und A5). Insgesamt wurden dafür 13,47 g aufgetrennt. 57% des Ausgangsmaterials konnten nach diesem Fraktionierungsschritt wiedergewonnen werden, 43% konnten nicht regeneriert werden. Im Laufe der FC wurden 241 (Dry Load Probe 6 g) bzw. 235 (Dry Load Probe 7,47 g) Epröuvetten mit jeweils 2 ml gesammelt und mittels DC analysiert. Anhand der DC wurden die Epröuvetten in insgesamt 16 Unterfraktionen vereint (IO\_LS\_DCM\_1 – IO\_LS\_DCM\_16). Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der Fingerprint mithilfe einer DC kontrolliert. Die durchgeführte DC und die resultierenden Ausbeuten sind in Abbildung 7 dargestellt. Zusätzlich wurden alle Fraktionen mit Ausnahme von IO\_LS\_DCM\_4 (unlöslich in Isopropanol-Hexan) mit UPC<sup>2</sup>-PDA-ELSD gemessen. Die ELSD-Spektren sind in Tabelle 5 dargestellt. Das genaue

Protokoll zur Vereinigung der gesammelten Flash-Eprouvetten in 16 Fraktionen inklusive der resultierenden Ausbeute werden im Anhang A6 dargestellt.

Die Hauptinhaltsstoffe **3**, 3 $\beta$ -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al und **9** wurden bereits in einer vorhergehenden Masterarbeit<sup>12</sup> isoliert. Die UPC<sup>2</sup> Chromatogramme (Tabelle 5) und der Vergleich der Retentionszeiten mit den vorhandenen Referenzen waren ausschlaggebend für die Entscheidung, welche Fraktionen für weitere Untersuchungen ausgewählt wurden.

Bei den Fraktionen IO\_LS\_DCM\_1 bis IO\_LS\_DCM\_5 handelt es sich um sehr apolare Fraktionen. Anhand der SFC-Chromatogramme dieser Fraktionen in Tabelle 5 kann man erkennen, dass es sich um eine sehr komplexe Zusammensetzung handelt. Die Fraktion IO\_LS\_DCM\_6 wurde anhand des Vergleichs der Retentionszeit im SFC-Chromatogramm mit der Referenzsubstanz<sup>12</sup> als semipurifizierte Substanz **9** (Reinheit 60-80%) identifiziert. Die Retentionszeit der Hauptsubstanz der Fraktion IO\_LS\_DCM\_7 entspricht der der Substanz 3 $\beta$ -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al. Im SFC-Chromatogramm der Fraktion IO\_LS\_DCM\_8 sind zwei Peaks zu sehen, wobei es sich bei der Substanz mit R<sub>t</sub> 5,7 höchstwahrscheinlich um Substanz **3** handelt. IO\_LS\_DCM\_9 wurde anhand von Vergleichen mit der Referenzsubstanz<sup>12</sup> als Substanz **3** mit einer Reinheit von >85% identifiziert. Die Fraktionen IO\_LS\_DCM\_10 und IO\_LS\_DCM\_11 sind Gemische mit Substanz **3** als Hauptsubstanz. Da die vermuteten Retentionszeiten der gesuchten Substanzen **1** und **2** in der Fraktion IO\_LS\_DCM\_12 vorhanden waren, wurde diese zu weiterer Aufreinigung auserwählt. In der Fraktion IO\_LS\_DCM\_13 war die Substanz **5** enthalten. Fraktion IO\_LS\_DCM\_14 beinhaltete Reste der Substanz **4**. Fraktion 13 und 14 wurden ebenfalls zur weiteren Aufarbeitung ausgewählt. Bei den Fraktionen IO\_LS\_DCM\_15 und IO\_LS\_DCM\_16 handelte es sich um komplexe Mischungen polarer Inhaltsstoffe. Diese Fraktionen zeigten auf der DC keinerlei violette Färbung mehr. Aufgrund dessen ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um Phenole oder andere polare Substanzen handelt, die mit dem verwendeten Vanillin-Schwefelsäure Reagenz nicht gut zu visualisieren waren. Da der Fokus dieser Masterarbeit bei dem Auffinden und Isolieren von Triterpenen lag und es sich bei Fraktion 15 und 16 um eine hochkomplexe nicht terpenoide Substanzmischung handelt, wurden diese Fraktionen nicht weiter aufgearbeitet.

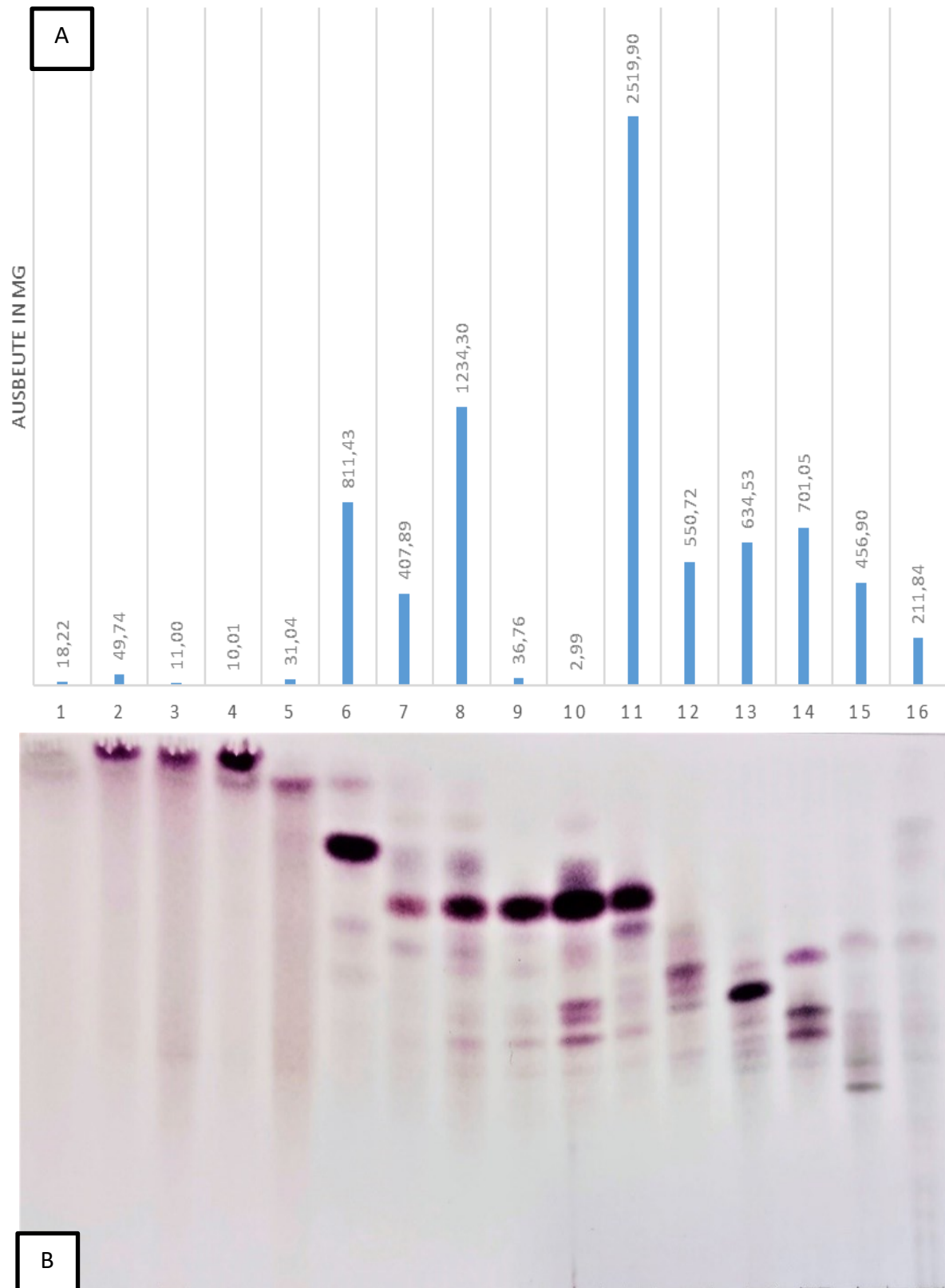
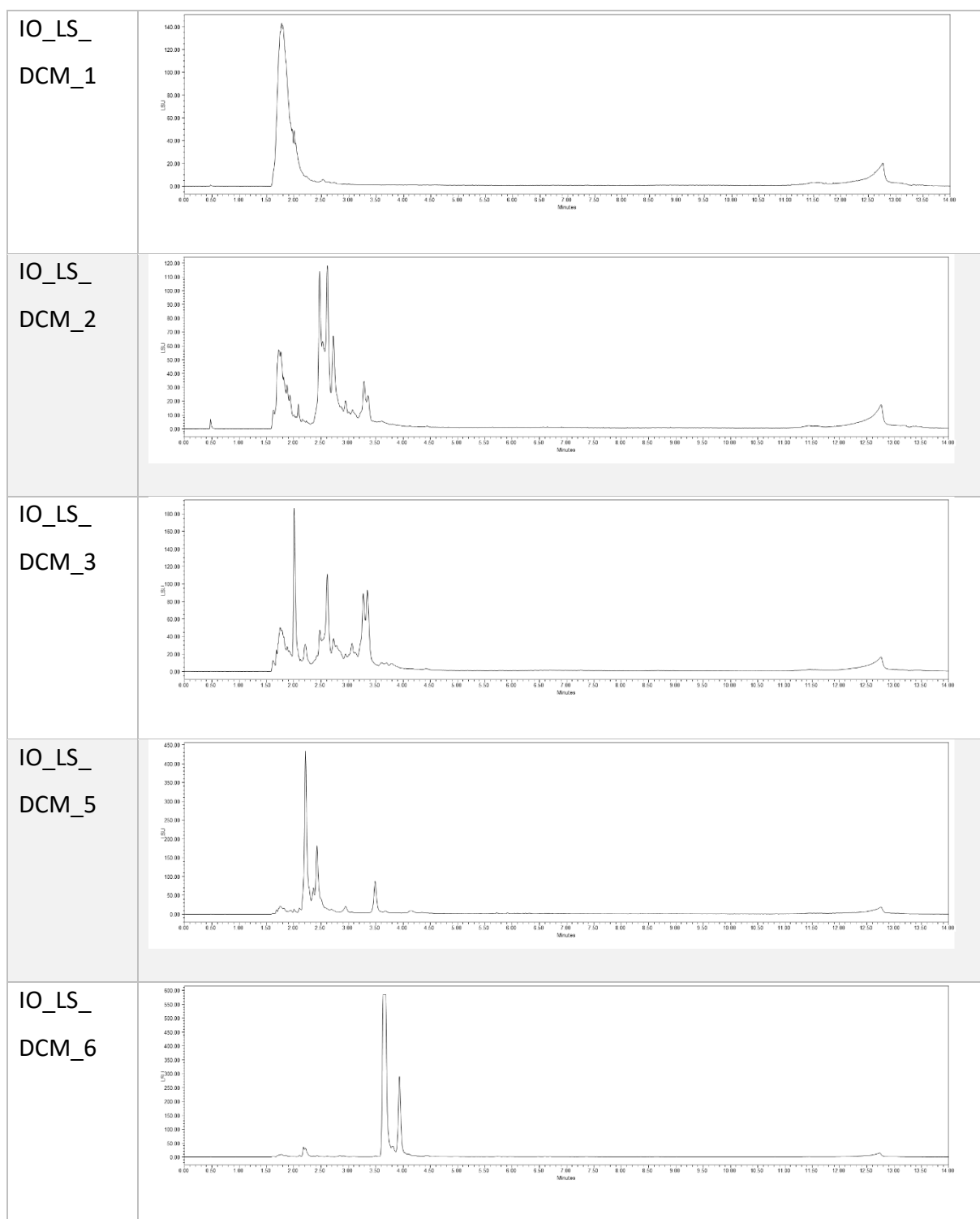
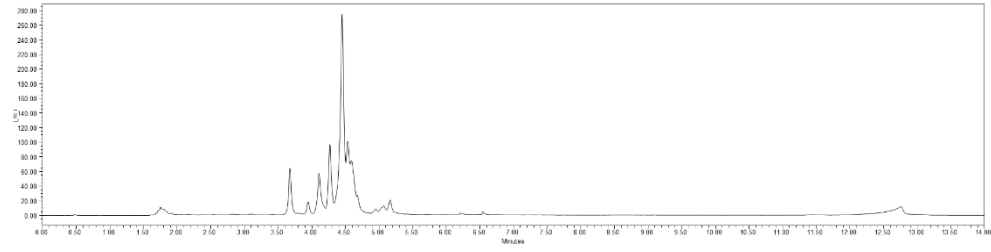
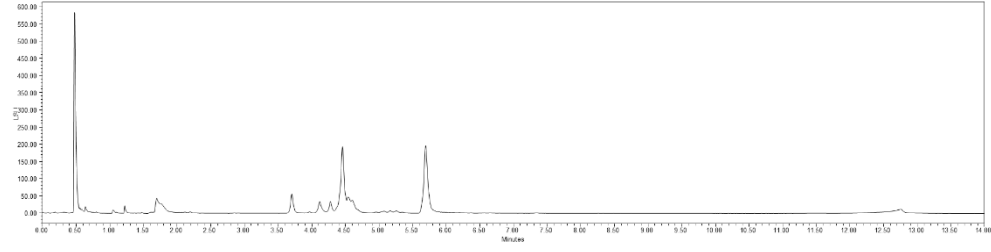
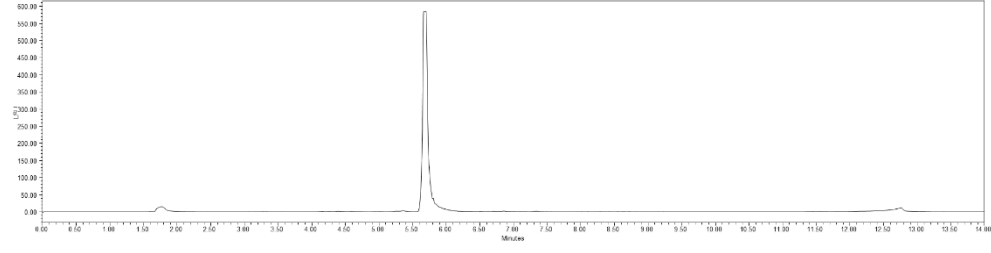
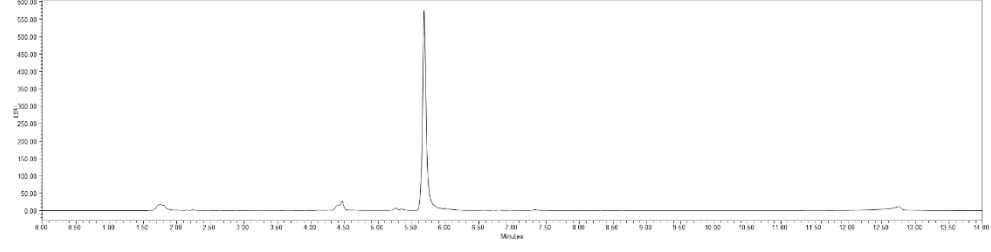
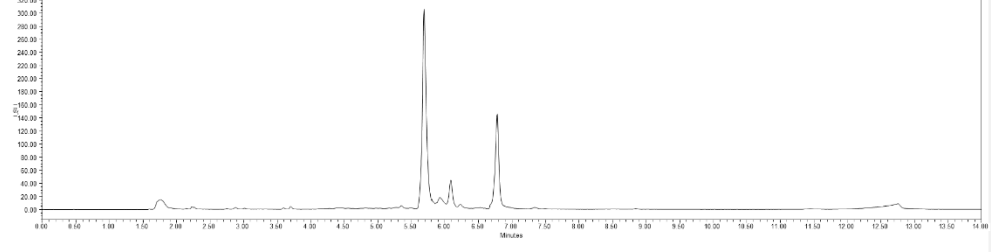
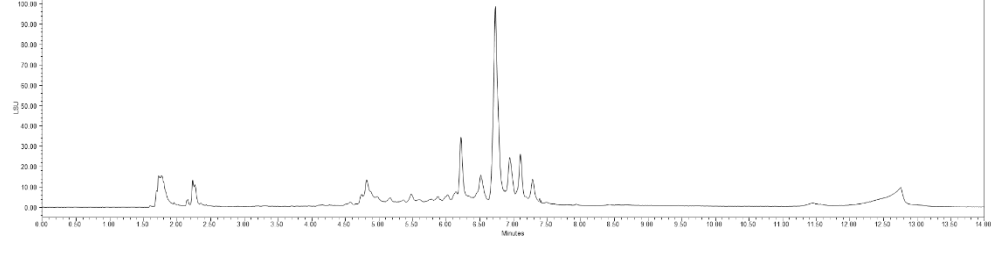
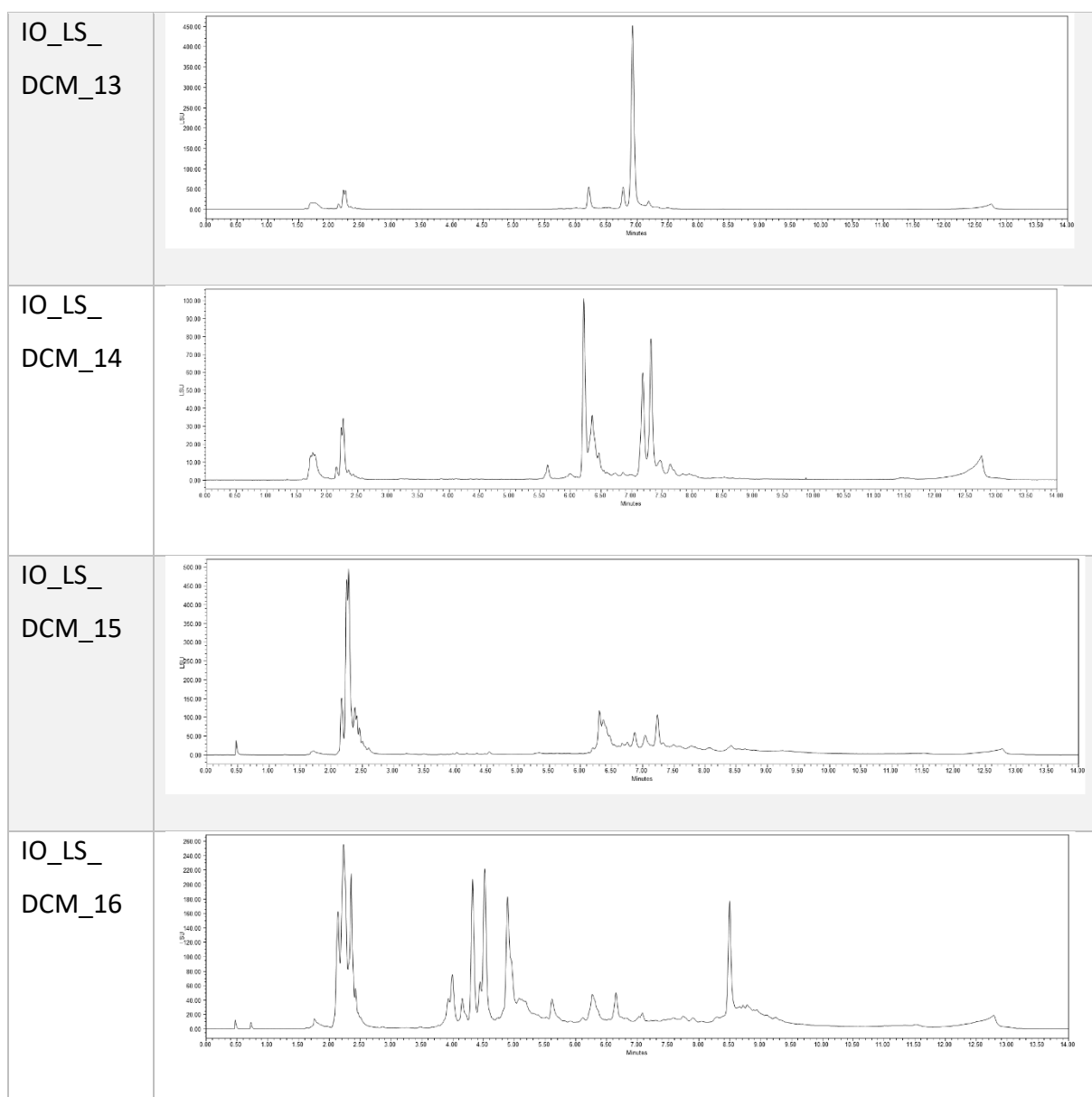


Abbildung 7. **A** Ausbeute der Fraktionen IO\_LS\_DCM\_1 (1) bis IO\_LS\_DCM\_16 (16), **B** DC der Fraktionen IO\_LS\_DCM\_1 (1) bis IO\_LS\_DCM\_16 (16). Laufmittel (DCM: MeOH: H<sub>2</sub>O; 9: 1: 0,1) Merck Kieselgel 60 F254, Detektion VIS nach Besprühen mit Vanillin (1% in MeOH) / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5% in MeOH)

Tabelle 5 UPC<sup>2</sup> Analyse von IO\_LS\_DCM\_1 bis IO\_LS\_DCM\_16 (ELSD-Detektion, Waters UPC<sup>2</sup>, Torus 1-AA-Säule, 40°C, Co-Lösungsmittel B = Methanol, 1,2 ml Fluss mit einem Gradienten beginnend mit 0% B nichtlinear bis 50% bei Minute 12, 0,5 Minuten spülen und 1,5 Minuten reequilibrieren (Tabelle 10)



|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IO_LS_<br>DCM_7  |  <p>Chromatogram for IO_LS_DCM_7. The x-axis represents time in minutes from 0.00 to 14.00. The y-axis represents intensity from 0.00 to 280.00. A major peak is observed at approximately 4.5 minutes, reaching an intensity of about 260.00. There are several smaller peaks between 3.5 and 5.5 minutes.</p>                                               |
| IO_LS_<br>DCM_8  |  <p>Chromatogram for IO_LS_DCM_8. The x-axis represents time in minutes from 0.00 to 14.00. The y-axis represents intensity from 0.00 to 600.00. A very large, sharp peak is observed at approximately 0.5 minutes, reaching an intensity of about 580.00. A smaller peak is visible at approximately 5.5 minutes, reaching an intensity of about 200.00.</p> |
| IO_LS_<br>DCM_9  |  <p>Chromatogram for IO_LS_DCM_9. The x-axis represents time in minutes from 0.00 to 14.00. The y-axis represents intensity from 0.00 to 600.00. A single, sharp, major peak is observed at approximately 5.5 minutes, reaching an intensity of about 580.00.</p>                                                                                            |
| IO_LS_<br>DCM_10 |  <p>Chromatogram for IO_LS_DCM_10. The x-axis represents time in minutes from 0.00 to 14.00. The y-axis represents intensity from 0.00 to 600.00. A single, sharp, major peak is observed at approximately 5.5 minutes, reaching an intensity of about 580.00.</p>                                                                                          |
| IO_LS_<br>DCM_11 |  <p>Chromatogram for IO_LS_DCM_11. The x-axis represents time in minutes from 0.00 to 14.00. The y-axis represents intensity from 0.00 to 300.00. Two major peaks are observed: one at approximately 5.5 minutes (intensity ~280.00) and another at approximately 6.5 minutes (intensity ~150.00).</p>                                                      |
| IO_LS_<br>DCM_12 |  <p>Chromatogram for IO_LS_DCM_12. The x-axis represents time in minutes from 0.00 to 14.00. The y-axis represents intensity from 0.00 to 100.00. A major peak is observed at approximately 6.5 minutes, reaching an intensity of about 90.00. There are several smaller peaks between 1.5 and 7.5 minutes.</p>                                             |



#### 5.4.2 Präparative SFC der Fraktion IO\_LS\_DCM\_12

Das SFC-Chromatogramm der Fraktion IO\_LS\_DCM\_12 in der Tabelle 5 zeigt 6 Peaks zwischen  $R_t$  6 und  $R_t$  7,5, ein Bereich in der die Substanzen **1** und **2** vermutet werden. Die DC-Fingerprints von IO\_LS\_DCM\_12 zeigen mindestens 4 violette Banden. (Abbildung 7). Da primär die Isolierung dieser Substanzen das Ziel war, wurde die Fraktion IO\_LS\_DCM\_12 zur weiteren Aufreinigung gewählt.

Um die Substanzen **1** und **2** aber auch andere mögliche Reinstoffe zu isolieren wurde nach einer geeigneten Methode gesucht. Da die Peaks auf dem SFC-Chromatogramm bereits einzeln zu sehen waren, wurde entschieden, die Aufreinigung mittels Prep-SFC15 durchzuführen. Für die Entwicklung einer geeigneten Methode für die Trennung der einzelnen

Peaks wurden Screenings der verfügbaren Säulen für die Prep-SFC15 an der analytischen UPC<sup>2</sup> durchgeführt.

Insgesamt wurden 4 Säulen getestet, die hierbei angewandten Methoden sind in Tabelle 11 ersichtlich. Die resultierenden Chromatogramme sind im Anhang beigefügt (Anhang A7). MeOH, EtOH und Isopropanol wurden als mobile Phase B getestet. Ein Gradient von 15% auf 25% Modifier über 20 Minuten wurde durchgeführt. Die Torus 1-AA Säule stellte sich schließlich als die Säule mit der besten Trennleistung heraus. Der beste Modifier war EtOH:MeOH, 1:1. Der Gradient wurde daraufhin noch einmal zuerst auf der UPC<sup>2</sup> und dann auf der präparativen Säule der SFC15 optimiert. Der beste Gradient war 16% auf 20% Modifier (EtOH:MeOH, 1:1) über 8 Minuten (Tabelle 12). Nach der Optimierung wurde IO\_LS\_DCM\_12 mit der Prep-SFC15 und mithilfe des Fraktionensammlers in 6 Fraktionen (Abbildung 8) getrennt, wobei Fraktion 6 nur die Waschfraktion darstellte. Es wurden insgesamt 164 Läufe mit jeweils 100 µl Injektionsvolumen einer gesättigten Lösung von 3,5 mg/ml durchgeführt. Die Ausbeuten und DC-Fingerprints werden in Abbildung 9 dargestellt. Alle Fraktionen wurden mit UPC<sup>2</sup>-PDA-ELSD analysiert. Diese Chromatogramme sind in Tabelle 6 abgebildet. Ein exemplarisches Chromatogramm der Prep-SFC15 Fraktionierung inklusive der gesammelten Fraktionen ist auf Abbildung 10 zu sehen.

Die Chromatogramme der Fraktionen wurden mit Isolaten der Substanzen **1** und **2** verglichen (Tabelle 7).<sup>12</sup> Von diesen wurde Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_3, mit einer Ausbeute von 15,50 mg und IO\_LS\_DCM\_12\_4 mit einer Ausbeute von 5,07 mg, aufgrund einer Übereinstimmung der Retentionszeiten ausgewählt. Beide Substanzen erschienen auf dem UPC<sup>2</sup> ELSD-Chromatogramm als vermeintlich reine Substanzen (Tabelle 5). Die DC-Analyse zeigte jedoch bei IO\_LS\_DCM\_12\_3 eine zusätzliche Bande unter der Hauptsubstanz (blassviolett) und bei IO\_LS\_DCM\_12\_4 zeigten sich zwei zusätzliche Bande über und eine sehr helle Bande unter der Hauptsubstanz der Fraktion (Abbildung 9)

Zur weiteren Aufreinigung wurde eine semi-präparative UHPLC durchgeführt (Abbildung 10, Abbildung 11). Die verwendete Methode zur Trennung der Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_3 und IO\_LS\_DCM\_12\_4 mit UHPLC ist in Tabelle 12 dargestellt. Die resultierenden reinen Verbindungen wurden als IO\_LS\_DCM\_12\_3\_3 und IO\_LS\_DCM\_12\_4\_3 bezeichnet.

Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_3\_3 und IO\_LS\_DCM\_12\_4\_4 wurden zur weiteren Analyse mit der MS und NMR vermessen. Die Fraktion IO\_LS\_12\_4\_3 wurde mithilfe von NMR und MS als

Substanz **5** identifiziert. Die Fraktion IO\_LS\_12\_3\_3 war zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Die NMR-Spektren sind im Anhang A8 und A9 zu finden. Ein guter Ausgangspunkt für weitere Schritte wäre die vollständige Aufklärung der Struktur von Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_3\_3 sowie weitere Trennung und Isolierung der Fraktionen IO\_LS\_DCM\_12.

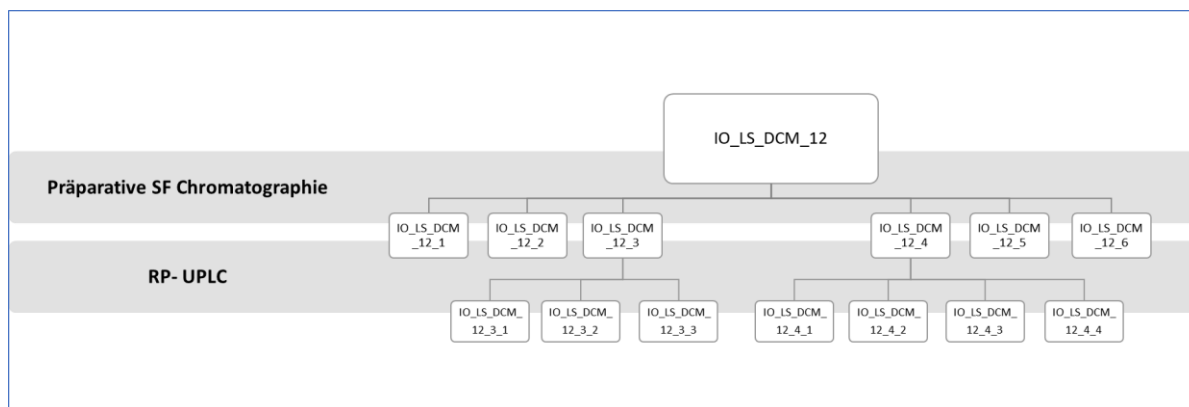


Abbildung 8 Schritte der Fraktionierung von IO\_LS\_DCM\_12

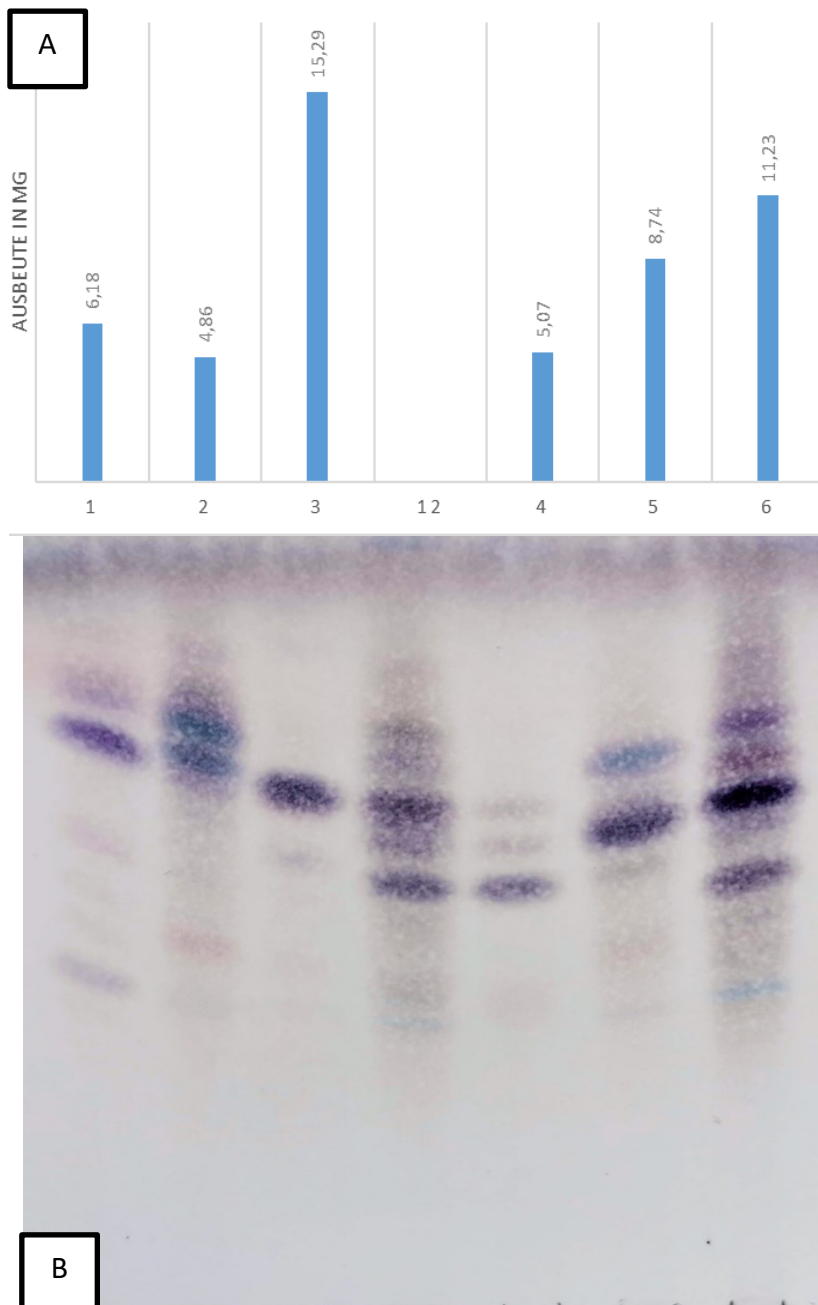


Abbildung 9. **A** Ausbeuten der Fraktionen IO\_LS\_DCM\_12\_1 (1) bis IO\_LS\_12\_6 (6), **B** DC der Fraktionen IO\_LS\_DCM\_12\_1 (1) bis IO\_LS\_12\_6 (6) und von Fraktion IO\_LS\_DCM\_12 (12). Laufmittel (DCM: MeOH: H<sub>2</sub>O; 9: 1: 0,1) Merck Kieselgel 60 F254, Detektion VIS nach Besprühen mit Vanillin (1% in MeOH) / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5% in MeOH)

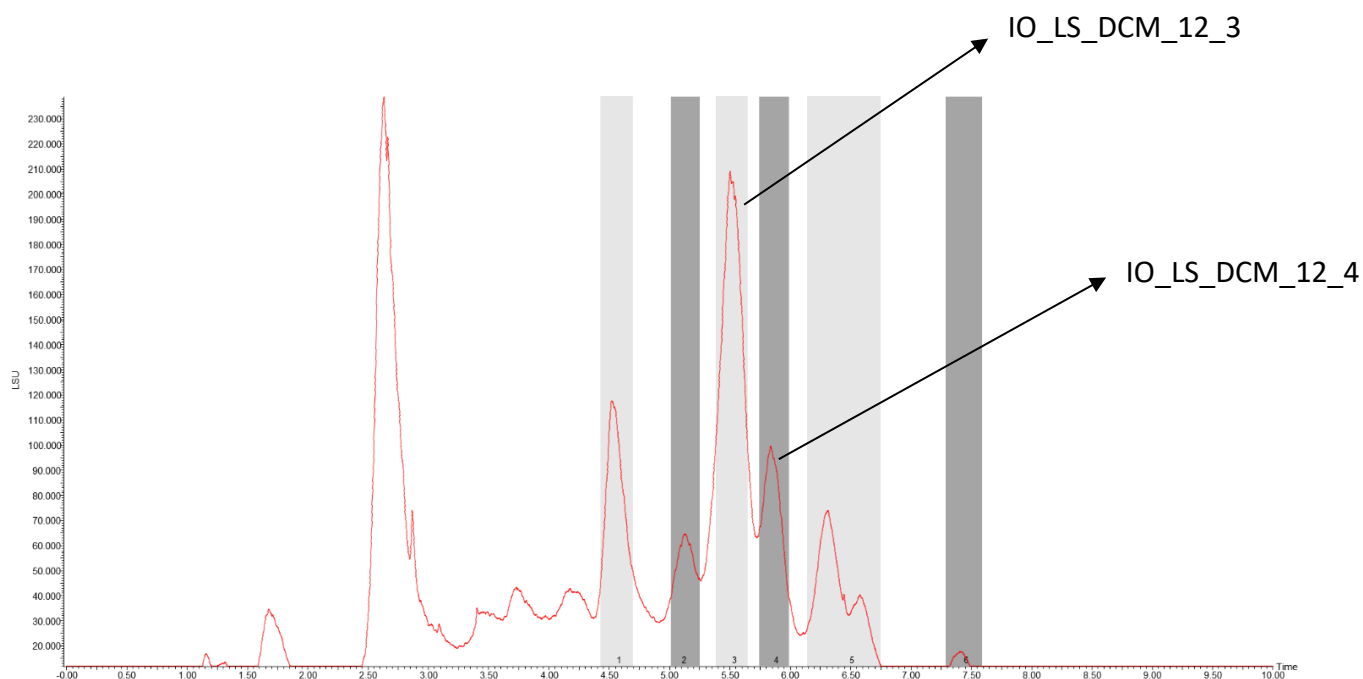
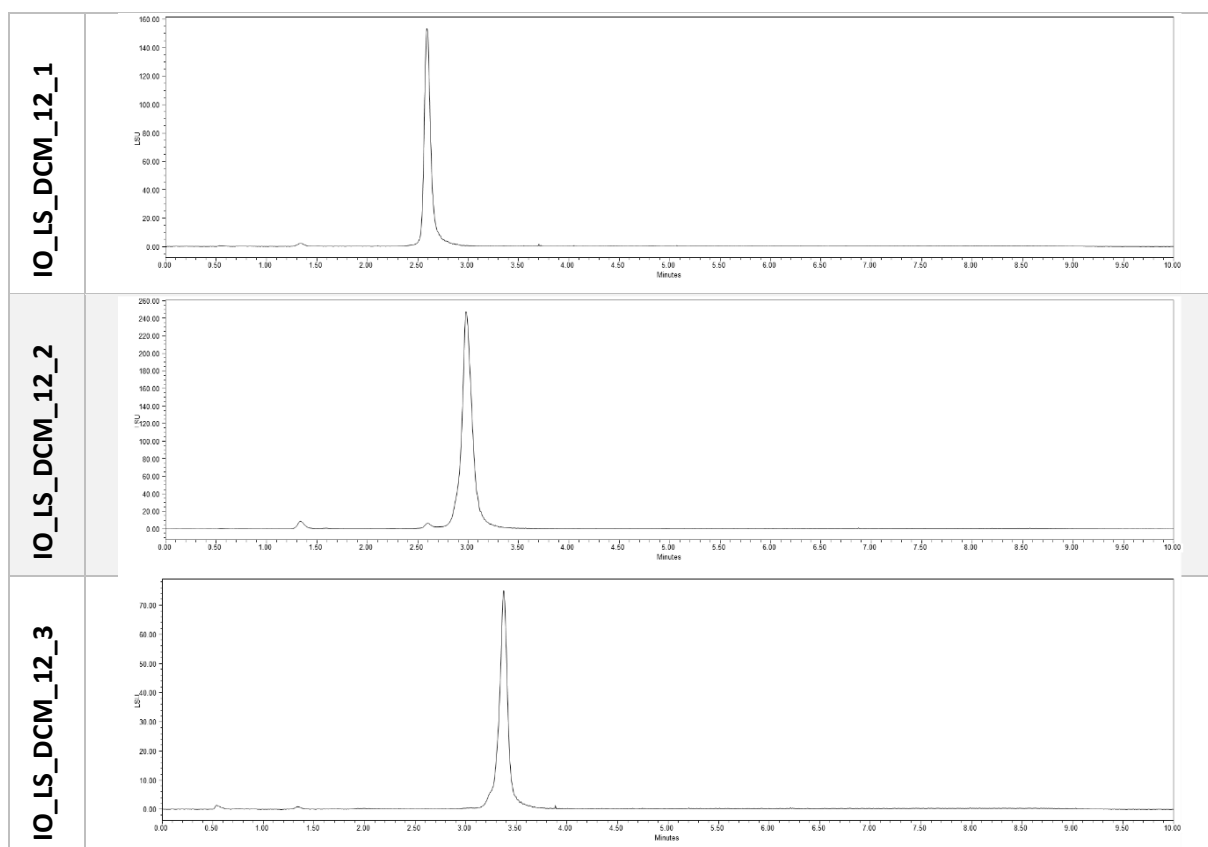


Abbildung 10 Prep-15 SFC -Chromatogramme von IO\_LS\_DCM\_12 mit den Sammelintervallen des Fraktionensammlers (grau/dunkelgrau) einschließlich der Sammelzeit von Fraktionen IO\_LS\_DCM\_12\_3 und IO\_LS\_DCM\_12\_4. ELSD-Detektion, Waters Prep-15 SFC, Torus 1-AA Säule, 40°C, Co-Lösungsmittel B= Methanol und Ethanol im Verhältnis 1:1, Gradient beginnend mit 16% B linear bis 20% bei Minute 8, sowie 2 Minuten Spülen und Reequilibrieren am Ende jedes Laufs

Tabelle 6 UPC<sup>2</sup>Analyse der Fraktionen IO\_LS\_DCM\_12\_1 bis IO\_LS\_DCM\_12\_6 (ELSD-Detektion, Waters UPC<sup>2</sup>, Torus 1-AA-Säule, 40°C, Co-Lösungsmittel B = Methanol, 1.2 ml Fluss mit einem Gradienten beginnend mit 0% B nichtlinear bis 50% bei Minute 12, 0,5 Minuten spülen und 1,5 Minuten reequilibrieren (Tabelle 10)



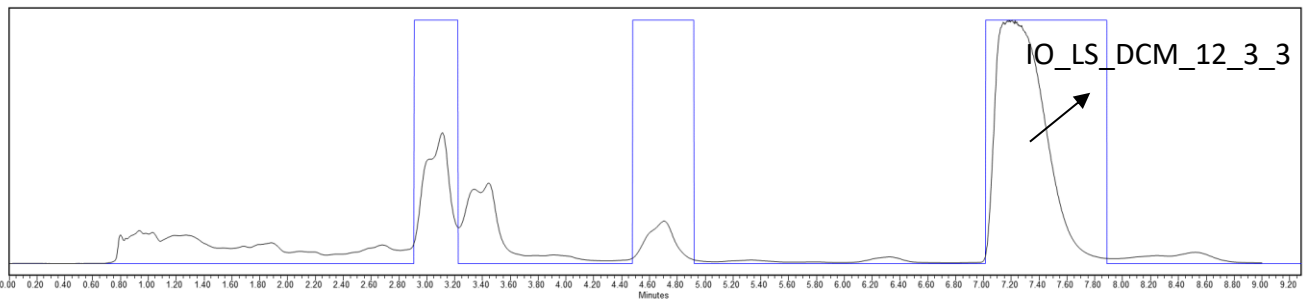
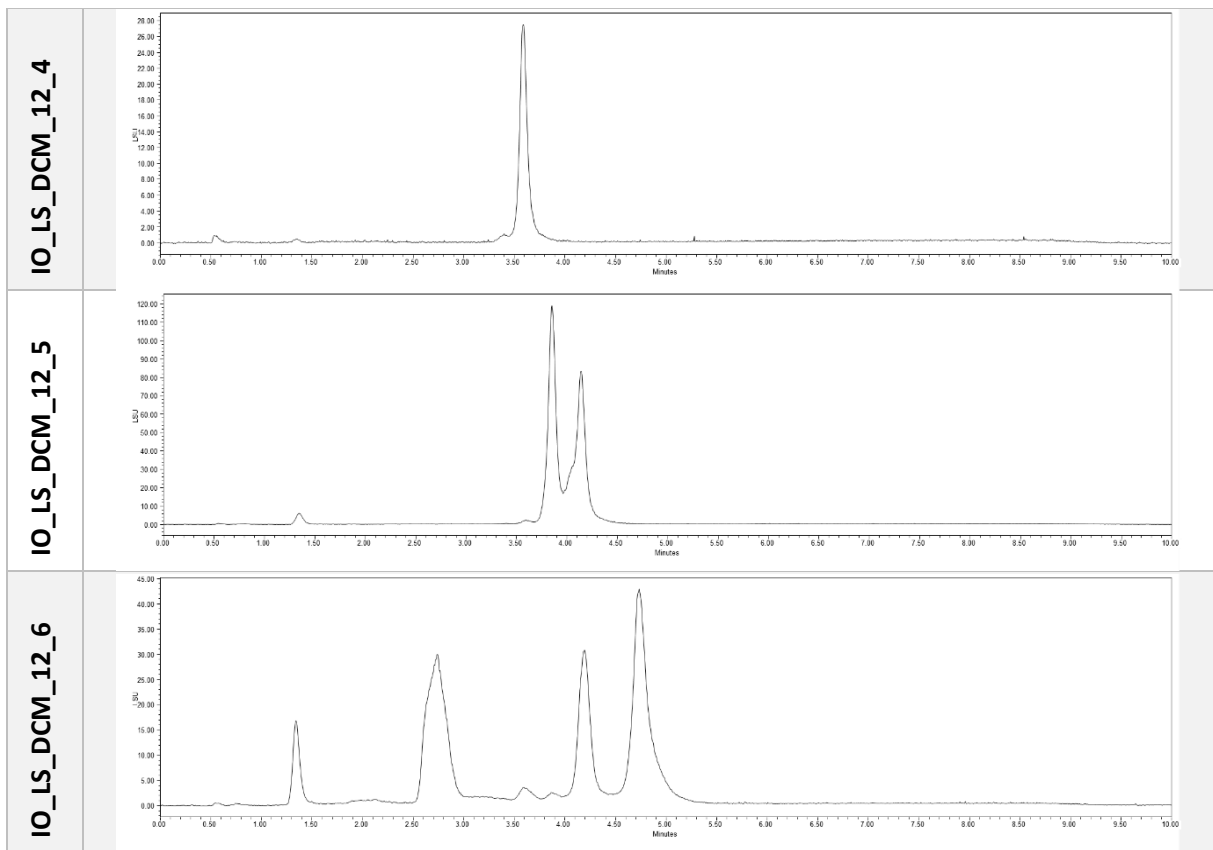


Abbildung 11 UPLC- Chromatogramm von IO\_LS\_DCM\_12\_3: Detektion PDA ( $\lambda=195??$ ) Sammelintervalle sind mit blauer Spur gekennzeichnet einschließlich des Sammelzeitpunkts der Verbindung IO\_LS\_DCM\_12\_3\_3 (schwarz), Acquity-UPLC, BEH C18 Säule, 40°C, Fluss 0,3 ml/min mit isokratischen Gradienten aus 25% mobiler Phase A = H<sub>2</sub>O und 75% mobiler Phase B = Acetonitril, Gradient isokratisch 75% B, 9 Minuten)

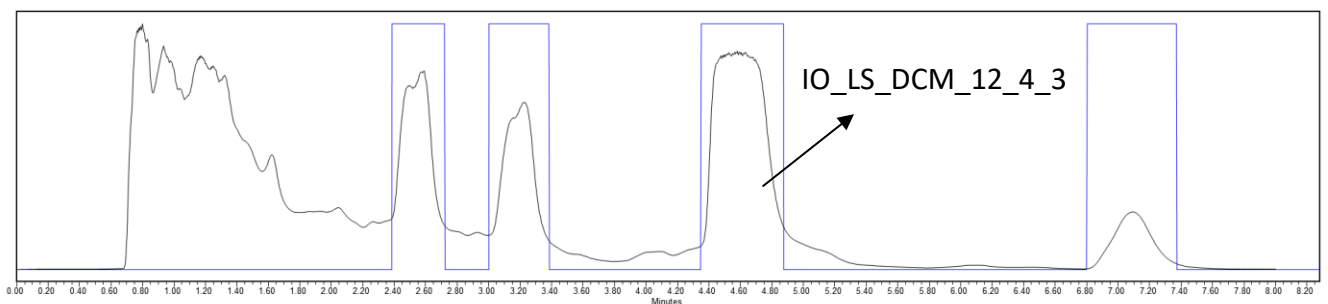
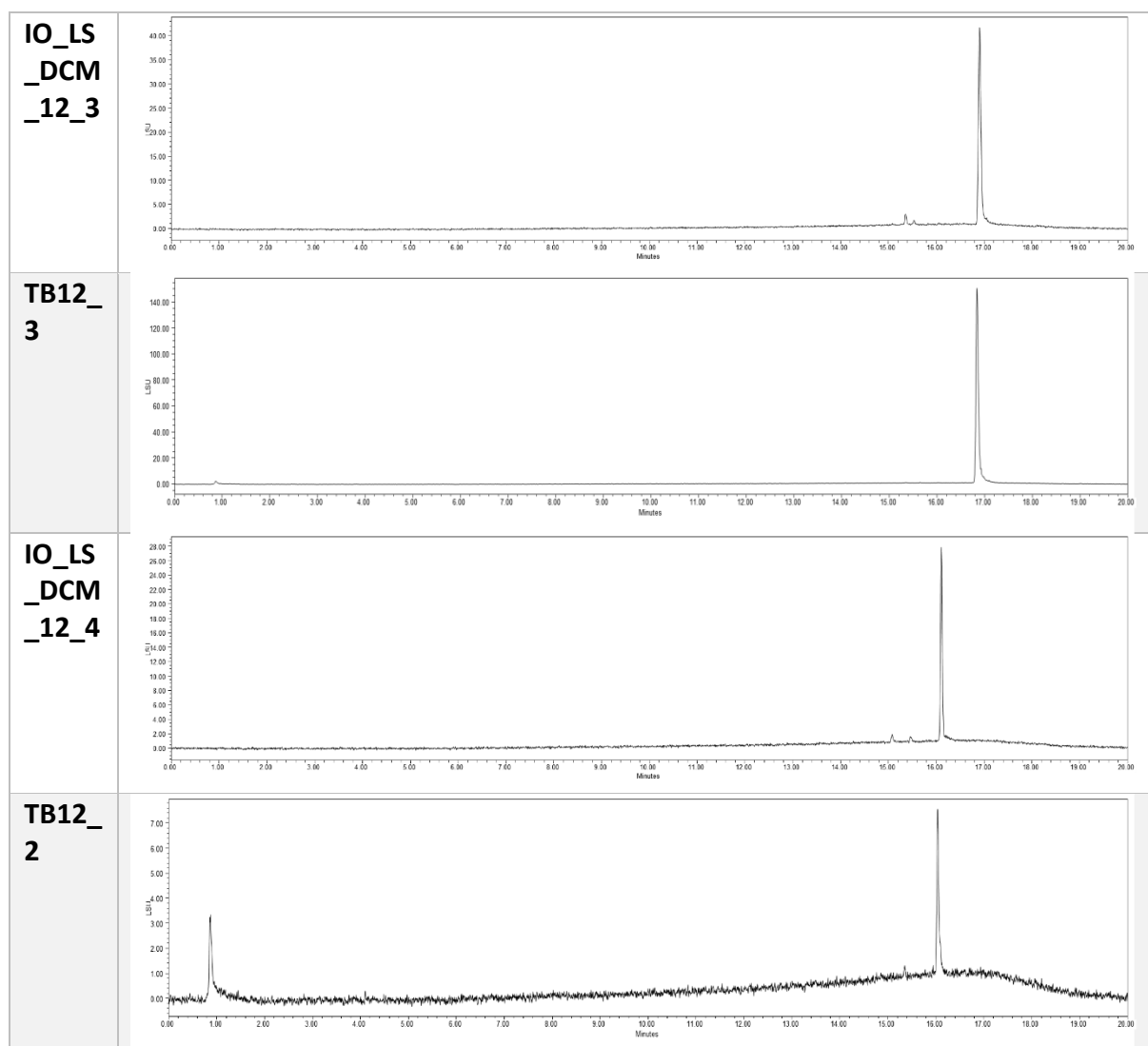


Abbildung 12 UPLC- Chromatogramm von IO\_LS\_DCM\_12\_4: Detektion PDA ( $\lambda=195??$ ) Sammelintervalle sind mit blauer Spur gekennzeichnet einschließlich des Sammelzeitpunkts der Verbindung IO\_LS\_DCM\_12\_4\_3 (schwarz), Acquity-UPLC, BEH C18 Säule, 40°C, Fluss 0,3 ml/min mit isokratischen Gradienten aus 25% mobiler Phase A = H<sub>2</sub>O und 75% mobiler Phase B = Acetonitril, Gradient isokratisch 75% B, 8 Minuten)

Tabelle 7 UHPLC Analyse- Chromatogramme der Fraktionen IO\_LS\_DCM\_12\_3, IO\_LS\_DCM\_12\_4 und der Isolate 1 (TB12\_3) und 1 (TB12\_2), ELSD-Detektion, Acquity-UPLC, BEH C18 Säule, 40°C, Fluss 0,3 ml/min, , 0,3 ml Fluss mit einem Gradienten beginnend mit 95% B nichtlinear bis 5% bei Minute 16, Mobile Phase A = H<sub>2</sub>O, Mobile Phase B = Acetonitril (Tabelle 13))



### 5.4.3 Aufreinigung der Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_1 mittels Flash-Chromatographie

Die Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_1 zeigte einen einzelnen Peak im UPC<sup>2</sup> Chromatogramm (Tabelle 6), jedoch ist anhand der DC-Fingerprints auf Abbildung 9 erkennbar, dass es sich um ein Stoffgemisch mehrere Substanzen handelt. Aufgrund der geringen Ausbeute von 6,18 mg und der recht guten Trennung auf Kieselgel wurde eine Aufreinigung mit der Sephadex LH20-Säulenchromatographie durchgeführt, dies scheiterte jedoch aufgrund ungenügender Trennung. Wegen der zu geringen Ausbeute, um weiter Vorversuche mit dieser Fraktion durchzuführen, wurde die Aufreinigung mithilfe der FC durchgeführt. (Anhang A10) Der verwendete Gradient für die Aufreinigung ist in Tabelle 17 ersichtlich. Es wurden 5 mg der

Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_1 aufgetragen. Die Ausbeute des gereinigten IO\_LS\_DCM\_12\_1 betrug 1,4 mg. Das aufgereinigte Isolat wird als IO\_LS\_DCM\_12\_1\_1 bezeichnet und wurde später mithilfe von MS/NMR als **4** charakterisiert.

#### 5.4.4 Auftrennung der Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_5 mittels Größenausschluss-Chromatographie

Wie auf der DC in Abbildung 9 zu erkennen ist, besteht die Fraktion 12\_5 hauptsächlich aus 2 Substanzen (violette und blaue Bande nach Derivatisierung). Aufgrund der geringen Menge der Ausbeute (6,72 mg) und der schlechten Trennung auf Kieselgel (Abbildung 9), war die Fraktionsmethode der Wahl war hier die Sephadex LH-20 Säulenchromatographie. Eine Übersicht über die Fraktionierung von IO\_LS\_DCM\_12\_5 ist auf Abbildung 13 zu sehen.

6,72 mg wurden auf die Sephadex-Säule aufgetragen. 106 Eprovetten mit jeweils 2 ml wurden gesammelt und mittels DC analysiert. Anhand der DC wurden die Eprovetten in 4 Unterfraktionen zusammengefasst (IO\_LS\_DCM\_12\_5\_1-IO\_LS\_DCM\_12\_5\_4). Die Ausbeuten wurden bestimmt, 0,823 mg konnten nicht regeneriert werden. Der vermeintliche Reinstoff IO\_LS\_DCM\_12\_5\_3 hatte eine Menge von 1,48 mg und wurde mit LC-MS und NMR vermessen. Dabei stellte sich heraus, dass es sich noch immer um ein Vielstoffgemisch handelte. Eine weitere Aufreinigung war durch die geringe Ausbeute nicht mehr möglich.

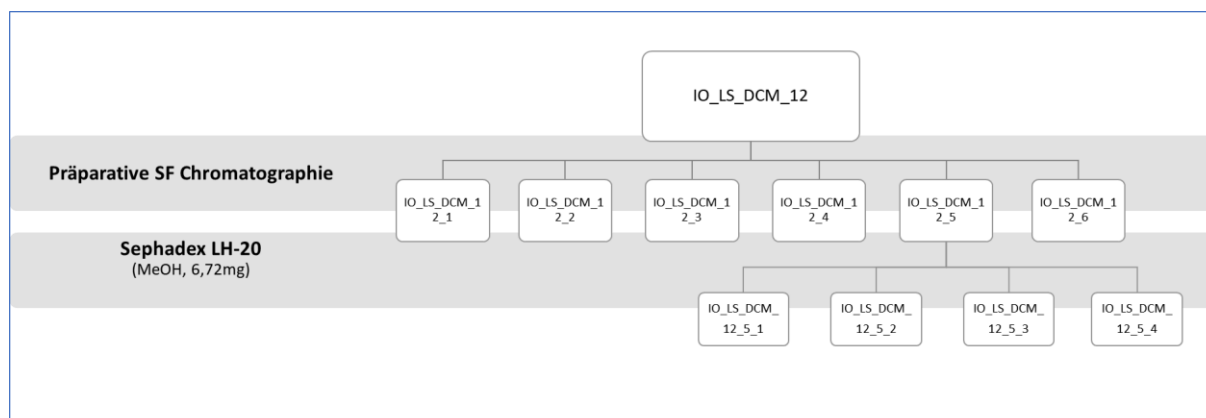


Abbildung 13 Schema der Fraktionierung von IO\_LS\_DCM\_12\_5

### 5.4.5 Auftrennung der Fraktion IO\_LS\_DCM\_13 mittels Größenausschluss-Chromatographie

Die Ausbeute der Fraktion IO\_LS\_DCM\_13 belief sich auf 634,54 mg. (Abbildung 7) Auf der DC zeigte sich, dass eine Substanz in sehr hoher Konzentration auftritt (siehe Abbildung 15, Bildmitte). Zusätzlich zu dieser waren jedoch auch andere Verbindungen mit ähnlicher Polarität und  $R_t$  in niedriger Konzentration zu sehen (Abbildung 7). Da die geringen Polaritätsunterschiede wohl zu einer schlechten Auftrennung mittels NP-LC führen würden, erschien eine Auftrennung mittels Sephadex-Säule als sinnvoll. Hierfür wurden 493,51 mg in 5 ml MeOH gelöst, auf die Säule aufgetragen. Es wurden 102 Fraktionen mit je 3 ml in Epruvetten gesammelt und ihr DC-Fingerprint analysiert. Basierend auf den DC-Fingerprints (Abbildung 15) wurden die Epruvetten dann wie in Tabelle 8 zusammengefügt. Auf der DC der Abbildung 15 ist zu sehen, dass Epruvette 61, welche die Fraktion IO\_LS\_DCM\_13\_2 bildet, weniger zusätzliche Banden zur Hauptsubstanz zeigt; gleiches gilt für Epruvette 62 und 63 welche zur Fraktion IO\_LS\_DCM\_13\_3 vereinigt wurden. Eine Übersicht der Fraktionierung ist auf Abbildung 14 dargestellt. Die Fraktionen stellen einen guten Ausgangspunkt für weitere Trennung und Isolierungsschritte.

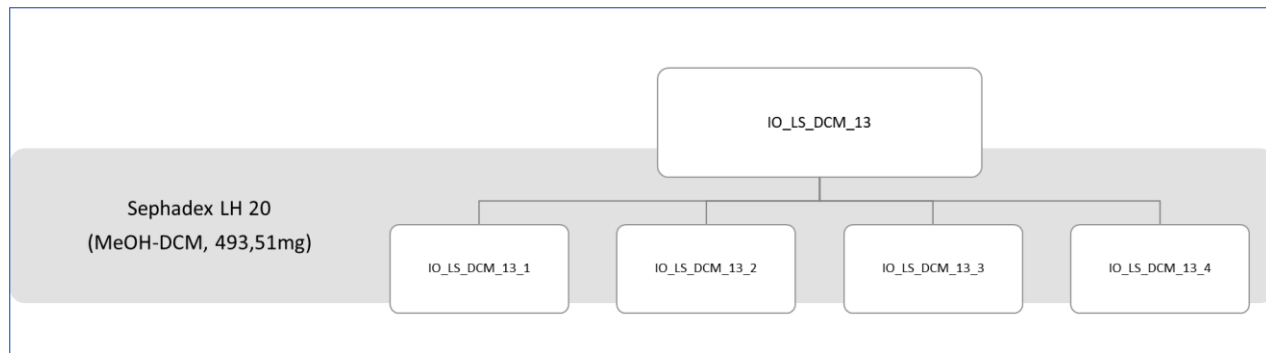


Abbildung 14 Schema der Fraktionierung von Fraktion IO\_LS\_DCM\_13

Tabelle 8 Ausbeuten und Zusammenstellung der Fraktionen IO\_LS\_DCM\_13\_1 bis IO\_LS\_DCM\_13\_4 sowie die Gesamtausbeute

| Fraktion       | Ausbeute in mg | Epruvetten |
|----------------|----------------|------------|
| IO_LS_DCM_13_1 | 123,05         | 6-60       |
| IO_LS_DCM_13_2 | 26,71          | 61         |
| IO_LS_DCM_13_3 | 98,95          | 62,63      |
| IO_LS_DCM_13_4 | 206,66         | 64-102     |
| INSGESAMT      | 455,37         |            |

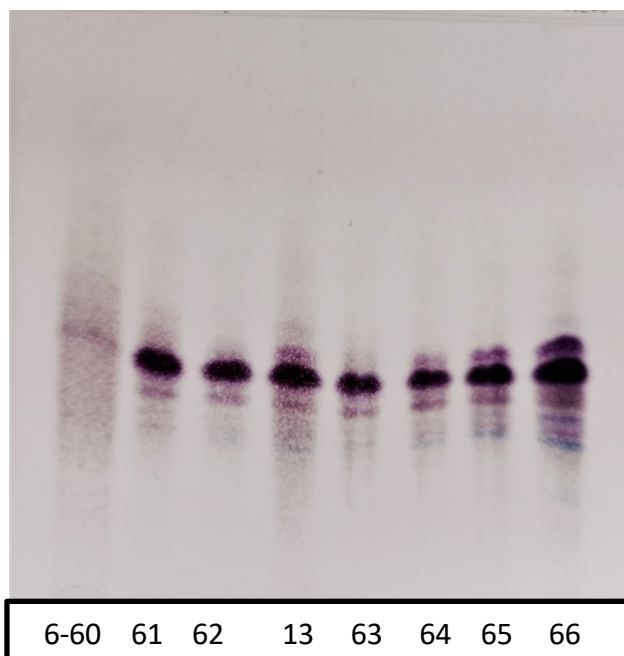


Abbildung 15 DC der Eprovetten von Fraktion IO\_LS\_DCM\_13 (13) nach der Größenausschluss-Chromatographie. Laufmittel (DCM: MeOH: H<sub>2</sub>O; 9: 1: 0,1) Merck Kieselgel 60 F254, Detektion VIS nach Besprühen mit Vanillin (1% in MeOH) / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5% in MeOH)

#### 5.4.6 Flash- Chromatographie der Fraktion IO\_LS\_DCM\_14

Die für eine weitere Auftrennung von IO\_LS\_DCM\_14 zur Verfügung stehende Menge waren 701.05 mg. Der DC-Fingerprint zeigte das Vorkommen von 3 terpenoiden Hauptsbstanzen (Abbildung 7 und Abbildung 17 Bildmitte). Das UPC<sub>2</sub> Chromatogramm zeigte aber, dass diese Fraktion wesentlich komplexer ist.

Weil eine Trennung der terpenoiden Hauptsbstanzen via DC gut möglich war, und auch relativ viel Material zur Verfügung stand, wurde für eine weitere Fraktionierung die FC verwendet. Es wurden zwei Vorversuche durchgeführt, um den optimalen Lösungsmittel-Gradient zu ermitteln. (Anhang A11) Hierbei wurden zwei mögliche Lösungsmittel ausgetestet. Die Vorversuche wurden jeweils mit DCM und Hexan durchgeführt. Es gelang mit beiden Gradienten nur die Abtrennung der ersten Substanz. Eine Trennung der beiden anderen Hauptsbstanzen konnte nicht erreicht werden. Da es notwendig ist die Verwendung von DCM angesichts der erheblichen Toxizität für Mensch und Umwelt zu reduzieren, wurde die FC mit Hexan durchgeführt.<sup>19</sup>

Die verwendeten Materialien und Methoden werden im Kapitel 5.4.4 beschrieben. Nachdem der optimale Gradient ermittelt wurde, wurden 497,74 mg der Fraktion IO\_LS\_DCM\_14 verwendet, um die FC durchzuführen. (Abbildung 16) Das zugehörige Chromatogramm ist in Anhang A12 abgebildet. Insgesamt wurden 206 Eprovetten gesammelt und anhand von DC-

Analysen in 8 Fraktionen zusammengeführt. Die Ausbeuten und DC-Fingerprints der vereinigten Fraktionen sind in Abbildung 17 abgebildet. 104,78 mg konnten nicht wieder zurückgewonnen werden. Fraktion IO\_LS\_DCM\_14\_2 wurde mittels MS als Substanz **4** (Reinheit > 90%) identifiziert. Fraktion IO\_LS\_DCM\_14\_6 wäre ein guter Ausgangspunkt für weitere Trennungsschritte, da es sich nur aus 2 Substanzen zusammensetzt. Es steht mit 100 mg auch noch ausreichend Menge zur Verfügung.

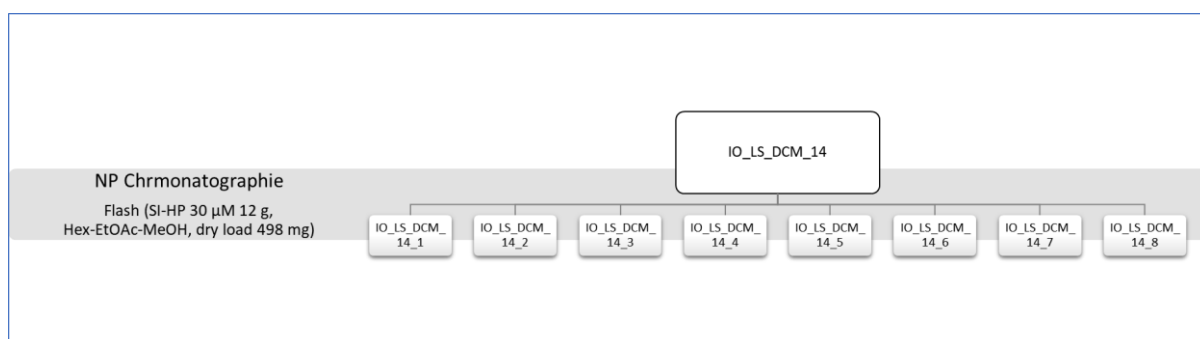


Abbildung 16 Schritte der Fraktionierung von IO\_LS\_DCM\_14

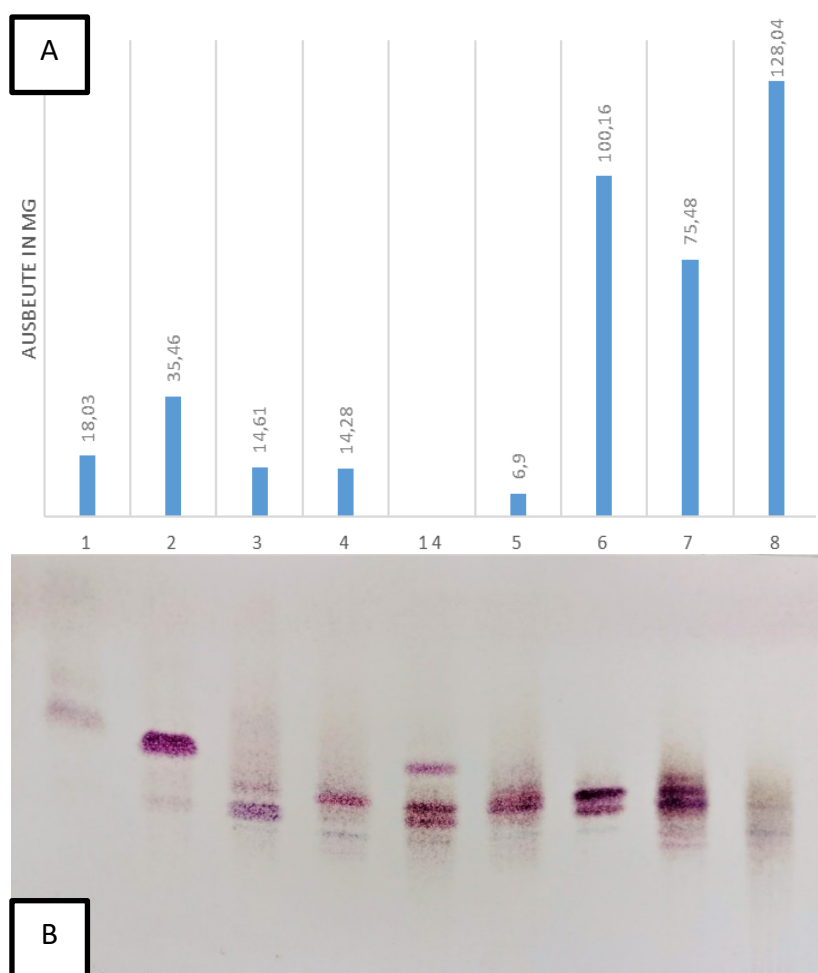


Abbildung 17 A: Ausbeute und Kennzeichnung der Fraktionen von IO\_LS\_DCM\_14\_1 (1) bis IO\_LS\_DCM\_14\_8, (8), B: DC der Fraktionen von IO\_LS\_DCM\_14: IO\_LS\_DCM\_14\_1 (1) bis IO\_LS\_DCM\_14\_8, (8)

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

---

Das Ziel dieser Arbeit war die Reisolierung der Substanzen 1 und 2 aus einem neu hergestellten Chaga-Extrakt (IO\_LS\_DCM), da frühere Bioaktivitätstests eine potente Aktivität als inverse Agonisten am ROR<sub>γ</sub> Rezeptor zeigten. Außerdem war ein zusätzliches Ziel das Auffinden potenzieller neuer Triterpene für die Austestung an verschiedenen Rezeptoren. Es gelang in dieser Masterarbeit 5 Triterpene zu isolieren (Tabelle 9). Zusätzlich wurden aus dem Chaga-Extrakt mehrere stark mit Triterpenen angereicherte Fraktionen erstellt. Sie würden sich für weitere Isolierarbeiten anbieten (Tabelle 10).

Die Fraktionen IO\_LS\_DCM\_1 - IO\_LS\_DCM\_16 wurden mithilfe der FC aus dem Extrakt IO\_LS\_DCM fraktioniert. Die Fraktionen IO\_LS\_DCM\_6 und IO\_LS\_DCM\_9 konnten mithilfe der MS als semipurifizierte Substanz 9 (Reinheit 60-80%) bzw. Substanz 3 (Reinheit < 85%) identifiziert werden.

Die Fraktionen IO\_LS\_DCM\_12\_1 - IO\_LS\_DCM\_12\_6 wurden mithilfe der Prep-15 SFC gewonnen. Die Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_1 wurde mittels FC aufgereinigt, die Ausbeute des gereinigten IO\_LS\_DCM\_12\_1 betrug 1,4 mg. Das aufgereinigte Isolat wurde als IO\_LS\_DCM\_12\_1\_1 bezeichnet und mithilfe von MS/NMR als 4 charakterisiert. Für die Auftrennung der Fraktionen IO\_LS\_DCM\_12\_3 und IO\_LS\_DCM\_12\_4 wurde eine semipräparative UHPLC-Methode entwickelt and angewendet. Es entstanden die Fraktionen IO\_LS\_DCM\_12\_3\_3 und IO\_LS\_DCM\_12\_4\_3. Letztere wurde mithilfe von NMR und MS als Substanz 5 identifiziert (Reinheit >98%, Menge 1,87 mg). Erstere aus Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_3\_3 gewonnene Substanz (Reinheit >98%, Menge 1,14 mg) wird noch einer vollständigen Charakterisierung unterzogen. Die Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_5 mit 2 Hauptinhaltsstoffen wurde mithilfe einer Sephadex Säule aufgetrennt. Der vermeintliche Reinstoff IO\_LS\_DCM\_12\_5\_3 mit einer Ausbeute von 1,48 mg wurde mit LC-MS und NMR vermessen. Dabei stellte sich heraus, dass es sich noch immer um ein Vielstoffgemisch handelte. Eine weitere Aufreinigung war durch die geringe Ausbeute nicht mehr möglich. Um die beiden Hauptinhaltsstoffe von IO\_LS\_DCM\_12\_5 zu isolieren, stehen noch 350,66 mg der Fraktion IO\_LS\_DCM\_12 zur Verfügung. Um diese zwei Hauptinhaltsstoffe gut aufzutrennen, wäre es ratsam den Fokus bei der Auswahl des Gradienten auf die Trennung dieser beide Substanzen zu legen (ohne Fokus auf IO\_LS\_DCM\_12\_3 bzw. IO\_LS\_DCM\_12\_4). Die Fraktion IO\_LS\_DCM\_13 wurde ebenfalls mithilfe einer Sephadex-Säule aufgetrennt, dabei entstanden

die Fraktionen IO\_LS\_DCM\_13\_2 und IO\_LS\_DCM\_13\_3, welche einen guten Ausgangspunkt für weitere Trennung und Isolierungsschritte darstellen. IO\_LS\_DCM\_13\_3 konnte ebenfalls als Substanz 5 identifiziert werden (Reinheit > 92%, Menge 1,87 mg).

Die Fraktion IO\_LS\_DCM\_14 wurden mithilfe der FC getrennt. Dabei wurde Substanz 4 (IO\_LS\_DCM\_14\_2, Reinheit > 90%) abgetrennt. Die Fraktion IO\_LS\_DCM\_14\_6 wäre ein guter Ausgangspunkt für weitere Trennungsschritte, da sich diese Fraktion nur mehr aus 2 Hauptsubstanzen zusammensetzt. Es steht mit 100 mg auch noch ausreichend Fraktion zur Verfügung. Die Substanzen ließen sich weder mithilfe der DC noch mit der FC gut trennen. Ein Vorschlag für die weitere Auftrennung wäre eine Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (RP-LC), bzw. die Auftrennung mithilfe der Sephadex- Säule oder mittels SFC. Der Chaga-Extrakt stellt eine unglaublich reiche Quelle an bioaktiven Triterpenen dar. Mit dieser hier vorgelegten Arbeit konnten 5 Triterpene in ausreichender Reinheit gewonnen werden und zahlreiche angereicherte Fraktionen für weitere Isolierungsschritte zur Verfügung gestellt werden.

*Tabelle 9 Bezeichnung und Ausbeuten der Isolierten Reinsubstanzen*

| Reinsubstanz                | Fraktion         | Ausbeute |
|-----------------------------|------------------|----------|
| Inotodiol (3)               | IO_LS_DCM_9      | 811,43   |
| Trametanolsäure (4)         | IO_LS_DCM_12_1_1 | 1,4      |
|                             | IO_LS_DCM_14_2   | 35,46    |
| Struktur noch nicht geklärt | IO_LS_DCM_12_3_3 | 1,14     |
| Inonotsutriol A (5)         | IO_LS_DCM_12_4_3 | 1,87     |
|                             | IO_LS_DCM_13_3   | 98,95    |
| Lanosterol (9)              | IO_LS_DCM_6      | 36,76    |

*Tabelle 10 Bezeichnung und Ausbeute jener Fraktionen, welche für eine weitere Aufreinigung und Trennung zur Verfügung stünden*

| Fraktion       | Ausbeute in mg |
|----------------|----------------|
| IO_LS_DCM_12   | 350,66         |
| IO_LS_DCM_14_6 | 100,16         |

## 7 Material und Methoden

---

### 7.1 Ausgangsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten *I. obliquus*-Sklerotien stammten aus Wildsammlungen in Finnland oberhalb des Polarkreises. Sie wurden von der Firma Pakuso LLC (Lieto, Finnland) zur Verfügung gestellt.

### 7.2 Ermittlung des optimalen Extraktionsmittels für Triterpene

500 mg der trockenen und grob gemahlenen Sklerotien wurden 15 Minuten im Ultraschallbad mit 12 ml Extraktionsmittel extrahiert. Es wurde mit folgenden Extraktionsmitteln extrahiert: Ethanol (E1), Dichlormethan (E2), Aceton(E3) und Hexan (E4). Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 3500 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde durch eine mit Watte gefüllte Pasteurpipette filtriert. Die Watte wurde danach zusammen mit der extrahierten Droge vereinigt und es erfolgte eine zweite Extraktion mit demselben Extraktionsmittel auf dieselbe Weise. Die Filtrate wurden in einem Birnenkolben vereinigt und am Rotavapor unter vermindertem Druck zum Trockenen gebracht.

Die Proben wurden auf eine Konzentration von 5 mg/ml bzw. 2,5 mg/ml (E4) in einer Mischung aus Hexan und Isopropanol 7:3 verdünnt (Ep1, Ep2, Ep3). Der Extrakt E4 wurde aufgrund der geringen Ausbeute auf eine Konzentration von 2,5 mg/ml verdünnt, jedoch wurde bei der Messung mit UPC<sup>2</sup> die doppelte Menge eingespritzt. Da das Signal der Hauptverbindungen bei EP3 und E4 mit den Herstellerereinstellungen bereits gesättigt waren, wurden diese erneut mit einem Gain von 200<sup>1</sup> vermessen (Anhang A1).

Anschließend wurde mit den Extrakten E1, E2 und E3 eine SPE zum Entfernen der Pigmente durchgeführt. Hierbei wurden 3 ml SPE- Leerkartuschen mit Fritten (Porengröße, 20 µm) und mit jeweils 900 mg Polyamid Gel (CC-6) als Sorbens gefüllt und wie folgt verwendet: Die Proben wurden in 2 ml MeOH rekonstituiert und auf die SPE-Kartusche aufgetragen. Anschließend wurde das beladene Festphasengel zweimal mit jeweils 4 ml MeOH gewaschen. Das Eluat wurde gesammelt und bildete die gereinigten Extrakte Ep1, Ep2 und Ep3. Das

Volumen der Extrakte wurde am Rotavapor reduziert. Die Extrakte wurden in 2 ml MeOH rekonstituiert und in tarierte Vials überführt und getrocknet.

### 7.3 Extraktion mit Aceton im Großmaßstab

Die Droge wurde vor der Extraktion in einer Mühle zu Pulver (Porengröße 0.75 mm) vermahlen. Die Extraktion von 3439,0 g Droge erfolgte mit 11,5 L Aceton in 3 großen Erlenmeyerkolben. Die Droge wurde zwei Tage auf einem Schüttler mazeriert. Anschließend wurde der Überstand abgenutscht, zentrifugiert, filtriert und das Extraktionsmittel am Rotavapor abgedampft. Die Droge wurde zusammen mit den verwendeten Filtern erneut extrahiert. Die Extraktion erfolgte insgesamt 3 mal. (Tabelle 3)

## 7.4 Chromatographie

### 7.4.1 Dünnschichtchromatographie

*Tabelle 11 DC- System*

|                          |                                                                                            |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mobile Phase:</b>     | DCM: MeOH: H <sub>2</sub> O, 9: 1: 0,1                                                     |
| <b>Stationäre Phase:</b> | Merck Kieselgel 60 F254                                                                    |
| <b>Detektion:</b>        | VIS nach Besprühen mit Vanillin (1% in MeOH) / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5% in MeOH) |

Die Proben wurden zunächst in Aceton gelöst und je nach Komplexität der Probe wurden 5 µg bis 50 µg des Analyten gelöst in 5 µl Laufmittel mit einer Glaskapillare auf die DC-Platte aufgetragen. Nach Verdunstung des Lösungsmittels wurde die DC-Platte, in die bereits mit mobiler Phase gesättigte Entwicklungskammer überführt und entnommen, wenn das Laufmittel eine 0.5 cm Markierung unter dem oberen Rand erreicht hatte. Die erste DC-Detektion wurde vor der Derivatisierung mit dem CAMAG TLC-Visualizer unter sichtbarem Licht, UV254 und UV366 durchgeführt. Daraufhin wurde die Platte getrocknet und derivatisiert. Dazu wurde die Platte nacheinander mit Vanillin und Schwefelsäure Lösung besprüht und 5 Minuten lang bei etwa 80 °C erhitzt. Anschließend wurde die Platte erneut mit den gleichen Einstellungen detektiert. Eine Übersicht, über die das verwendete DC-System ist in Tabelle 9 zu sehen.

### 7.4.2 UPC<sup>2</sup> – Superkritische Flüssigkeitschromatographie

Für die analytische Chromatographie mit superkritischen CO<sub>2</sub> wurde das Acquity UPC<sup>2</sup> Gerät (Waters, USA) verwendet. Dieses Gerät besteht aus einem Probenmanager, binären

Lösungsmittelmanager, einem Konvergenz-, und Säulenmanager. Außerdem sind auch ein PDA- und ein ELS-Detektor angeschlossen. Die Betriebssoftware war Empower 3. Die verwendete Methode für alle Analysen mit der SFC ist in Tabelle 10 aufgeführt. Die für das Säulenscreening verwendete Methode und Säulen sind in Tabelle 11 zu sehen.

Tabelle 12 SFC- Parameter der UPC<sup>2</sup> Methode

|                           |                                                    |            |            |
|---------------------------|----------------------------------------------------|------------|------------|
| <b>SFC-Technik</b>        |                                                    |            |            |
| <b>Flussrate (ml/min)</b> | 1.200                                              |            |            |
| <b>Mobile Phase A</b>     | CO <sub>2</sub>                                    |            |            |
| <b>Mobile Phase B</b>     | MeOH                                               |            |            |
|                           | <b>Zeit (min)</b>                                  | <b>% A</b> | <b>% B</b> |
| <b>Gradient</b>           | 0                                                  | 100        | 0          |
|                           | 1                                                  | 95         | 5          |
|                           | 2                                                  | 95         | 5          |
|                           | 3                                                  | 90         | 10         |
|                           | 4                                                  | 90         | 10         |
|                           | 5                                                  | 86         | 14         |
|                           | 6.5                                                | 80         | 20         |
|                           | 7.5                                                | 80         | 20         |
|                           | 8                                                  | 70         | 30         |
|                           | 10                                                 | 70         | 30         |
|                           | 11                                                 | 56         | 44         |
|                           | 12                                                 | 50         | 50         |
|                           | 12.5                                               | 50         | 50         |
|                           | 13                                                 | 100        | 0          |
|                           | 14                                                 | 100        | 0          |
| <b>Startdruck</b>         | 3250 psi                                           |            |            |
| <b>Temperatur (°C)</b>    | 40                                                 |            |            |
| <b>Stationäre Phase</b>   | Torus 1-AA Column<br>(3.0 * 100 mm, 1.7 µm, 130 Å) |            |            |

Tabelle 13 Stationäre Phasen und Lösungsmittel Gradienten des Säulenscreenings an der UPC<sup>2</sup> von IO\_LS\_DCM\_12

| <b>Säule</b>                                   | <b>Dimension (mm)</b> | <b>Mobile Phase B</b> | <b>Gradient (%B)</b> | <b>Dauer (min)</b> |
|------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|
| <b>1-Aminoanthracene</b>                       | 3.0*100               | MeOH<br>EtOH<br>IPA   | 10-50%               | 20                 |
| <b>Bridged-Ethylene-Hybrid (analytisch)</b>    | 3.0*100               | MeOH<br>EtOH<br>IPA   | 10-50%               | 20                 |
| <b>Bridged-Ethylene-Hybrid-2 Ethylpyridine</b> | 3.0*100               | MeOH<br>EtOH<br>IPA   | 10-50%               | 20                 |

|                                         |           |                     |        |    |
|-----------------------------------------|-----------|---------------------|--------|----|
| <b>2-Ethylpyridine<br/>(analytisch)</b> | 3.0 * 150 | MeOH<br>EtOH<br>IPA | 10-50% | 20 |
|-----------------------------------------|-----------|---------------------|--------|----|

Für die präparative SFC wurde das Prep-15 SFC-System (Waters, USA) verwendet. Dieses besteht aus einem Flüssigkeitszufuhrmodul, das mit einem Accel 500 LC-Kühler (Thermo Fisher Scientific) verbunden ist, einem 10-Port-Säulenmanager, einem Waters 2767 Probenmanager, einem Druckregler, einem Wärmetauscher, einer Pumpe, einem Waters 2998 PDA und einem Waters 2424 ELSD. Als Betriebssoftware wurde MassLynx V4.1 eingesetzt. Mit dem Probensammler und der hohen Flussrate war es möglich, bestimmte Peaks zu trennen und zu isolieren. Die für die Fraktionierung von Fraktion IO\_LS\_DCM\_12 verwendete Methode wurde zu Beginn optimiert (Tabelle 12).

*Tabelle 14: SFC-Fraktionierungsmethode für die SFC Prep-15*

| <b>SFC-Technik</b>            | <b>Fraktionierungsmethode</b>         |            |            |
|-------------------------------|---------------------------------------|------------|------------|
| <b>Injektion Volumen (µl)</b> | 100                                   |            |            |
| <b>Flussrate (ml/min)</b>     | 15                                    |            |            |
| <b>Mobile Phase A</b>         | CO <sub>2</sub>                       |            |            |
| <b>Mobile Phase B</b>         | MeOH/EtOH 1:1                         |            |            |
|                               | <b>Zeit (min)</b>                     | <b>% A</b> | <b>% B</b> |
| <b>Gradient</b>               | 0                                     | 84         | 16         |
|                               | 7                                     | 80         | 20         |
|                               | 8                                     | 80         | 20         |
|                               | 8,5                                   | 84         | 16         |
|                               | 10                                    | 84         | 16         |
| <b>Druck</b>                  | 120bar                                |            |            |
| <b>Temperatur</b>             | 40° C                                 |            |            |
| <b>Stationäre Phase</b>       | Torus 1-AA Column<br>(10 mm * 250 mm) |            |            |

### 7.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Acquity-UPLC Gerät (Waters, USA) wurde in dieser Arbeit verwendet. Als stationäre Phase wurde die Säule Aquity UPLC BEH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ ) verwendet. Als mobile Phase wurde  $\text{H}_2\text{O}$  und Acetonitril verwendet. Als Detektoren für die analytischen Untersuchungen dienten ELSD und PDA. Die Proben wurden für die Analyse in MeOH aufgelöst. Der verwendete Gradient ist in Tabelle 13 dargestellt. Für die präparativen Schritte wurde der PDA mit einer Wellenlänge von 208 nm herangezogen und an einen Probensammler gekoppelt. Der Gradient wurde für eine schnelle Fraktionierung angepasst. (Tabelle 14)

Tabelle 15 UPLC-Parameter der analytischen Untersuchungen

| <b>Flussrate (ml/min)</b> | 0.3                  |            |            |
|---------------------------|----------------------|------------|------------|
| <b>Mobile Phase A</b>     | $\text{H}_2\text{O}$ |            |            |
| <b>Mobile Phase B</b>     | Acetonitril          |            |            |
| <b>Gradient</b>           | <b>Zeit (min)</b>    | <b>% A</b> | <b>% B</b> |
|                           | 0                    | 5          | 95         |
|                           | 2                    | 5          | 95         |
|                           | 10                   | 55         | 45         |
|                           | 14                   | 5          | 95         |
|                           | 16                   | 95         | 5          |
|                           | 20                   | 95         | 5          |
| <b>Temperatur</b>         | 40°C                 |            |            |

Tabelle 16 Optimierter Gradient für die Isolierung von IO\_LS\_DCM\_12\_3\_3 (9 Minuten) und IO\_LS\_DCM\_12\_4\_3 (8 Minuten)

| <b>Flussrate (ml/min)</b>                           | 0.3                  |            |            |
|-----------------------------------------------------|----------------------|------------|------------|
| <b>Injektionsvolumen (<math>\mu\text{l}</math>)</b> | 10                   |            |            |
| <b>PDA-Wellenlänge (nm)</b>                         | 208                  |            |            |
| <b>Mobile Phase A</b>                               | $\text{H}_2\text{O}$ |            |            |
| <b>Mobile Phase B</b>                               | Acetonitril          |            |            |
| <b>Gradient</b>                                     | <b>Zeit (min)</b>    | <b>% A</b> | <b>% B</b> |
|                                                     | 0                    | 25         | 75         |
|                                                     | 8/9                  | 25         | 75         |
| <b>Temperatur</b>                                   | 40°C                 |            |            |

#### 7.4.4 Flash-Chromatographie

Die Flash-Chromatographie (FC) ist eine automatisierte Säulenchromatographie, bei der die mobile Phase mit mittlerem Druck durch die Säule gepumpt wird. Dadurch können, verglichen mit der Säulenchromatographie bei atmosphärischem Druck, kleinere Silicagelpartikel als stationäre Phase verwendet werden. Dies führt zu einer höheren Auflösung und kürzeren Elutionszeiten. Das verwendete puriFlash® 4250 System (Interchim, USA) ist mit zwei Detektoren gekoppelt, einem PDA und einem ELSD, sowie einen Fraktionensammler (Abbildung 18).



Abbildung 18 Interchim puriFlash® 4250 während der Fraktionssammlung

Die verwendeten Lösungsmittelgradienten sind in den Tabellen 16-18 aufgeführt. Die Probenzufuhr erfolgte in

„Dry Load“, dazu wurde die Probe in einem Rundkolben in MeOH gelöst und in der Lösung etwa die doppelte Menge Kieselgel suspendiert. Das Lösungsmittel wurde durch Verdampfen unter verminderten Druck entfernt. Anschließend wurde das pulverförmige Proben-Kieselgel-Gemisch in eine Kartusche gefüllt und diese mit reinem Kieselgel aufgefüllt. Die Kartusche musste nach dem Wasch- und Äquilibrierungsschritt in das Gerät eingesetzt werden. Als Detektoren dienten ein PDA mit einem Wellenlängenbereich von 200 bis 600 nm sowie ein ELSD. Die Sammlung der Fraktionen erfolgte zeitgesteuert.

Zur Bestimmung der optimalen Methode zur Trennung des Großmaßstab Extraktes wurden 3 verschiedene Gradienten ausgetestet mit jeweils 50 – 70 mg der Probe (Anhang A3, Tabelle 1-3). Die Fraktionen wurden daraufhin auch mithilfe von DC analysiert, um die beste Methode zu ermitteln. Zur Bestimmung des optimalen Gradienten für die Trennung der Fraktion IO\_LS\_DCM\_14 wurden 2 verschiedene Gradienten ausgetestet mit jeweils 50 mg. (Anhang A11) Die Fraktionen wurden ebenfalls mithilfe von DC analysiert, um die beste Methode zu ermitteln. Die mobilen und stationäre Phasen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 15 aufgeführt. Der verwendete Gradient für die Fraktionierung von IO\_LS\_DCM ist in Tabelle 16 zu sehen, die Gradienten für die Fraktionierung von IO\_LS\_DCM\_12\_1 und IO\_LS\_DCM\_14 in Tabelle 17 und Tabelle 18.

Tabelle 17 Mobile und stationäre Phasen der in dieser Arbeit verwendeten Flash-Chromatographien

| Fraktion/Extrakt             | Säule                                      | L<br>M<br>A           | L<br>M<br>B           | L<br>M<br>C      |
|------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| Vorversuche<br>IO_LS_DCM     | PURIFLASH COLUMN 15 SILICA HP 4G- 4.0g     | H<br>e<br>x<br>a<br>n | D<br>C<br>M           | M<br>e<br>O<br>H |
| IO_LS_DCM                    | PURIFLASH COLUMN 30 SILICA HP 120G-120.0 g | H<br>e<br>x<br>a<br>n | D<br>C<br>M           | M<br>e<br>O<br>H |
| IO_LS_DCM_12_1               | PURIFLASH COLUMN 15 SILICA HP 4G- 4.0g     | H<br>e<br>x<br>a<br>n | D<br>C<br>M           | M<br>e<br>O<br>H |
| Vorversuch 1<br>IO_LS_DCM_14 | PURIFLASH COLUMN 15 SILICA HP 4G- 4.0g     | D<br>C<br>M           | E<br>t<br>O<br>A<br>c | M<br>e<br>O<br>H |
| Vorversuch 2<br>IO_LS_DCM_14 | PURIFLASH COLUMN 15 SILICA HP 4G- 4.0g     | H<br>e<br>x<br>a<br>n | E<br>t<br>O<br>A<br>c | M<br>e<br>O<br>H |
| IO_LS_DCM_14                 | PURIFLASH COLUMN 30 SILICA HP 12G-12.0 g   | H<br>e<br>x<br>a<br>n | E<br>t<br>O<br>A<br>c | M<br>e<br>O<br>H |

Tabelle 18 Verwendeter Gradient für die Fraktionierung von IO\_LS\_DCM

| Flussrate (ml/min): | 46        |         |          |
|---------------------|-----------|---------|----------|
| Zeit (min)          | Hexan (%) | DCM (%) | MeOH (%) |
| 0                   | 60        | 40      | 0        |
| 20                  | 20        | 80      | 0        |
| 40                  | 10        | 90      | 0        |
| 50                  | 0         | 98      | 2        |
| 60                  | 0         | 98      | 2        |
| 90                  | 0         | 85      | 15       |
| 115                 | 0         | 85      | 15       |

Tabelle 19 Verwendeter Gradient für die Fraktionierung von IO\_LS\_DCM\_12\_1

| <b>Flussrate (ml/min):</b> 4 |                  |                |                 |    |
|------------------------------|------------------|----------------|-----------------|----|
| <b>Zeit (min)</b>            | <b>Hexan (%)</b> | <b>DCM (%)</b> | <b>MeOH (%)</b> |    |
| 0                            |                  | 100            | 0               | 0  |
| 20                           |                  | 100            | 0               | 0  |
| 40                           |                  | 0              | 100             | 0  |
| 50                           |                  | 0              | 100             | 0  |
| 70                           |                  | 0              | 90              | 10 |
| 100                          |                  | 0              | 90              | 10 |

Tabelle 20 Verwendeter Gradient für die Fraktionierung von IO\_LS\_DCM\_14

| <b>Flussrate (ml/min):</b> 4 |                  |                  |                 |    |
|------------------------------|------------------|------------------|-----------------|----|
| <b>Zeit (min)</b>            | <b>Hexan (%)</b> | <b>EtoAc (%)</b> | <b>MeOH (%)</b> |    |
| 0                            |                  | 100              | 0               | 0  |
| 5                            |                  | 100              | 0               | 0  |
| 10                           |                  | 75               | 25              | 0  |
| 70                           |                  | 25               | 75              | 0  |
| 75                           |                  | 0                | 100             | 0  |
| 85                           |                  | 0                | 50              | 50 |
| 110                          |                  | 0                | 50              | 50 |

#### 7.4.5 Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie ist eine Technik, bei der Moleküle aufgrund ihrer Größe getrennt werden. Als stationäre Phasen wird zum Beispiel Sephadex oder Polyethylenglykol verwendet. In dieser Arbeit wurde ausschließlich Sephadex LH-20 verwendet. Dieses Material wird durch die Vernetzung des Polysaccharids Dextran durch Epichlorhydrin hergestellt, so dass ein dreidimensionales Konstrukt entsteht.<sup>20</sup> Es wurden zwei Laufmittelsysteme verwendet: MeOH und eine Mischung aus MeOH und DCM (50 + 50).

Hierfür wurden zwei verschiedene Säule verwendet. Die Säule mit MeOH als Laufmittel hatte einen Durchmesser von 1,5 cm und einer Länge von 1 m. Die Säule, bei welcher als Laufmittel eine Mischung aus MeOH und DCM (50 + 50) verwendet wurde, hatte einen Durchmesser von 2,5 cm und eine Länge von 1 m. Die Flussrate betrug etwa 2 ml/min, nach der Sammlung wurde das Lösungsmittel in den Eproutetten unter atmosphärischen Druck unter dem Abzug oder unter vermindertem Druck mit dem Gerät Genevac EZ-2 Mk3 abgedampft. Die getrockneten Fraktionen wurden in 1 ml Aceton gelöst und 5 µl wurden auf eine DC aufgetragen.

## 7.5 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um eine analytische Methode zur Identifizierung und Strukturaufklärung unbekannter Substanzen und zu Quantifizierung bekannter Substanzen. Hierfür wird das Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) eines Moleküls bestimmt, dies ermöglicht eine qualitative und quantitative Messung. Der erste Schritt der Messung ist die Ionisierung der Probe, diese erfolgt in der Regel im Vakuum. Die hier verwendete Ionisierungsmethode, die Elektronensprühionisation, gehört zu der weichen Ionisationsmethoden. Nach der Ionisierung werden die entstandenen Ionen in einem Analysator gemäß ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) getrennt um anschließend in einem Detektor registriert zu werden. Zu diesen Massenanalysatoren gehören Quadrupol-Ionenfallen- oder Flugzeitmassenspektrometer. Die Ionen werden schließlich nach Masse-zu-Ladung getrennten Ionen mit einem Detektor registriert, zu diesen gehört der Sekundärelektronenvervielfacher oder der Faraday-Auffänger.<sup>20</sup>

Zur Charakterisierung der in dieser Arbeit isolierten Triterpene wurde der Quadrupole Dalton (QDa) Detektor (Waters, USA) verwendet. Der Fluss aus dem UPLC Gerät wurde 1 zu 10 gesplittet und mithilfe eines Isokratischen Solvent Manager (ISM) Moduls mit Ameisensäure in einer 9 zu 1 Mischung aus MeOH und H<sub>2</sub>O gemischt. N<sub>2</sub> diente als Vernebelungsgas für den QDa-Betrieb. Das Gerät wurde über die Software Empower 3 gesteuert.

## 7.6 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Das Prinzip der NMR beruht auf der Anregung von Atomkernen durch Radiowellen. Die Elektronen werden dabei durch ein homogenes magnetisches Feld in einen höheren Energiezustand versetzt. Zwischen dem schwingenden Feld und den rotierenden Atomkernen entsteht eine Resonanz. Die Kerne kehren am Ende des Pulses in ihren Gleichgewichtszustand zurück. Durch das im Receiver produziertes magnetisches Feld, wird elektrischer Strom produziert, dieser wird verstärkt und detektiert.

NMR-Experimente wurden auf einem Bruker Avance 500 MHz NMR-Spektrometer (UltraShield) (Bruker, USA) mit einer 5-mm-Sonde (TCI Prodigy CryoProbe, 5 mm, Dreifachresonanz-Sondenkopf mit inverser Detektion) mit z-Achsen-Gradienten und automatischem Abstimmungs- und Anpassungszubehör (Bruker BioSpin) durchgeführt. Die Resonanzfrequenz für <sup>1</sup>H-NMR betrug 500 MHz und für <sup>13</sup>C-NMR 125 MHz. Es wurden

standardmäßige 1D- und 2D-Experimente, wie z. B. COSY, NOESY, HSQC und HMBC, gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 8 Literaturverzeichnis

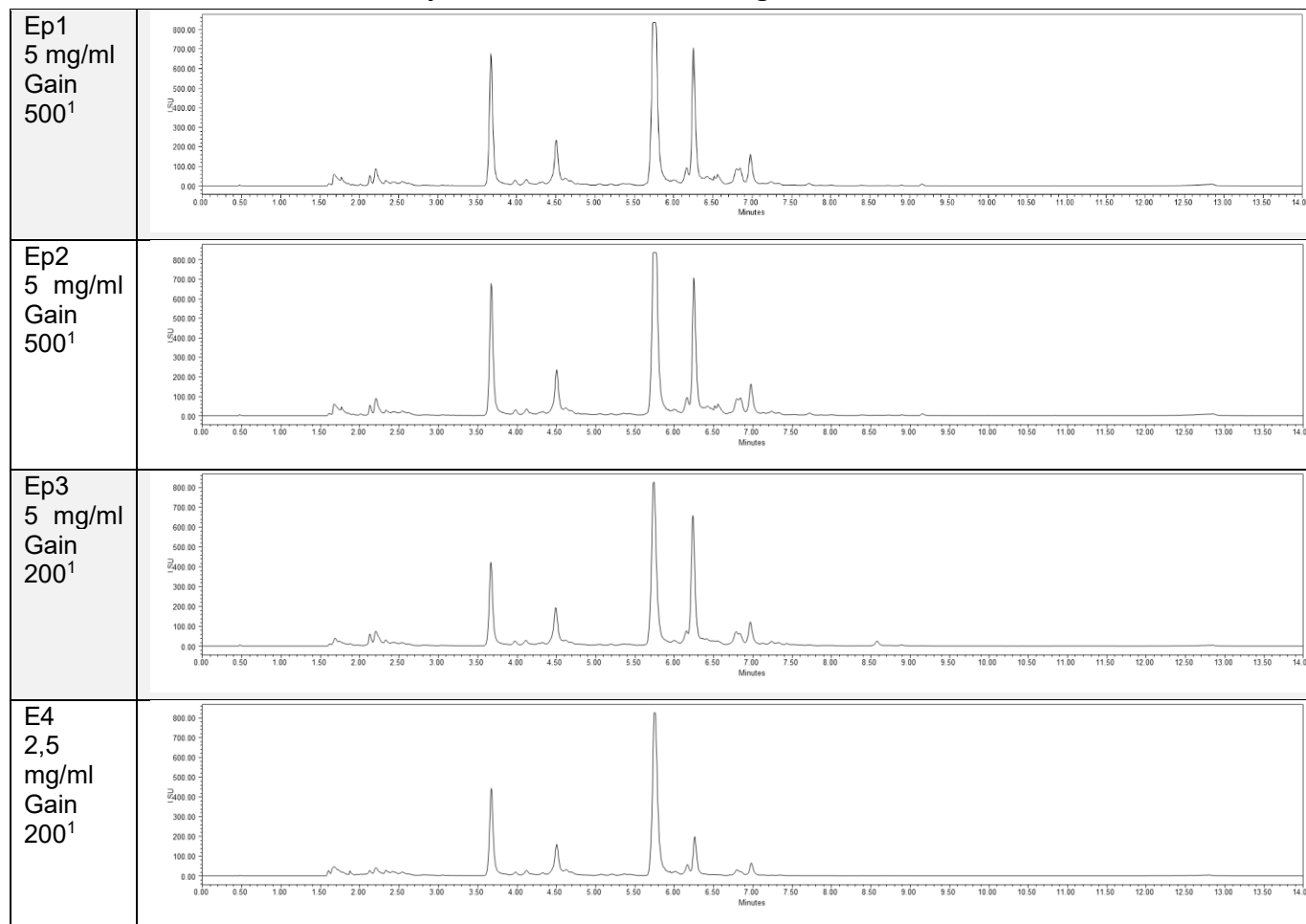
---

1. Cui Y, Kim D-S, Park K-C. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;96(1):79-85.
2. Kim YO, Park HW, Kim JH, Lee JY, Moon SH, Shin CS. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. *Life Sciences*. 2006;79(1):72-80.
3. Szychowski KA, Skóra B, Pomianek T, Gmiński J. *Inonotus obliquus* - from folk medicine to clinical use. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2021;11(4):293-302.
4. Huynh N, Beltrame G, Tarvainen M, Suomela JP, Yang B. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of triterpenoids from chaga sterile conk of *Inonotus obliquus*. *Molecules*. 2022;27(6):1880.
5. Kim J, Yang SC, Hwang AY, Cho H, Hwang KT. Composition of triterpenoids in *Inonotus obliquus* and their anti-proliferative activity on cancer cell lines. *Molecules*. 2020;25(18):4066.
6. Zhao F, Mai Q, Ma J, et al. Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities. *Fitoterapia*. 2015;101:34-40.
7. Liu C, Zhao C, Pan HH, et al. Chemical constituents from *Inonotus obliquus* and their biological activities. *Journal of Natural Products*. 2014;77(1):35-41.
8. Drenkhan R, Kaldmae H, Silm M, et al. Comparative analyses of bioactive compounds in *Inonotus obliquus* conks growing on *Alnus* and *Betula*. *Biomolecules*. 2022;12(9):1178.
9. Gery A, Dubreule C, Andre V, et al. Chaga (*Inonotus obliquus*), a future potential medicinal fungus in oncology? A chemical study and a comparison of the cytotoxicity against human lung adenocarcinoma cells (A549) and human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Integrative cancer therapies*. 2018;17(3):832-843.
10. Zhang X, Bao C, Zhang J. Inotodiol suppresses proliferation of breast cancer in rat model of type 2 diabetes mellitus via downregulation of beta-catenin signaling. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2018;99:142-150.

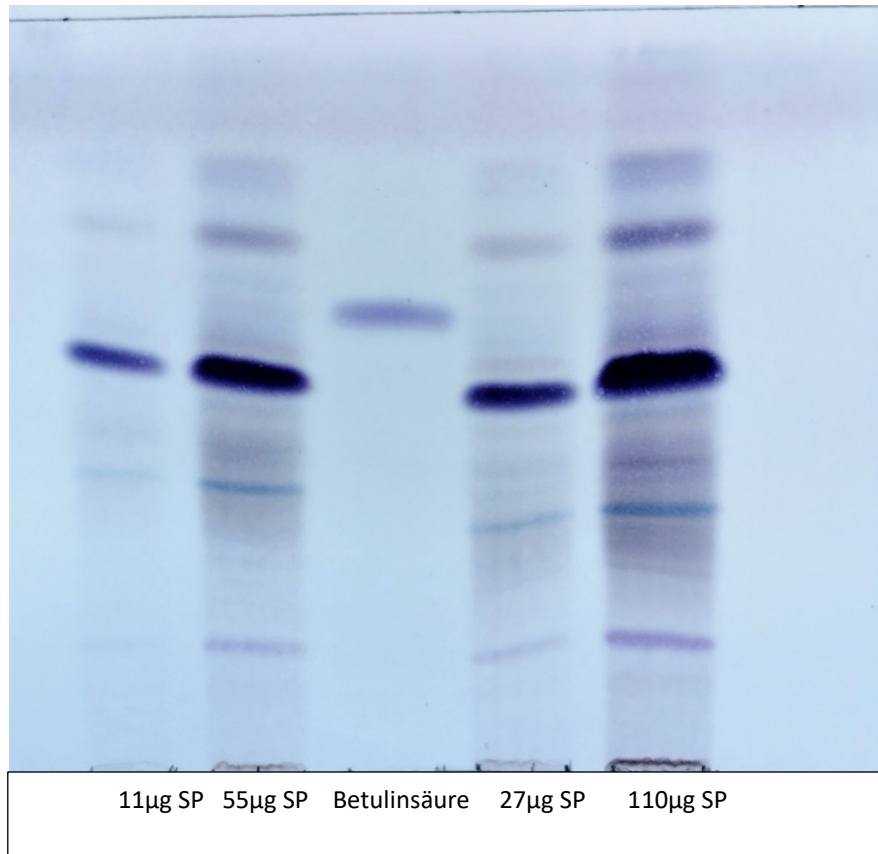
11. Wold CW, Gerwick WH, Wangenstein H, Inngjerdigen KT. Bioactive triterpenoids and water-soluble melanin from *Inonotus obliquus* (Chaga) with immunomodulatory activity. *Journal of Functional Foods*. 2020;71:104025.
12. Bäumer TV. *Isolation and Characterization of TGR-5/RORyt – Modulators from Chaga (Inonotus obliquus)*. Vienna: Pharmaceutical Sciences, Universität Wien; 2022.
13. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(12):993-996.
14. Takeda Y, Kang HS, Freudenberg J, DeGraff LM, Jothi R, Jetten AM. Retinoic acid-related orphan receptor gamma (RORgamma): a novel participant in the diurnal regulation of hepatic gluconeogenesis and insulin sensitivity. *PLOS genetics*. 2014;10(5):e1004331.
15. Cyr P, Bronner SM, Crawford JJ. Recent progress on nuclear receptor ROR $\gamma$  modulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2016;26(18):4387-4393.
16. Xu X, Shen M, Quan L. Stimulatory agents simultaneously improving the production and antioxidant activity of polyphenols from *Inonotus obliquus* by submerged fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2015;176(5):1237-1250.
17. Burmasova MA, Sysoeva MA. Chemical composition and biological activity of the BuOH fraction from chaga melanin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(4):292-294.
18. Hwang BS, Lee IK, Yun BS. Phenolic compounds from the fungus *Inonotus obliquus* and their antioxidant properties. *The Journal of antibiotics*. 2016;69(2):108-110.
19. Taygerly JP, Miller LM, Yee A, Peterson EA. A convenient guide to help select replacement solvents for dichloromethane in chromatography. *Green Chemistry*. 2012;14(11):3025.
20. Gey MH. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. 4. Aufl. 2021 ed. Berlin, Heidelberg2021.

# Anhang

A 1. Tabelle 1 UPC<sup>2</sup> Analyse der im Vorversuch hergestellten Extrakte



**A 2. Abbildung 1 DC der Säurephase (SP) und der Betulinsäure**



**A 3. Tabelle 2- 4 Gradienten der Vorversuche (IO\_LS\_DCM), Flussrate: 4 ml/min**

**Vorversuch 1**

| Zeit (min) | Hexan (%) | DCM (%) | MEOH (%) |    |
|------------|-----------|---------|----------|----|
| 0          |           | 50      | 50       | 0  |
| 20         |           | 0       | 100      | 0  |
| 25         |           | 0       | 100      | 0  |
| 30         |           | 0       | 99       | 1  |
| 90         |           | 0       | 95       | 5  |
| 120        |           | 0       | 80       | 20 |

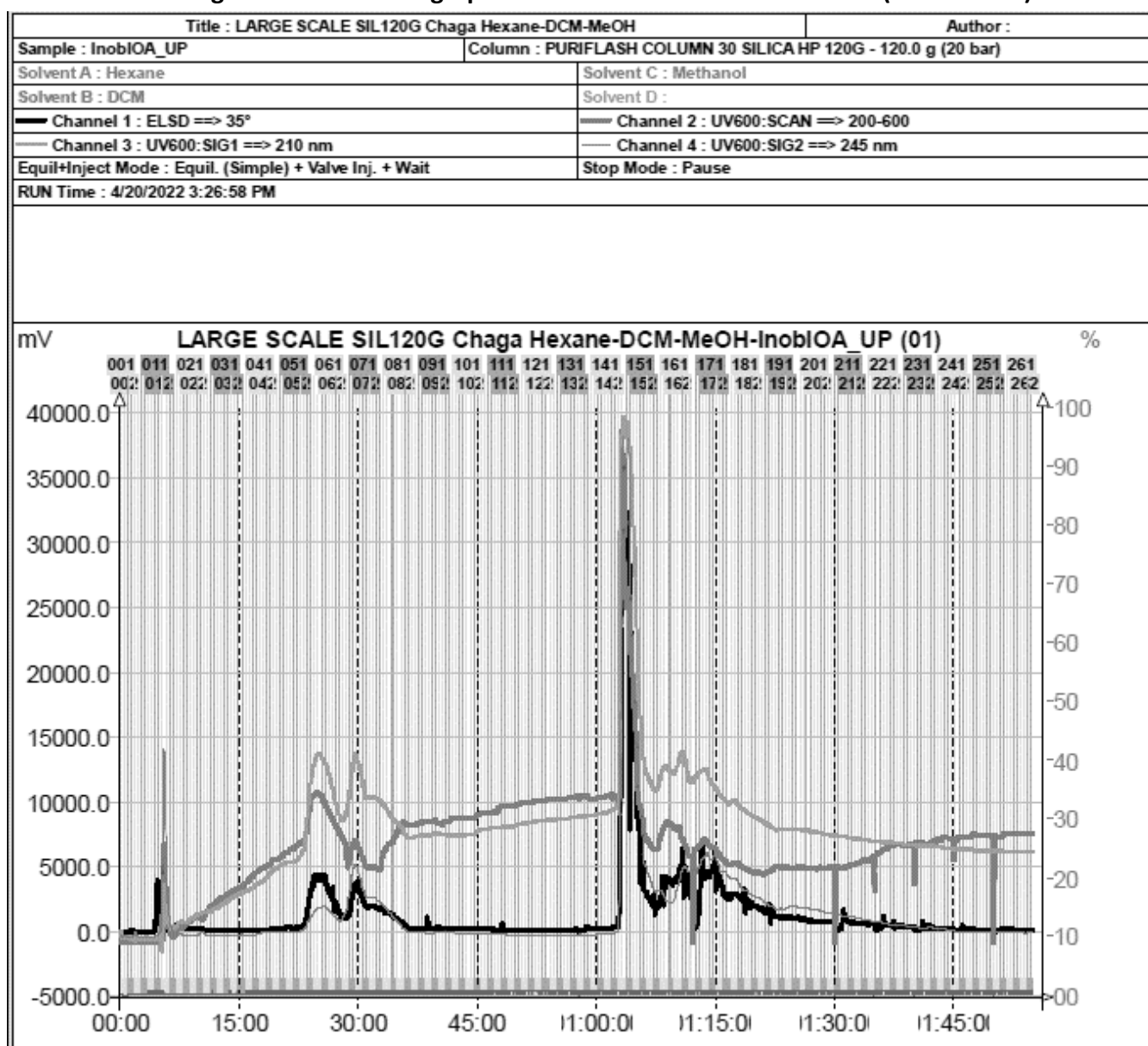
**Vorversuch 2**

| Zeit (min) | Hexan (%) | DCM (%) | MEOH (%) |    |
|------------|-----------|---------|----------|----|
| 0          |           | 60      | 40       | 0  |
| 20         |           | 20      | 80       | 0  |
| 40         |           | 10      | 90       | 0  |
| 50         |           | 0       | 98       | 2  |
| 60         |           | 0       | 98       | 2  |
| 90         |           | 0       | 98       | 2  |
| 91         |           | 0       | 96       | 4  |
| 92         |           | 0       | 80       | 20 |
| 140        |           | 0       | 80       | 20 |

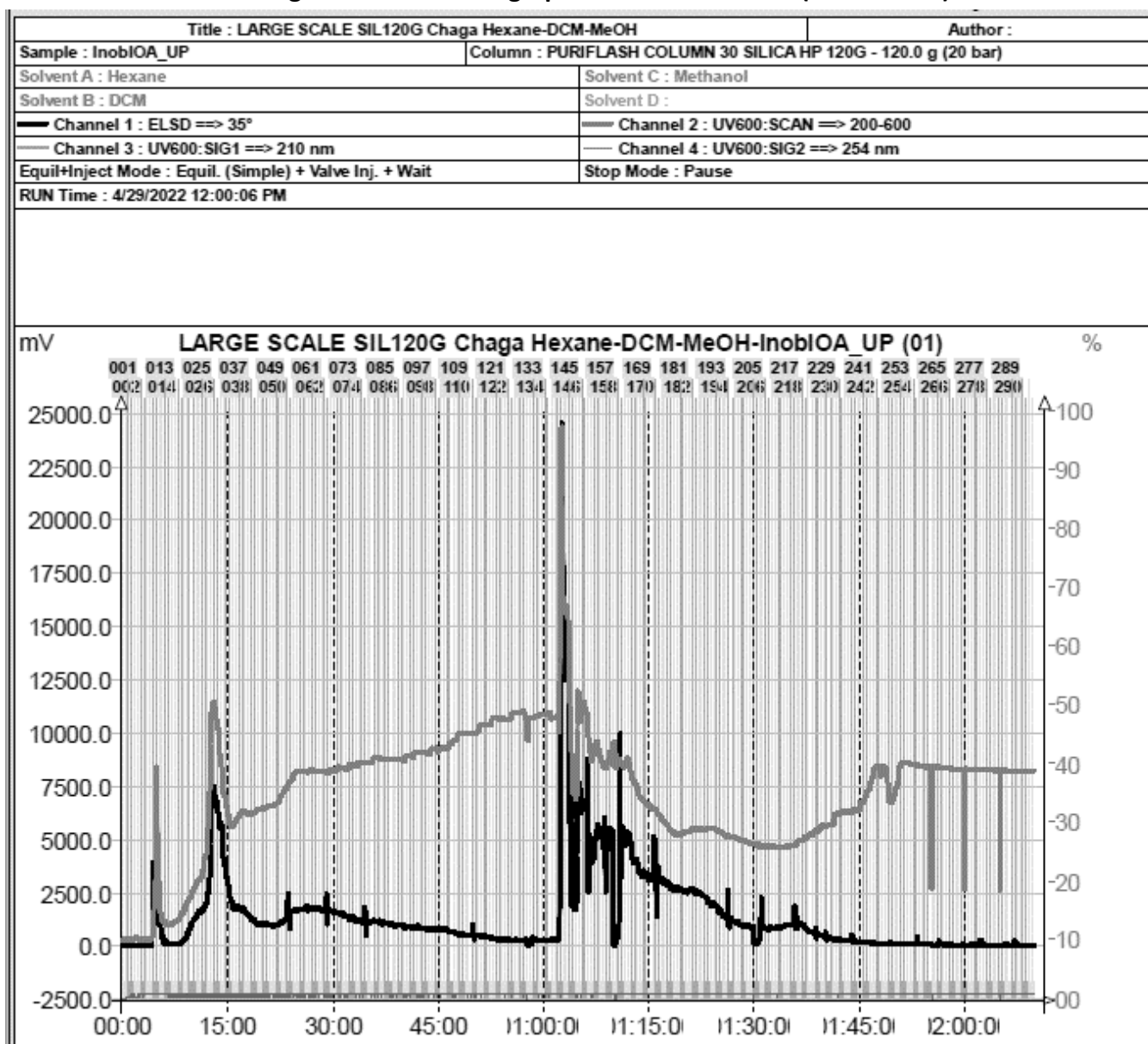
**Vorversuch 3**

| Zeit (min) | Hexan (%) | DCM (%) | MeOH (%) |    |
|------------|-----------|---------|----------|----|
| 0          |           | 50      | 50       | 0  |
| 20         |           | 0       | 100      | 0  |
| 25         |           | 0       | 100      | 0  |
| 30         |           | 0       | 99       | 1  |
| 90         |           | 0       | 95       | 5  |
| 120        |           | 0       | 80       | 20 |

#### A 4. Abbildung 2 Flash Chromatographie des Extraktes im Großmaßstab (1.Durchlauf)



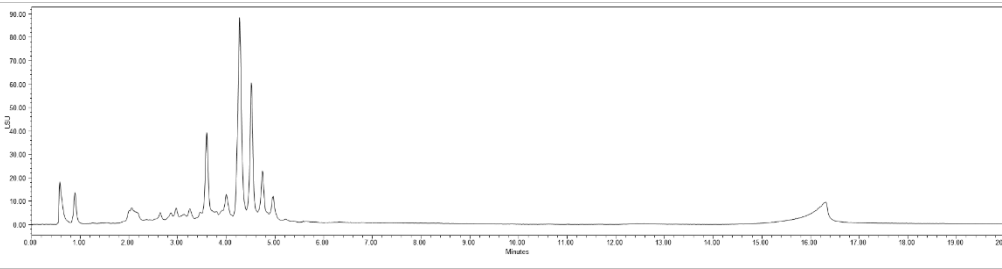
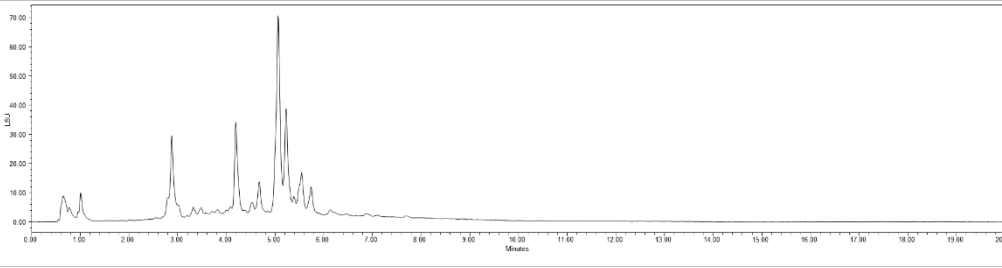
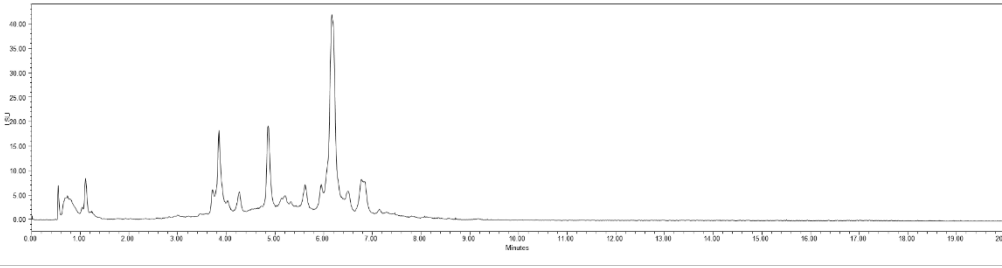
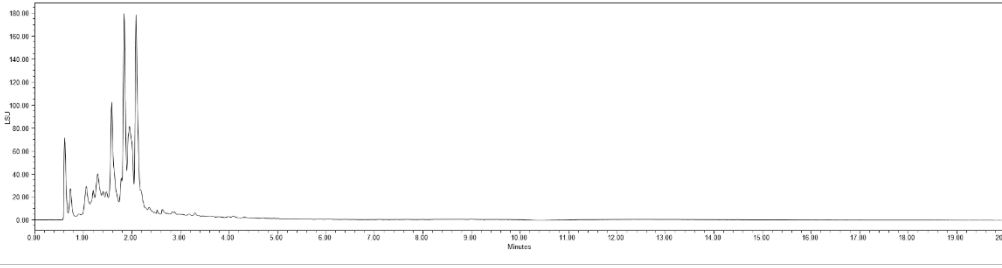
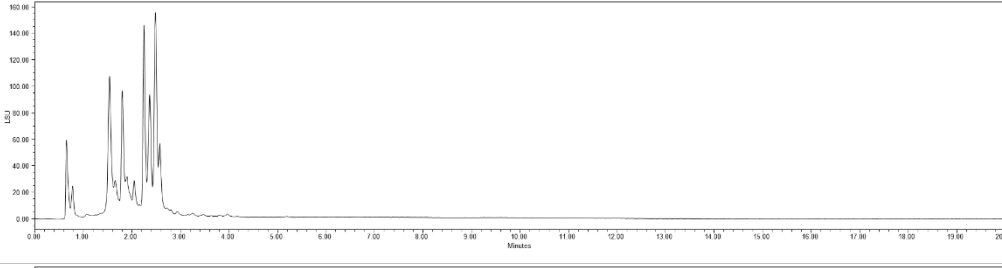
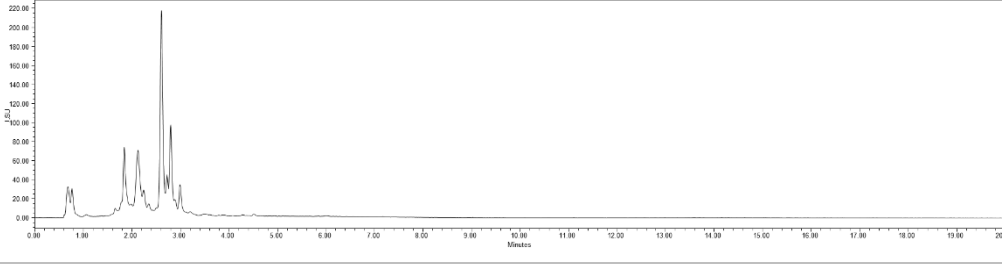
### A 5. Abbildung 3 Flash Chromatographie im Großmaßstab (2.Durchlauf)

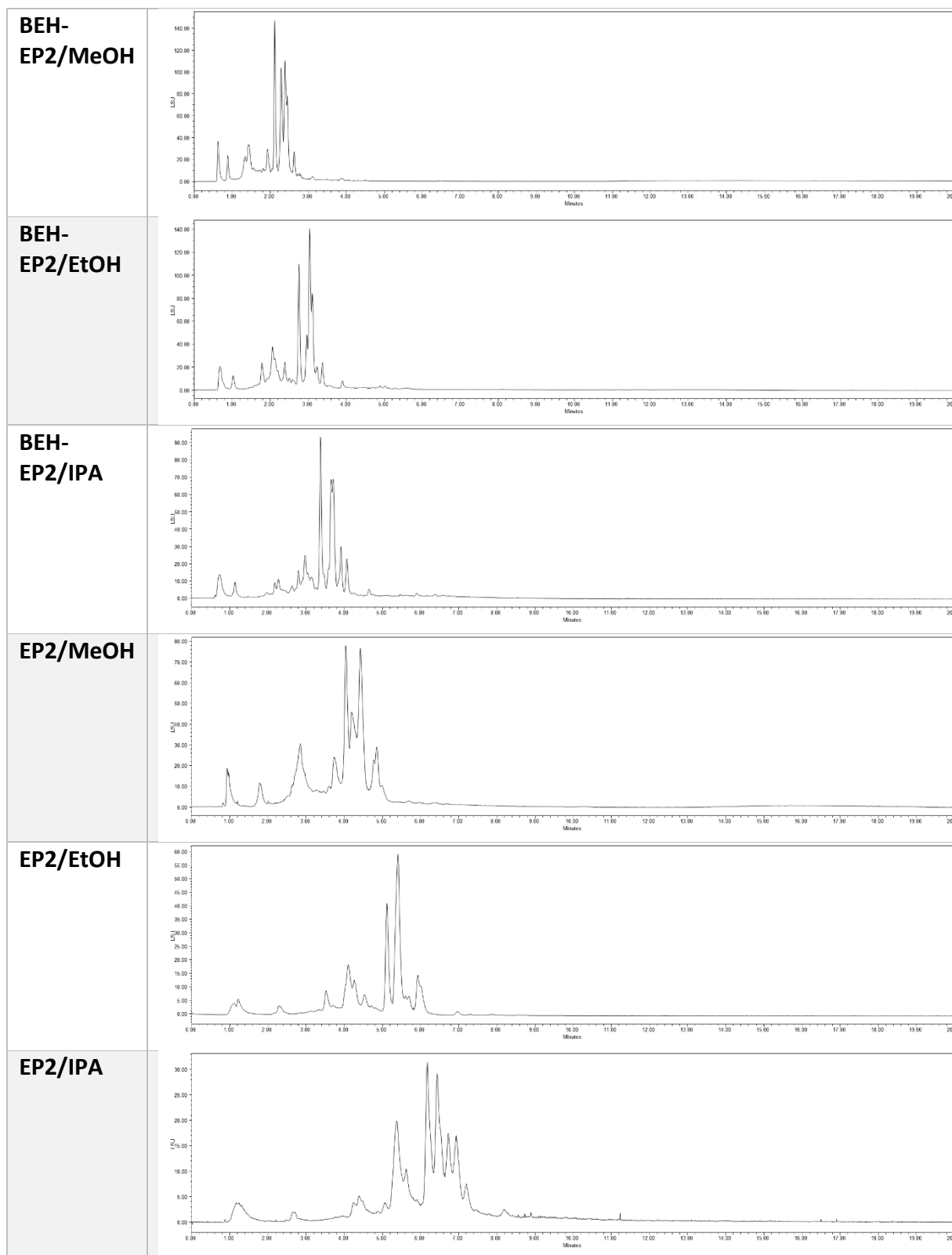


**A 6. Tabelle 5 Zusammenstellung der Flash Chromatographie Fraktionen  
(IO\_LS\_DCM\_12)**

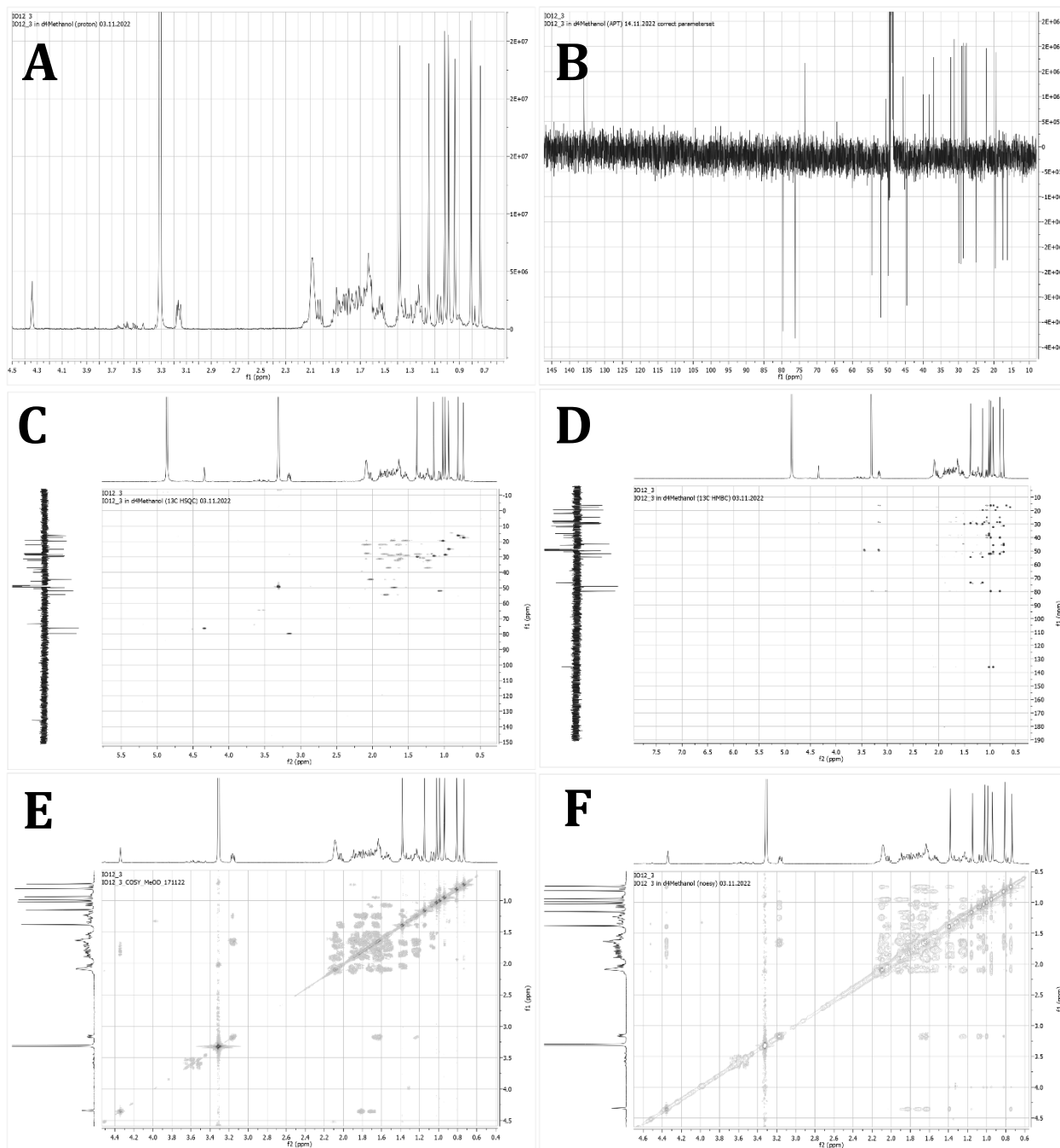
| <b>Fraktion</b> | <b>Eprouvetten 1. Lauf (6g)</b> | <b>Eprouvetten 2. Lauf (7,47g)</b> |
|-----------------|---------------------------------|------------------------------------|
| IO_LS_DCM_1     | 12                              | 10                                 |
| IO_LS_DCM_2     | 13-14                           | 11-12                              |
| IO_LS_DCM_3     | 15                              | 13-14                              |
| IO_LS_DCM_4     | 16-17                           | -                                  |
| IO_LS_DCM_5     | 40-52                           | -                                  |
| IO_LS_DCM_6     | 53-63                           | 20-33                              |
| IO_LS_DCM_7     | 64-81, 91-93, 111               | -                                  |
| IO_LS_DCM_8     | -                               | 34-132                             |
| IO_LS_DCM_9     | -                               | 134-142                            |
| IO_LS_DCM_10    | 144                             | -                                  |
| IO_LS_DCM_11    | 145-151                         | 143 bis 148                        |
| IO_LS_DCM_12    | 152-156                         | 149-153                            |
| IO_LS_DCM_13    | 157-166                         | 155-163                            |
| IO_LS_DCM_14    | 167-173                         | 164-173                            |
| IO_LS_DCM_15    | 174-181                         | 174-182                            |
| IO_LS_DCM_16    | 182-194, 195-216, 217-241       | 182-294                            |

## A 7. Tabelle 6 Säulenscreening der analytischen Säulen mit Fraktion IO\_LS\_DCM\_12

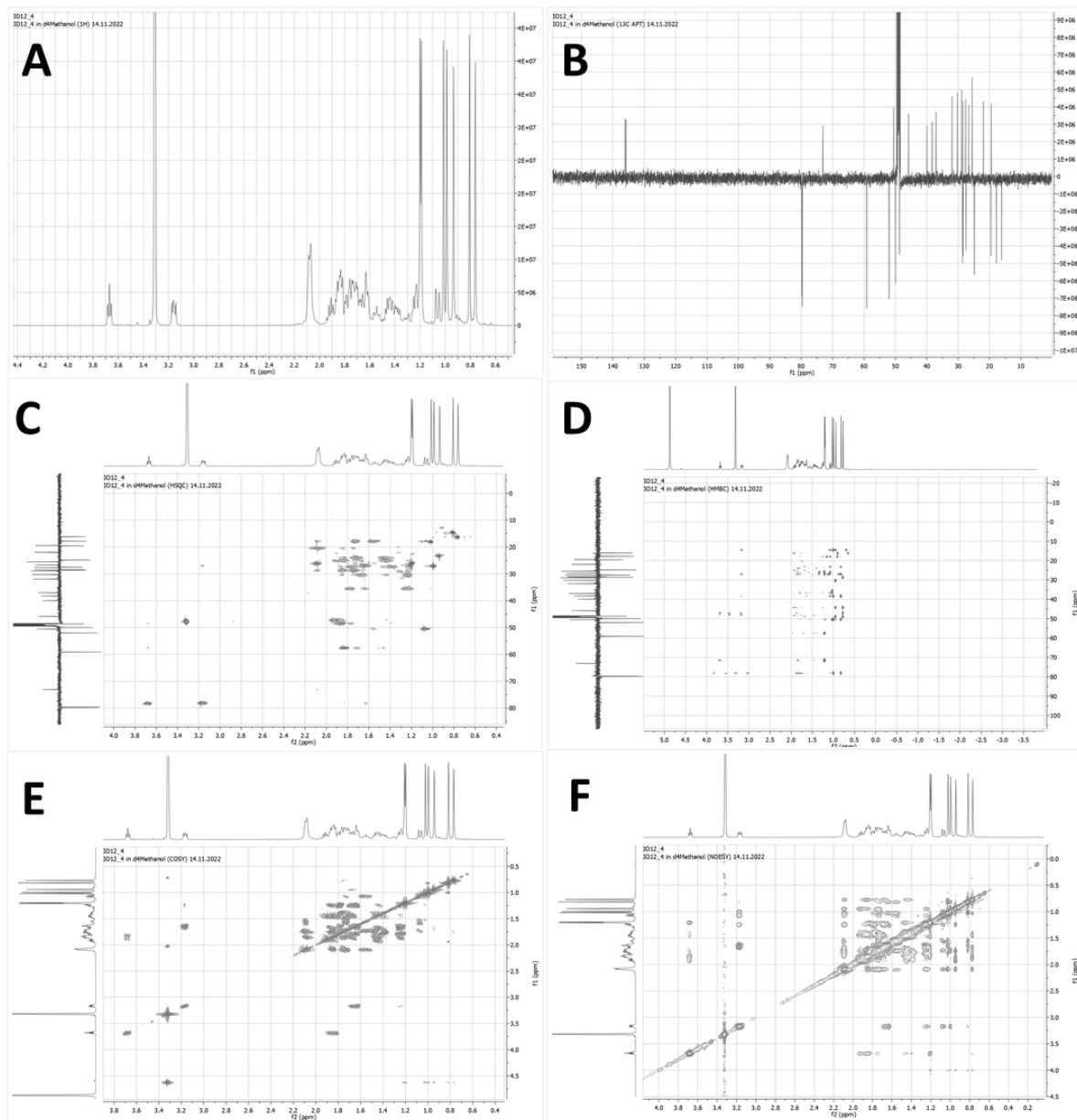
|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1-<br/>AA/MeOH</b> |  <p>Chromatogram for 1-AA/MeOH. The y-axis is labeled 'AU' (Absorbance Units) and ranges from 0.00 to 90.00. The x-axis is labeled 'Minutes' and ranges from 0.00 to 20.00. The chromatogram shows several peaks: a small peak at ~1.0 min, a cluster of peaks between 3.0 and 4.0 min, a major peak at ~4.5 min, another major peak at ~5.0 min, and a small peak at ~16.5 min.</p> |
| <b>1-AA/EtOH</b>      |  <p>Chromatogram for 1-AA/EtOH. The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0.00 to 70.00. The x-axis is labeled 'Minutes' and ranges from 0.00 to 20.00. The chromatogram shows several peaks: a small peak at ~1.0 min, a cluster of peaks between 3.0 and 4.0 min, a major peak at ~4.5 min, another major peak at ~5.0 min, and a small peak at ~16.5 min.</p>                    |
| <b>1-AA/IPA</b>       |  <p>Chromatogram for 1-AA/IPA. The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0.00 to 40.00. The x-axis is labeled 'Minutes' and ranges from 0.00 to 20.00. The chromatogram shows several peaks: a small peak at ~1.0 min, a cluster of peaks between 3.0 and 4.0 min, a major peak at ~4.5 min, another major peak at ~5.0 min, and a small peak at ~16.5 min.</p>                     |
| <b>BEH/MeOH</b>       |  <p>Chromatogram for BEH/MeOH. The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0.00 to 160.00. The x-axis is labeled 'Minutes' and ranges from 0.00 to 20.00. The chromatogram shows several peaks: a small peak at ~1.0 min, a cluster of peaks between 2.0 and 3.0 min, a major peak at ~4.5 min, another major peak at ~5.0 min, and a small peak at ~16.5 min.</p>                   |
| <b>BEH/EtOH</b>       |  <p>Chromatogram for BEH/EtOH. The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0.00 to 160.00. The x-axis is labeled 'Minutes' and ranges from 0.00 to 20.00. The chromatogram shows several peaks: a small peak at ~1.0 min, a cluster of peaks between 2.0 and 3.0 min, a major peak at ~4.5 min, another major peak at ~5.0 min, and a small peak at ~16.5 min.</p>                  |
| <b>BEH/IPA</b>        |  <p>Chromatogram for BEH/IPA. The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0.00 to 220.00. The x-axis is labeled 'Minutes' and ranges from 0.00 to 20.00. The chromatogram shows several peaks: a small peak at ~1.0 min, a cluster of peaks between 2.0 and 3.0 min, a major peak at ~4.5 min, another major peak at ~5.0 min, and a small peak at ~16.5 min.</p>                   |



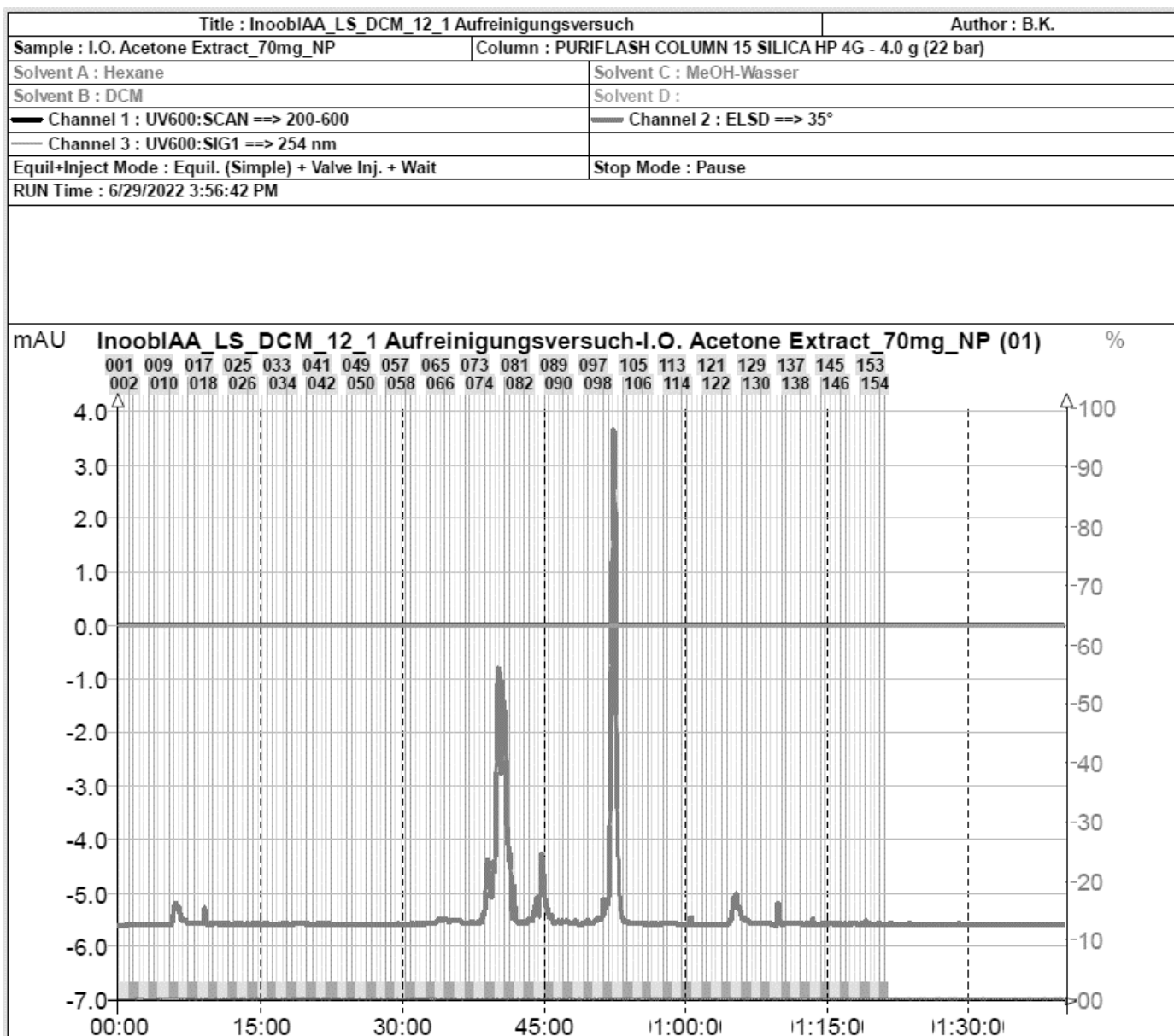
**A 8.**                    **Abbildung 4 NMR-Spektren des Isolats InobLOA\_LS\_DCM\_12\_3\_3 (MeOD, 500 MHz). A  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum, B  $^{13}\text{C}$  APT-Spektrum, C HSQC-Spektrum, D HMBC-Spektrum, E COSY, F NOESY-Spektrum**



**A 9.                   Abbildung 5 NMR-Spektren des Isolats InobIOA\_LS\_DCM\_12\_4\_3 (MeOD, 500 MHz). A  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum, B  $^{13}\text{C}$  APT-Spektrum, C HSQC-Spektrum, D HMBC-Spektrum, E COSY, F NOESY-Spektrum**



# A 10. Abbildung 6 Flash-Chromatographie der Fraktion IO\_LS\_DCM\_12\_1



**A 11. Tabelle 7-8 Gradienten der Vorversuche (IO\_LS\_DCM\_14), Flussrate: 4 ml/min**

**Vorversuch 1**

| <b>Zeit (min)</b> | <b>DCM (%)</b> | <b>EtoAc (%)</b> | <b>MEOH (%)</b> |    |
|-------------------|----------------|------------------|-----------------|----|
| <b>0</b>          |                | 100              | 50              | 0  |
| <b>5</b>          |                | 100              | 100             | 0  |
| <b>65</b>         |                | 0                | 100             | 0  |
| <b>75</b>         |                | 0                | 90              | 10 |
| <b>90</b>         |                | 0                | 95              | 5  |
| <b>120</b>        |                | 0                | 80              | 20 |

**Vorversuch 2**

| <b>Zeit (min)</b> | <b>Hexan (%)</b> | <b>EtoAc (%)</b> | <b>MEOH (%)</b> |    |
|-------------------|------------------|------------------|-----------------|----|
| <b>0</b>          |                  | 50               | 50              | 0  |
| <b>20</b>         |                  | 0                | 100             | 0  |
| <b>25</b>         |                  | 0                | 100             | 0  |
| <b>30</b>         |                  | 0                | 99              | 1  |
| <b>90</b>         |                  | 0                | 95              | 5  |
| <b>120</b>        |                  | 0                | 80              | 20 |

## A 12. Abbildung 7 Flash Chromatographie der Fraktion IO\_LS\_DCM\_14

|                                                         |  |                                                              |  |
|---------------------------------------------------------|--|--------------------------------------------------------------|--|
| Title : InoobIAA_LS_DCM_14_HEXAN                        |  | Author : A.K.                                                |  |
| Sample : I.O. LS_DCM_14_500MG                           |  | Column : PURIFLASH COLUMN 15 SILICA HP 12G - 12.0 g (22 bar) |  |
| Solvent A : Hexane                                      |  | Solvent C : Methanol                                         |  |
| Solvent B : Ethylacetat                                 |  | Solvent D :                                                  |  |
| — Channel 1 : UV600:SCAN ==> 200-600                    |  | — Channel 2 : ELSD ==> 35°                                   |  |
| — Channel 3 : UV600:SIG1 ==> 205 nm                     |  |                                                              |  |
| Equil+Inject Mode : Equil. (Simple) + Valve Inj. + Wait |  | Stop Mode : Pause                                            |  |
| RUN Time : 9/21/2022 3:58:10 PM                         |  |                                                              |  |

