

中国南海红树内生真菌 *Microsphaeropsis* sp. 二氢异香豆素类化合物研究*

魏美燕¹, 胡谷平², 郑彩娟³, 邵长伦³,
王长云³, 周世宁², 余志刚², 林永成²

(1. 广东医学院药学院, 广东 东莞 523808;
2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;
3. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 首次研究了一株南海红树内生真菌 *Microsphaeropsis* sp. 的次级代谢产物。从该菌的培养液的乙酸乙酯相中分离获得8个二氢异香豆素单体化合物, 运用现代波谱技术鉴定其结构分别为4-hydroxy-8-O-methylmellein (1), mellein (2), 4-hydroxymellein (3), 5-hydroxymellein (4), 4-hydroxy-3, 5-dimethylmellein (5), 5-methylmellein (6), 7-hydroxymellein (7), 5-carboxymellein (8)。其中, 化合物1为从自然界发现的新天然产物, 化合物4, 5, 6, 7, 8为首次从海洋真菌 *Microsphaeropsis* sp. 中分离得到的化合物。

关键词: 红树林内生真菌; 次级代谢产物; 二氢异香豆素

中图分类号: O656.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2010) 02-0068-04

Dihydroisocoumarin Derivatives of Mangrove Endophytic Fungus *Microsphaeropsis* sp. Isolated from the South China Sea

WEI Meiyun¹, HU Guping², ZHENG Caijuan³, SHAO Changlun³,
WANG Changyun³, ZHOU Shining², SHE Zhigang², LIN Yongcheng²

(1. School of Pharmacy, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China;
2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
3. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The secondary metabolites of the mangrove endophytic fungus *Microsphaeropsis* sp. from the South China Sea were first studied. Eight dihydroisocoumarin derivatives were isolated from the ethyl acetate extract of the fermentation. Their structures were identified by comprehensive spectroscopic methods as 4-hydroxy-8-O-methylmellein (1), mellein (2), 4-hydroxymellein (3), 5-hydroxymellein (4), 4-hydroxy-3, 5-dimethylmellein (5), 5-methylmellein (6), 7-hydroxymellein (7) and 5-carboxymellein (8). Compound 1 was isolated as a natural compound for the first time and compounds 4, 5, 6, 7, 8 were first isolated from the fungus *Microsphaeropsis* sp.

Key words: mangrove endophytic fungus; secondary metabolites; dihydroisocoumarin

近年来, 红树林内生真菌已经被证明是活性海洋天然产物的重要来源^[1]。由于红树林具有独特的生理生态, 使其具有独特的代谢过程, 代谢产

物和独特的共生菌, 这些共生菌同样能产生极其丰富的新的活性次级代谢产物。本研究组已经对中国南海红树林内生真菌进行了系统的研究, 从中分离

* 收稿日期: 2009-09-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40976077; 30901879; 40776073); 广东医学院青年基金资助项目 (XQ0511); 中国海洋大学海洋药物教育部重点实验室开放基金 (KLMD (OUC) 2008-1)

作者简介: 魏美燕 (1977年生), 女, 讲师; 通讯作者: 余志刚; E-mail: ceshzhg@mail.sysu.edu.cn

获得了一系列结构新颖的或药理活性良好的天然化合物^[2-5]。

继续研究红树内生真菌次级代谢产物, 对一株南海红树内生真菌 *Microsphaeropsis* sp. 在实验室进行人工培养发酵 150 L。本文首次研究了该菌的次级代谢产物, 从培养液的乙酸乙酯提取物中分离得到 8 个二氢异香豆素类化合物, 通过波谱解析以及文献对照, 分别鉴定为 4-hydroxy-8-O-methylmellein (1), Mellein (2), 4-hydroxymellein (3), 5-hydroxymellein (4), 4-hydroxy-3, 5-dimethylmellein (5), 5-Methylmellein (6), 7-hydroxymellein (7), 5-carboxymellein (8), 见图 1。化合物 1 为从自然界发现的新天然产物, 化合物 4, 5, 6, 7, 8 为首次从海洋真菌 *Microsphaeropsis* sp. 中分离得到。

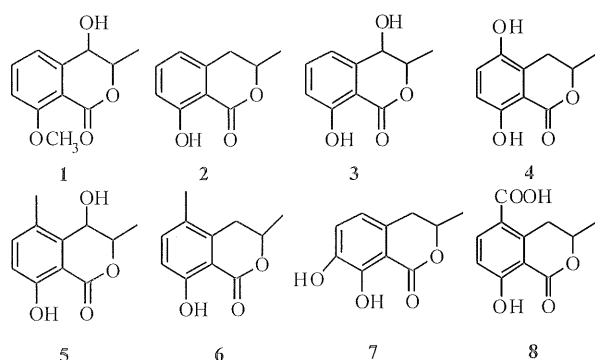


图 1 化合物 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 的结构式

Fig. 1 Structure of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

1 结果与讨论

1.1 结构解析

化合物 1 为无色晶体。由 EI-MS 可知该化合物的相对分子质量为 194, 结合其氢谱和碳谱数据可以确定其分子式为 $C_{11}H_{12}O_4$, 不饱和度为 6。由 1H NMR 谱可知, 该化合物含有一个甲基 δ 1.35 (3H, d, $J=6.3$ Hz), 一个甲氧基 δ 3.97 (3H, s), 两个含有氧原子的次甲基 δ 5.26 (1H, d, $J=3.9$ Hz), 4.14 (1H, dq, $J=6.3, 3.9$ Hz)。此外, 根据三组氢信号 7.60 (1H, t, $J=8.1, 7.5$ Hz), 7.06 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 6.92 (1H, d, $J=8.1$ Hz) 的化学位移和耦合常数可知化合物 1 中含有一个 1, 2, 3 三取代的苯环结构。碳谱中, 化学位移在 δ 160.6 (s), 150.7 (s), 130.0 (s), 129.2 (d), 120.6 (d), 113.6 (s) 的碳为 sp^2 杂化的碳, 结合其氢谱可以确定这 6 个碳为苯环上的碳信号, 共占去 4 个不饱和度, 而化学位移在 δ 175.2 (s), 的碳为酯羰基碳信号, 则需要占掉 1 个不饱和度, 这样分

子中还剩下 2 个不饱和度, 去掉 1 个苯环, 该结构中应该还含有 1 个环。通过以上波谱数据分析及其与相关文献对照后发现该化合物与 4-hydroxy-8-O-methylmellein 非常相似^[6], 波谱数据基本吻合, 由此可以确定化合物 1 的结构。化合物 1 为首次从自然界发现的新化合物, 文献曾作为合成产品被报道过, 本文还首次报道了其碳谱数据。

化合物 2 为无色晶体。根据 EI-MS 可以确定该化合物的相对分子质量为 178, 结合其氢谱和碳谱数据可以确定其分子式为 $C_{10}H_{10}O_3$, 不饱和度为 6。由 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) 可知, 该化合物含有一个形成分子内氢键的酚羟基 δ 11.01 (1H, s, -OH); 三组芳香氢信号 7.37 (1H, d, d, 7.8, 7.2 Hz), 6.86 (1H, d, 7.8 Hz), 6.68 (1H, d, 7.2 Hz), 根据其耦合常数及峰型可确定为 1, 2, 3 三取代苯环信号; δ 4.74 (1H, m) 为连氧原子的次甲基信号; 此外还有一个亚甲基 δ 2.93 (2H, d, 7.2 Hz) 和一个甲基 δ 1.53 (1H, d, 5.7 Hz)。由 ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) 可知, 该化合物含有一个酯羰基 δ 169.7 (s), 一个三取代的苯环 161.9 (s), 139.2 (s), 135.9 (d), 117.7 (d), 116.0 (d), 108.2 (s), 一个连氧次甲基 76.1 (d), 一个亚甲基 34.6 (t) 和一个甲基 20.8 (q)。根据上述核磁数据分析, 化合物 2 跟化合物 1 具有类似的结构骨架, 经与相关文献对照后发现该化合物 2 与 mellein^[7] 非常相似, 波谱数据基本吻合, 由此可以确定化合物 2 的结构为 mellein。

根据同上的方法, 化合物 3, 4, 5, 6, 7, 8 分别被鉴定为 4-hydroxymellein^[8], 5-hydroxymellein^[9], 4-hydroxy-3, 5-dimethylmellein^[10], 5-methylmellein^[11], 7-hydroxymellein 和 5-carboxymellein^[12-13]。

2 实验部分

2.1 试剂与实验仪器

美国 Varian 公司 INOVA 300NB 超导核磁共振仪; VG ZAB-HS 质谱仪; 北京泰克仪器公司的 X-4 数字显示显微熔点测试仪。

所用试剂均为广州化学试剂厂生产, 化学纯, 溶剂经重蒸后使用。柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产的 200 ~ 300 目硅胶, 硅胶 H, 薄层硅胶 GF₂₅₄。

2.2 菌种及其测试菌

海洋真菌 *Microsphaeropsis* sp. 从湛江红树林植物分离得到, 菌种由中山大学生命科学院提供, 保

存在 4 °C 下的玉米海水琼脂培养基中。

2.3 菌种发酵培养

采用悬浮培养方式, 发酵培养基 (*w*%) 为葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.2, 酵母膏 0.1, 粗海盐 0.25, pH 7.0。500 mL 三角瓶, 内装培养液 300 mL, 经 121 °C (0.1 MPa) 高温灭菌 25 min 后在超净工作台上接种。共接种 150 L, 28 °C 静置培养 30 d。

2.4 提取分离

发酵液用纱布过滤, 菌体和培养液分别收集, 培养液由 150 L 浓缩至 3 L 后, 用相同体积的乙酸乙酯提取。乙酸乙酯提取液浓缩后所得浸膏进行硅胶柱层析, 以石油醚—乙酸乙酯—甲醇梯度淋洗。收集各组分再经反复柱层析, 制备薄层层析和重结晶纯化后得到化合物 **1** (12.5 mg), **2** (120.6 mg), **3** (5.3 mg), **4** (8.5 mg), **5** (9.6 mg), **6** (11.2 mg), **7** (5.0 mg) 和 **8** (8.0 mg)。

2.5 化合物的物理和波谱数据

4-Hydroxy-8-O-methylmellein (**1**): 无色晶体。EI-MS⁺, *m/z*: 194 [M]⁺。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.60 (1H, t, 8.1, 7.5 Hz), 7.06 (1H, d, 7.5 Hz), 6.92 (1H, d, 8.1 Hz), 5.26 (1H, d, 3.9 Hz), 4.14 (1H, dq, 6.3, 3.9 Hz), 3.97 (3H, s), 1.35 (3H, d, 6.3 Hz)。¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 175.2 (s), 160.6 (s), 150.7 (s), 130.0 (s), 129.2 (d), 120.6 (d), 113.6 (s), 81.4 (d), 77.0 (d), 25.7 (q)。

Mellein (**2**): 无色晶体。θ_{mp} 55 ~ 57 °C。EI-MS⁺ *m/z*: 178 [M]⁺, 165, 136。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 11.01 (1H, s, -OH), 7.37 (1H, t, 7.8, 7.2 Hz), 6.86 (1H, d, 7.8 Hz), 6.68 (1H, d, 7.2 Hz), 4.74 (1H, m), 2.93 (2H, d, 7.2 Hz), 1.53 (1H, d, 5.7 Hz)。¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 169.7 (s), 161.9 (s), 139.2 (s), 135.9 (d), 117.7 (d), 116.0 (d), 108.2 (s), 76.1 (d), 34.6 (s), 20.8 (q)。

4-Hydroxymellein (**3**): 无色晶体。EI-MS⁺ *m/z*: 208 [M]⁺。¹H NMR (300 MHz, Acetone-d₆) δ: 11.10 (1H, s, -OH), 7.56 (1H, t, 8.1, 7.5 Hz), 6.96 (1H, d, 7.5 Hz), 6.93 (1H, d, 8.1 Hz), 4.80 (1H, dq, 6.3, 3.9 Hz), 4.66 (1H, d, 3.9 Hz), 1.51 (1H, d, 6.3 Hz)。¹³C NMR (75 MHz, Acetone-d₆) δ: 167.3 (s), 147.7 (s), 141.7 (d), 123.9 (d), 122.4 (d), 121.8 (s), 112.4 (s), 84.0 (d), 71.7 (d), 20.9 (q)。

5-Hydroxymellein (**4**): 无色晶体。ESI-MS⁻ *m/z*:

193 [M]⁻。¹H NMR (300 MHz, Acetone-d₆) δ: 10.56 (1H, s, -OH), 8.26 (1H, s, -OH), 7.10 (1H, d, 9.0 Hz), 6.69 (1H, d, 9.0 Hz), 4.75 (1H, m), 3.21 (1H, dd, 16.8, 3.3 Hz), 2.64 (1H, dd, 16.8, 11.4 Hz), 1.50 (1H, d, 6.3 Hz)。

4-Hydroxy-5-methylmellein (**5**): 无色晶体。θ_{mp} 243 ~ 245 °C。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 10.97 (1H, s, -OH), 7.38 (1H, d, 9.0 Hz), 6.94 (1H, d, 9.0 Hz), 4.80 (1H, dq, 7.0, 2.0 Hz), 4.64 (1H, d, 2.0 Hz), 2.36 (3H, s), 1.81 (1H, brs), 1.63 (3H, d, 7.0 Hz)。¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 169.8 (s), 160.4 (s), 138.9 (d), 137.6 (s), 126.2 (s), 118.1 (d), 106.7 (s), 78.0 (d), 64.4 (d), 17.1 (q), 16.3 (q)。

5-Methylmellein (**6**): 无色晶体。θ_{mp} 125 ~ 126 °C。FAB-MS⁺ *m/z*: 193 [M + H]⁺, 176, 165。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 10.97 (1H, s, -OH), 7.23 (1H, d, 10.5 Hz), 6.82 (1H, d, 10.5 Hz), 4.68 (1H, m), 2.97 (1H, d, 3.0 Hz), 2.71 (1H, dd, 16.0, 12.0 Hz), 2.19 (3H, s), 1.55 (3H, d, 6.0 Hz)。¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 170.3 (s), 160.5 (s), 137.9 (d), 137.0 (s), 124.9 (s), 115.7 (d), 108.1 (s), 75.4 (d), 31.9 (t), 20.9 (q), 18.0 (q)。

7-Hydroxymellein (**7**): 无色晶体。θ_{mp} 81 ~ 82 °C。FAB-MS⁺ *m/z*: 195 [M + H]⁺, 177, 165, 136。¹H NMR (300 MHz, Acetone-d₆) δ: 11.09 (1H, s), 8.05 (1H, s), 7.04 (1H, d, 7.2 Hz), 6.66 (1H, d, 7.2 Hz), 4.77 (1H, m), 2.95 (2H, d, 6.3 Hz), 1.48 (3H, d, 6.3 Hz)。¹³C NMR (75 MHz, Acetone-d₆) δ: 173.0 (s), 79.9 (d), 36.4 (t), 111.2 (s), 120.3 (d), 124.1 (d), 147.2 (s), 152.8 (s), 132.6 (s, C-9), 23.0 (q, C-11)。

5-Carboxymellein (**8**): 无色晶体。θ_{mp} 190 ~ 220 °C。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.95 (1H, brs), 11.67 (1H, s), 8.07 (1H, d, 9.0 Hz), 6.96 (1H, d, 9.0 Hz), 4.76 (1H, m), 3.80 (1H, dd, 18.0, 3.5 Hz), 3.01 (1H, dd, 18.0, 12.0 Hz), 2.10 (1H, dd, 18.0, 12.0 Hz), 1.44 (3H, d, 6.5 Hz)。¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 169.2 (s), 166.7 (s), 163.8 (s), 143.2 (s), 138.1 (d), 119.6 (s), 115.3 (d), 108.9 (s), 75.1 (d), 32.0 (t), 20.1 (q)。

参考文献:

- [1] BLUNT J W, COPP B R, MUNRO M H G, et al. Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2006, 23: 26.
- [2] LIN Y C, SHAO Z Y, JIANG G C, et al. Penicillazine, a unique quinolone derivative with 4H-5,6-dihydro-1,2-oxazine ring system from the marine fungus *Penicillium* sp. (Strain 386) from the South China Sea [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56: 9607.
- [3] 邵长伦, 胡谷平, 张秀丽, 等. 南海红树林内生真菌 B60 中的一个新原儿茶酸衍生物[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2008, 47(5), 133.
- [4] 邵长伦, 胡谷平, 杨瑞云, 等. 南海红树林内生真菌 B77 次级代谢产物研究[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2008, 47(1), 56.
- [5] SHAO C L, WANG C Y, GU Y C, et al. Revised structure of penicillazine and preparation, bioactivities of penicillazine derivatives [J]. *Lett Org Chem*, 2009, 6(5): 387.
- [6] CHATTERJEA J N, SINHA N D, BHAKTA C. Use of diazoethane in the synthesis of isocoumarins. Part II [J]. *J Indian Chem Soc*, 1979, 56(5): 515.
- [7] HOLKER J S E, SIMPSON T J. Studies on fungal metabolites. Part 2. Carbon-13 nuclear magnetic resonance biosynthetic studies on pentaketide metabolites of *Aspergillus melleus*: 3-(1',2'-epoxypropyl)-5,6-dihydro-5-hydroxy-6-methylpyran-2-one and mellein [J]. *J Chem Soc, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, 1981 (5): 1397.
- [8] VENKATASUBBAIAH P, CHILTON W S. Phytotoxins of plant pathogens. Part IV. Phytotoxins of *Botryosphaeria obtusa* [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53(6): 1628.
- [9] HARWOOD L M. Trifluoroacetic acid-catalyzed Claisen rearrangement of 5-allyloxy-2-hydroxybenzoic acid and esters: an efficient synthesis of mellein [J]. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1982 (19): 1120.
- [10] KOKUBUN T, VEITCH N C, BRIDGE P D, et al. Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(5): 779.
- [11] BALLIO A, BARCELLONA S, SANTURBANO B. 5-Methylmellein, a new natural dihydroisocoumarin [J]. *Tetrahedron Lett*, 1966 (31): 3723.
- [12] SIDDIQUI S, MAHMOOD T, SIDDIQUI B S, et al. Non-terpenoidal constituents from *Azadirachta indica* [J]. *Planta Med*, 1988, 54(5): 457.
- [13] HUANG Z J, SHAO C L, CHEN Y G, et al. A new isocoumarin from mangrove endophytic fungus (No. dz17) on the South China Sea coast [J]. *Chem Nat Compd*, 2007, 43(6): 655.

(上接第 67 页)

参考文献:

- [1] 阎磊, 徐淑珍, 李秋怡, 等. 20 种菝葜近缘种的薯蓣皂苷元含量测定[J]. *中药材*, 2006, 29(11): 63-73.
- [2] 余晓红. HPLC 测定刺蒺藜总皂苷中的薯蓣皂苷元[J]. *华西药学杂志*, 2008, 23(4): 474-475.
- [3] 阳波, 李湘斌. HPLC 测定地奥心血康胶囊中薯蓣皂苷元的含量[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(7): 506-506.
- [4] 林(吉吉), 王秦福, 张辉, 等. HPLC 法比较组培与野生穿龙薯蓣中薯蓣皂苷元的含量[J]. *吉林中医药*, 2007, 27(5): 15-25.
- [5] 徐江滔, 汤谷平, 吴敏. 薄层扫描法测定麦冬皂苷类成分[J]. *药物分析杂志*, 1997, 17(3): 164-166.
- [6] 王光忠, 刘伟伟, 葛如斌, 等. 分光光度法测定盾叶薯蓣总皂苷的含量[J]. *湖北中医学院学报*, 2008, 10(2): 44-45.
- [7] 艾又生, 刘力强, 徐楚鸿, 等. 比色法测定胃乐益冲剂中薯蓣皂苷元的含量[J]. *医药导报*, 2005, 24(7): 626-726.
- [8] 黄宝美, 姚程炜, 边清泉, 等. 丁公藤中东茛菪内酯含量的高效毛细管电泳检测[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2008, 47(5): 71-73.
- [9] 林伟丰, 康信煌, 陈缙光, 等. 毛细管电泳法测定血清中的双氯芬酸钠[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2005, 44(6): 58-60.