

繁茂膜海绵来源青霉属真菌 *Penicillium* sp. HPQJ10 的化学成分研究杨君泽^{1,2}, 何 山^{1,2}, 丁立建^{1,2*}

1. 宁波大学 浙江省海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211

2. 宁波大学 李达三叶耀珍伉俪李本俊海洋生物医药研究中心, 浙江 宁波 315211

摘要: 目的 研究繁茂膜海绵 *Hymeniacidon perleve* 来源青霉属真菌 *Penicillium* sp. HPQJ10 的次级代谢产物。方法 利用正相硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 以及半制备高效液相等色谱分离手段进行分离纯化, 根据波谱学数据鉴定化合物结构。结果 从发酵产物中共分离到 14 个单体化合物, 分别鉴定为 *N*-[(*Z*)-2-(4-hydroxyphenyl) ethenyl] formamide (1)、2,4-dimethoxyphenyl acetate (2)、6,8,5',6'-四羟基-3'-甲基黄酮 (3)、4-羟基苯乙酸 (4)、cyclo-(*L*-Pro-*L*-Val) (5)、cyclo-(*L*-Pro-*L*-Leu) (6)、邻苯二甲酸二异丁酯 (7)、邻苯二甲酸二丁酯 (8)、7-hydroxy-2-(2-hydroxypropyl)-5-methyl chromone (9)、2-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-hydroxybenzyl)-1,2,4-triazole (10)、(22*E*,24*R*)-麦角甾-5,7,22-三烯-3 β -醇 (11)、cyclo-(*Leu*-Pro-*Ile*-Pro) (12)、2,4-二甲氧基苯甲酸 (13)、3-甲氧基苯酚 (14)。结论 除化合物 1、3、10、11 以外, 其他化合物均为首次从该菌种中分离得到。

关键词: 繁茂膜海绵; 青霉属真菌; 邻苯二甲酸二异丁酯; 2,4-二甲氧基苯甲酸; 3-甲氧基苯酚

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)24-5105-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.008

Study on chemical constituents from sponge-derived fungus *Penicillium* sp. HPQJ10YANG Jun-ze^{1,2}, HE Shan^{1,2}, DING Li-jian^{1,2}

1. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315211, China

2. Li Dak Sum Yip Yio Chin Kenneth Li Marine Biopharmaceutical Research Center, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: **Objective** To study the secondary metabolites of sponge-derived fungus *Penicillium* sp. HPQJ10. **Methods** The compounds were isolated and purified by chromatographic methods on silica gel, Sephadex-LH20 columns and semi-prep HPLC. The structures were established on the basis of spectroscopic data interpretation. **Results** Forteen compounds were isolated and identified as *N*-[(*Z*)-2-(4-hydroxyphenyl) ethenyl] formamide (1), 2,4-dimethoxyphenyl acetate (2), 6,8,5',6'-tetrahydroxy-3'-methylflavone (3), 4-hydroxyphenylacetic acid (4), cyclo-(*L*-Pro-*L*-Val) (5), cyclo-(*L*-Pro-*L*-Leu) (6), diisobutyl phthalate (7), dibutyl phthalate (8), 7-hydroxy-2-(2-hydroxypropyl)-5-methyl chromone (9), 2-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-hydroxybenzyl)-1,2,4-triazole (10), (22*E*,24*R*)-ergosterol-5,7,22-trien-3 β -ol (11), cyclo-(*Leu*-Pro-*Ile*-Pro) (12), 2,4-dimethoxybenzoic acid (13), and 3-methoxyphenol (14). **Conclusion** Except for compounds 1, 3, 10, and 11, other compounds are isolated from *Penicillium* sp. for the first time.

Key words: *Hymeniacidon perleve*; sponge-derived fungus; diisobutyl phthalate; 2,4-dimethoxybenzoic acid; 3-methoxyphenol

近年来,随着陆生微生物资源的不断研究和开发,从中发现全新结构或作用机制独特的天然产物的概率也越来越小。由于海洋生态环境具有缺氧、高盐、高压、寡营养、低光照等特点,使海洋微生物具有独特的生长途径和代谢机制,从而能产生更多结构新颖、活性独特的天然产物^[1-2]。因此,从海洋微生物资源中发掘药物先导化合物已成为新药研

发的一个重要发展趋势。作为微生物的重要组成部分,海洋真菌已成为新的海洋生物活性物质的重要来源,并受到天然产物研究工作者的广泛关注^[3]。据不完全统计,2010年1月至2013年2月期间已经有895个海洋微生物来源的新化合物被报道,其中576个来源于海洋真菌,占64.36%。这足以说明海洋来源真菌确实是产生新化合物的巨大宝库^[4]。

收稿日期: 2017-07-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41776168, 41706167); 浙江省教育厅科研项目资助 (Y201737271)

作者简介: 杨君泽 (1992—), 男, 河南信阳人, 在读硕士研究生, 主要研究方向为海洋天然药物。E-mail: 15825576582@163.com

*通信作者 丁立建 (1987—), 男, 浙江台州人, 博士, 讲师, 主要研究方向为海洋微生物药物。E-mail: dinglijian@nbu.edu.cn

海洋真菌来源的新化合物主要集中在海藻、海绵和红树林等 3 大海洋生物栖息地, 它们占海洋真菌来源次级代谢产物的 56%, 其中海绵来源的就占近 20%^[5], 因此海绵来源真菌成为天然产物的重要来源。为了发掘海绵来源真菌的活性物质, 本课题组对东海海绵来源的真菌进行筛选, 发现该菌株次级代谢产物非常丰富。因此, 本实验对该菌株的次级代谢产物进行深入研究, 通过多种色谱分离方法从中分离得到 14 个化合物, 分别鉴定为 *N*-[(*Z*)-2-(4-hydroxyphenyl) ethenyl] formamide (1)、2,4-dimethoxyphenyl acetate (2)、6,8,5',6'-四羟基-3'-甲基黄酮 (6,8,5',6'-tetrahydroxy-3'-methylflavone, 3)、4-羟基苯乙酸 (4-hydroxyphenylacetic acid, 4)、cyclo-(*L*-Pro-*L*-Val) (5)、cyclo-(*L*-Pro-*L*-Leu) (6)、邻苯二甲酸二异丁酯 (diisobutyl phthalate, 7)、邻苯二甲酸二丁酯 (dibutyl phthalate, 8)、7-hydroxy-2-(2-hydroxypropyl)-5-methylchromone (9)、2-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-hydroxybenzyl)-1,2,4-triazole (10)、(22*E*,24*R*)-麦角甾-5,7,22-三烯-3 β -醇 [(22*E*,24*R*)-ergosterol-5,7,22-trien-3 β -ol, 11]、cyclo-(Leu-Pro-Ile-Pro) (12)、2,4-二甲氧基苯甲酸 (2,4-dimethoxybenzoic acid, 13)、3-甲氧基苯酚 (3-methoxyphenol, 14)。化合物 2、4~9、12~14 为首次从该菌种中分离得到。

1 仪器与材料

Bruker Avance 400 MHz 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); 超净工作台 (AirTech 苏净安泰空气

技术有限公司); 超低温冰箱 (海尔集团); 高压蒸汽灭菌锅 (三洋电机株式会社); 电热鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司); 恒温培养箱 (宁波江南仪器厂); Biometra PCR 仪 (德国耶拿分析仪器有限公司); JUNYI 600 君意电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); Gentrifuge 5415R Eppendorf 离心机、Eppendorf 恒温培养摇床 (德国艾本德股份有限公司); 凝胶成像分析系统 (Bioshine Gel×1850, 上海欧翔科学仪器有限公司); 旋转蒸发仪 (郑州长城科工贸有限公司); 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 正相硅胶 200~300 目 (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20; 色谱级甲醇 (CNW, 上海安谱实验科技股份有限公司); 工业醋酸乙酯; 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 菌株来源及纯化

菌株分离自浙江舟山东极岛海域采集的繁茂膜海绵 *Hymeniacidon perle*。取海绵组织 1 g, 加入 9 mL 无菌水, 使用涡旋振荡器震荡 5 min 后得到悬浊液。使用常规的稀释涂布法涂布于 12 种分离培养基 (培养基中都添加了质量浓度为 100 mg/mL 的氯霉素和链霉素), 见表 1^[6], 28 °C 恒温培养。挑取形态差异较大的单菌落, 划线培养, 纯化为单一菌落后 4 °C 冰箱平板保存。通过菌落大小、颜色等外在特点, 进行初步排重, 最终得到 72 株真菌。这些菌株在 -20 °C 和 -80 °C 下进行甘油管保藏。

表 1 真菌分离培养基成分

Table 1 Composition of medium used for fungal isolation

培养基名称	培养基配方 (海水 1 L)
马丁氏培养基	葡萄糖 10 g、蛋白胨 5 g、KH ₂ PO ₄ 1 g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g、琼脂 20 g
MEA	麦芽提取物 20 g、琼脂 20 g
Sabouraud	蛋白胨 10 g、麦芽糖 40 g、琼脂 20 g
MYPG	麦芽提取物 3 g、酵母提取物 3 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 20 g、NH ₄ NO ₂ 5 g、K ₂ HPO ₄ 1 g、MgSO ₄ 0.5 g、FeCl ₃ ·6H ₂ O 0.2 g、琼脂 20 g
Czapek	蔗糖 30 g、NaNO ₃ 3 g、K ₂ HPO ₄ 1 g、KCl 0.5 g、MgSO ₄ 0.5 g、FeSO ₄ 0.01 g、琼脂 20 g
高氏一号	可溶性淀粉 20 g、KNO ₃ 1 g、K ₂ HPO ₄ 0.5 g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g、NaCl 0.5 g、FeSO ₄ 0.01 g、琼脂 20 g
PDA	马铃薯葡萄糖肉汤 26 g、琼脂 20 g
GPA	葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、琼脂 20 g
MPA	麦芽提取物 3 g、蛋白胨 12 g、琼脂 15 g
GYP	葡萄糖 4 g、酵母粉 4 g、蛋白胨 4 g、琼脂 14 g
SNA	葡萄糖 0.5 g、蔗糖 0.2 g、KCl 0.5 g、KH ₂ PO ₄ 1 g、KNO ₃ 1 g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g、琼脂 20 g
SYA	可溶性淀粉 15 g、酵母粉 4 g、琼脂 20 g

2.2 菌株鉴定与化学筛选

对分离到的 72 株菌株采用马丁氏培养基进行小量发酵筛选, 于 28 ℃ 恒温摇瓶培养 14 d, 对它们的代谢产物进行 HPLC 分析, 其中有 15 株菌株的次级代谢产物十分丰富, 可供进一步研究。

本研究对这 15 株菌株采用 PCR 扩增技术通过 ITS 引物对菌株 DNA 进行扩增, 将获得的基因片段送交测序, 最后得到的测序结果在 NCBI 中进行 Blast 比对, 确定菌株的种属关系。根据同源性比对, 菌株 HPQJ10 与 *Penicillium* sp. 相似度为 99%, 故鉴定其为青霉属真菌 *Penicillium* sp.。由于菌株 HPQJ10 的次级代谢产物丰富多样, 因此选择 *Penicillium* sp. HPQJ10 作为本研究的目标菌株进行探究, 其粗提物的 HPLC 及系统发育树见图 2、3。

2.3 菌株发酵

将-80 ℃ 低温条件下保藏的菌株 *Penicillium* sp. HPQJ10 取出, 经平板活化 3 次后备用。配置马丁氏液体培养基, 将菌种接种到液体培养基中, 采用 1 L 锥形瓶培养, 每瓶装液体培养基 400 mL, 恒温摇床 28 ℃ 培养, 待长出菌丝球, 留做种子液备用。

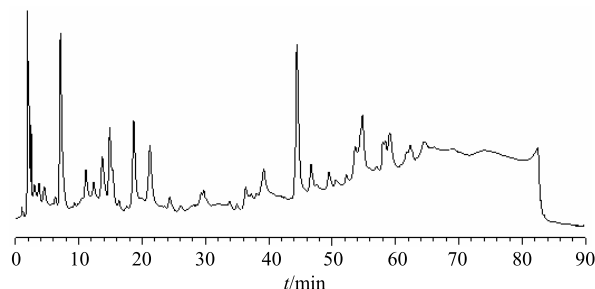


图 2 菌株 HPQJ10 粗提物的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of crude extract of strain HPQJ10

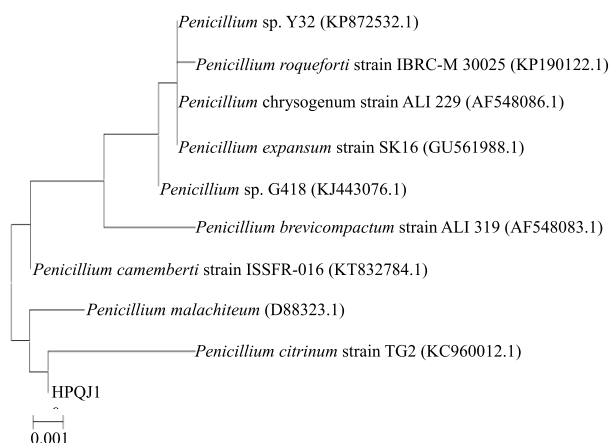


图 3 菌株 HPQJ10 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain HPQJ10

将种子液以 5% 的接种量加入到配制好的马丁氏液体培养基中, 一共接种液体培养基 80 L 左右, 于 25 ℃ 恒温摇床培养 14 d, 分别收集菌丝体和发酵液。

2.4 提取与分离

待发酵完成后, 共收集发酵产物约 80 L。菌液用纱布滤过, 得到发酵液和菌丝体。发酵液用醋酸乙酯萃取 3 次。菌丝体中加入甲醇浸泡, 用超声破碎提取 3 次, 将甲醇蒸出后用纯水进行溶解, 水相用醋酸乙酯萃取 3 次, 最后将菌液和菌体的醋酸乙酯萃取物旋转蒸干合并得到浸膏 40.3 g。将上述浸膏进行正相硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (10 : 0、9 : 1、8 : 2、7 : 3、6 : 4、5 : 5、4 : 6、3 : 7、2 : 8、1 : 9、0 : 10) 为洗脱剂梯度洗脱, 以醋酸乙酯-甲醇 (9 : 1、5 : 5、2 : 8、0 : 10) 为洗脱剂梯度洗脱, 根据 HPLC 和 TLC 显色合并相似馏份, 共得到 10 个组分 F1~F10。

从中挑选 6 个组分进一步分离纯化。其中组分 F5 (0.74 g) 先进行 Sephadex LH-20 分离, 在分析后合并成 2 个亚组分 F5-1、F5-2。组分 F5-1 经反相半制备 HPLC, 以甲醇-水 (35 : 65) 等度洗脱, 在 254 nm 紫外检测波长下, 得到化合物 1 (2.0 mL/min, 8 mg)。组分 F5-2 经反相半制备 HPLC, 以甲醇-水 (30 : 70) 等度洗脱, 在 254 nm 紫外检测波长下, 得到化合物 2 (2.0 mL/min, 6 mg)。组分 F6 (2.02 g) 先经过 Sephadex LH-20 分离, 经分析后合并为 2 个亚组分 F6-1、F6-2, 组分 F6-1 经反相半制备 HPLC, 以甲醇-水 (50 : 50) 等度洗脱, 在 254 nm 紫外检测波长下, 得到化合物 3 (2.0 mL/min, 20 mg)。组分 F9 (2.83 g) 先进行 Sephadex LH-20 分离, 经分析后合并为 2 个亚组分 F9-1、F9-2, 组分 F9-2 析出结晶, 经过洗涤, 得到化合物 4 (52.2 mg)。组分 F3 (2.09 g) 先进行 Sephadex LH-20 分离, 经分析后分成 3 个组分为 F3-1~F3-3, F3-1 浓缩后析出结晶, 经过洗涤, 得到化合物 5 (20.7 mg)。组分 F8 (0.41 g) 先进行 Sephadex LH-20 分离, 经分析后分成 5 个组分为 F8-1~F8-5, 组分 F8-2 经反相半制备 HPLC, 以甲醇-水 (35 : 65) 等度洗脱, 在 254 nm 紫外检测波长下, 得到化合物 6 (2.0 mL/min, 6.2 mg)、7 (2.0 mL/min, 8 mg) 和 8 (2.0 mL/min, 10 mg)。组分 F8-3 经反相半制备 HPLC, 以 55% 甲醇-水 (55 : 45) 等度洗脱, 在 254 nm 紫外检测波长下, 得到化合物 9 (2.0 mL/min, 11 mg) 和 10 (2.0 mL/min, 5 mg)。组分 F2 (6.62 g) 先进行 Sephadex

LH-20 分离,经分析后分成4个组分为F2-1~F2-4, F2-2 经反相半制备 HPLC,以甲醇-水(75:25)等度洗脱,在 254 nm 紫外检测波长下,得到化合物 **11** (2.0 mL/min, 15 mg)、**12** (2.0 mL/min, 12 mg)。组分 F2-3 经反相半制备 HPLC,以甲醇-水(73:27)等度洗脱,在 254 nm 紫外检测波长下,得到化合物 **13** (2.0 mL/min, 9.5 mg) 和 **14** (2.0 mL/min, 10 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末 (DMSO), ESI-MS m/z : 162.1 $[M-H]^-$ 。结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_9H_9NO_2$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.80 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-9), 9.54 (1H, s, 1-OH), 8.10 (1H, s, -NH), 7.19 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 6.76 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 6.67~6.60 (1H, m, H-8), 5.61 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-7); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 156.2 (C-1), 115.5 (C-2), 129.5 (C-3), 126.1 (C-4), 129.5 (C-5), 115.5 (C-6), 110.8 (C-7), 117.7 (C-8), 159.9 (C-9)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **1** 为 *N*-(*Z*)-2-(4-hydroxyphenyl) ethenyl] formamide。

化合物 **2**: 白色粉末 (甲醇), ESI-MS m/z : 197.1 $[M+H]^+$ 。结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{10}H_{12}O_4$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.63 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.57 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-2), 6.47 (1H, dd, $J = 8.7, 2.5$ Hz, H-6), 3.84 (3H, s, H-9), 3.77 (3H, s, H-10), 2.12 (3H, s, H-8); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 159.5 (C-1), 99.8 (C-2), 153.6 (C-3), 121.2 (C-4), 125.5 (C-5), 105.2 (C-6), 171.9 (C-7), 23.4 (C-8), 56.3 (C-9), 55.9 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为 2,4-dimethoxyphenylacetate。

化合物 **3**: 白色粉末 (DMSO), ESI-MS m/z : 301.0 $[M+H]^+$, 299.2 $[M-H]^-$ 。结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{16}H_{12}O_6$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.78 (1H, s, 6-OH), 10.00 (1H, s, 2-OH), 6.34 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3), 6.22 (2H, d, $J = 2.8$ Hz, H-1, 15), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.17 (1H, s, H-13), 2.10 (3H, s, H-16); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 100.3 (C-1), 164.2 (C-2), 93.9 (C-3), 111.5 (C-4), 156.9 (C-5), 161.4 (C-6), 181.8 (C-7), 98.9 (C-8), 164.2 (C-9), 103.7 (C-10), 158.2 (C-11), 161.4 (C-12), 111.3 (C-13), 139.2 (C-14), 108.8 (C-15), 19.7 (C-16)。以上数据与文献报道基本

一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为 6,8,5'6'-四羟基-3'-甲基黄酮。

化合物 **4**: 白色晶体 (甲醇), ESI-MS m/z : 151.1 $[M-H]^-$ 。结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_8H_8O_3$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.07 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-3, 5), 6.70 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 3.36 (2H, s, H-7); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 157.4 (C-1), 116.4 (C-2), 131.2 (C-3), 127.6 (C-4), 131.2 (C-5), 116.4 (C-6), 42.6 (C-7), 177.1 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为 4-hydroxyphenylacetic acid。

化合物 **5**: 白色粉末 (DMSO), ESI-MS m/z : 197.1 $[M+H]^+$ 。结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{10}H_{16}N_2O_2$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.95 (1H, s, -NH), 4.12 (2H, m, H-2), 3.91 (1H, s, H-7), 3.41 (1H, s, H-5), 2.34 (2H, dtd, $J = 14.1, 7.0, 2.6$ Hz, H-8), 2.14 (2H, m, H-3), 1.84 (2H, m, H-4), 1.01 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-10), 0.86 (3H, dd, $J = 8.6, 6.7$ Hz, H-9); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.2 (C-1), 58.2 (C-2), 27.8 (C-3), 22.1 (C-4), 44.6 (C-5), 170.2 (C-6), 59.5 (C-7), 27.7 (C-8), 16.4 (C-9), 18.3 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[11-12], 故鉴定化合物 **5** 为 cyclo-(*L*-Pro-*L*-Val)。

化合物 **6**: 白色粉末 (DMSO), ESI-MS m/z : 211.0 $[M+H]^+$ 。结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{11}H_{18}N_2O_2$ 。 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.98 (1H, s, -NH), 4.18 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-7), 4.00 (1H, m, H-5), 3.34 (2H, m, H-2), 2.12 (1H, ddd, $J = 18.8, 6.8, 3.4$ Hz, H-9), 1.87 (2H, ddd, $J = 14.4, 7.4, 3.6$ Hz, H-3), 1.78 (2H, m, H-4), 1.35 (1H, ddd, $J = 13.7, 7.4, 6.1$ Hz, H-8), 0.86 (6H, dd, $J = 6.5, 4.2$ Hz, H-11, 13); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.4 (C-1), 44.8 (C-2), 22.5 (C-3), 27.4 (C-4), 52.6 (C-5), 166.6 (C-6), 58.5 (C-7), 37.8 (C-8), 24.1 (C-9), 21.1 (C-10), 22.8 (C-11)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **6** 为 cyclo-(*L*-Pro-*L*-Leu)。

化合物 **7**: 白色粉末 (氯仿), ESI-MS m/z : 300.9 $[M+Na]^+$ 。结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{16}H_{22}O_4$ 。 1H -NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.70 (2H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, H-2, 5), 7.50 (2H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, H-1, 6), 4.06 (4H, d, $J = 6.7$ Hz, H-8, 13), 2.01 (2H, dp, $J = 13.4, 6.7$ Hz, H-9, 14), 0.96 (12H, d, $J = 6.8$ Hz, H-10, 11, 15, 16); ^{13}C -NMR (125 MHz,

CDCl₃) δ : 130.9 (C-1), 128.9 (C-2), 132.4 (C-3), 132.4 (C-4), 128.9 (C-5), 130.9 (C-6), 167.2 (C-7), 71.8 (C-8), 27.8 (C-9), 19.2 (C-10), 19.2 (C-11), 167.7 (C-12), 71.8 (C-13), 27.8 (C-14), 19.2 (C-15), 19.2 (C-16)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **7** 为邻苯二甲酸二异丁酯。

化合物 **8**: 白色粉末 (氯仿), ESI-MS m/z : 301.0 [M+H]⁺。结合 ¹H- 和 ¹³C-NMR 数据推测分子式为 C₁₆H₂₂O₄。 ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.71 (2H, dd, J = 5.7, 3.3 Hz, H-2, 5), 7.52 (2H, dd, J = 5.7, 3.3 Hz, H-1, 6), 4.30 (4H, t, J = 6.7 Hz, H-8, 13), 1.71 (2H, m, H-9, 14), 1.43 (4H, m, H-10, 15), 0.95 (6H, t, J = 7.4 Hz, H-11, 16); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 131.0 (C-1), 128.9 (C-2), 132.4 (C-3), 132.4 (C-4), 128.9 (C-5), 131.0 (C-6), 167.6 (C-7), 65.7 (C-8), 30.7 (C-9), 19.3 (C-10), 13.8 (C-11), 167.6 (C-12), 65.7 (C-13), 30.7 (C-14), 19.3 (C-15), 13.8 (C-16)。以上数据与文献报道基本一致^[15-16], 故鉴定化合物 **8** 为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物 **9**: 白色粉末 (氯仿), ESI-MS m/z : 235.0 [M+H]⁺。结合 ¹H- 和 ¹³C-NMR 数据推测分子式为 C₁₃H₁₄O₄。 ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.62 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2), 6.60 (1H, s, H-6), 5.96 (1H, s, H-8), 4.03 (1H, dd, J = 13.0, 6.2 Hz, H-11), 2.65 (3H, s, H-13), 2.57 (2H, dd, J = 12.2, 6.4 Hz, H-10), 1.14 (3H, d, J = 6.2 Hz, H-12); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 160.9 (C-1), 114.4 (C-2), 141.4 (C-3), 116.5 (C-4), 159.2 (C-5), 100.6 (C-6), 178.3 (C-7), 111.5 (C-8), 164.8 (C-9), 42.9 (C-10), 64.1 (C-11), 23.4 (C-12), 22.4 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **9** 为 7-hydroxy-2-(2-hydroxypropyl)-5-methylchromone。

化合物 **10**: 白色粉末 (DMSO), ESI-MS m/z : 334.1 [M+Na]⁺。结合 ¹H- 和 ¹³C-NMR 数据推测分子式为 C₁₇H₁₇N₃O₃。 ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.96 (1H, s, H-9), 7.17 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-11), 6.79 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3, 5), 6.74 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-14), 6.62 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-12), 6.60 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2, 6), 3.84 (3H, s, H-16), 3.76 (2H, s, H-7), 3.67 (3H, s, H-17); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 155.1 (C-1), 114.9 (C-2), 129.4 (C-3), 126.3 (C-4), 129.4 (C-5), 114.9 (C-6), 30.6 (C-7), 155.9 (C-8), 150.8 (C-9), 118.5 (C-10), 129.2 (C-11),

105.2 (C-12), 161.5 (C-13), 99.3 (C-14), 156.0 (C-15), 55.7 (C-16), 55.6 (C-17)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **10** 为 2-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-hydroxybenzyl)-1,2,4-triazole。

化合物 **11**: 白色粉末 (氯仿), ESI-MS m/z : 397.3 [M+H]⁺。结合 ¹H- 和 ¹³C-NMR 数据推测分子式为 C₂₈H₄₄O。 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.56 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 5.38 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 5.28~5.09 (2H, m, H-20, 21), 3.63 (1H, t, J = 11.0 Hz, H-2), 3.47 (1H, s, 2-OH), 2.46 (1H, d, J = 14.1 Hz, H-11), 2.27 (1H, t, J = 12.7 Hz, H-10), 2.04 (2H, s, H-6), 1.96 (2H, s, H-3), 1.93~1.80 (2H, m, H-1, 17), 1.74 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-16), 1.64 (2H, d, J = 9.5 Hz, H-15), 1.54~1.42 (3H, m, H-13, 23), 1.32 (2H, d, J = 3.8 Hz, H-14), 1.27 (2H, d, J = 12.5 Hz, H-18, 22), 1.03 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-25), 0.93 (3H, s, H-26), 0.91 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-19), 0.82 (3H, t, J = 6.3 Hz, H-28), 0.62 (3H, s, H-27); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 32.2 (C-1), 70.6 (C-2), 43.1 (C-3), 141.5 (C-4), 38.6 (C-5), 37.2 (C-6), 119.8 (C-7), 116.5 (C-8), 139.9 (C-9), 46.5 (C-10), 55.9 (C-11), 43.0 (C-12), 39.3 (C-13), 21.3 (C-14), 23.2 (C-15), 28.4 (C-16), 54.7 (C-17), 132.2 (C-18), 135.7 (C-19), 40.6 (C-20), 20.1 (C-21), 33.3 (C-22), 40.9 (C-23), 19.8 (C-24), 12.2 (C-25), 21.3 (C-26), 16.5 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **11** 为 (22*E*,24*R*)-麦角甾-5,7,22-三烯-3 β -醇。

化合物 **12**: 白色粉末 (DMSO), ESI-MS m/z : 421.3 [M+H]⁺。结合 ¹H- 和 ¹³C-NMR 数据推测分子式为 C₂₂H₃₆N₄O₄。 ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.96 (2H, d, J = 25.0 Hz, -NH), 4.18 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-4), 4.10 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-11), 4.00 (1H, m, H-9), 3.95 (1H, s, H-2), 3.38 (4H, ddd, J = 23.5, 11.7, 5.2 Hz, H-7, 14), 2.12 (2H, ddd, J = 12.0, 5.5, 2.5 Hz, H-12), 2.02 (1H, tdd, J = 7.0, 4.5, 2.3 Hz, H-15), 1.96~1.73 (4H, m, H-5, 16), 1.39~1.31 (2H, m, H-6), 1.31~1.21 (1H, m, H-20), 0.98 (3H, d, J = 7.1 Hz, H-18), 0.86 (6H, dd, J = 6.6, 4.2 Hz, H-21, 22), 0.83 (3H, t, J = 7.4 Hz, H-17); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 165.7 (C-1), 58.7 (C-2), 170.5 (C-3), 59.7 (C-4), 28.4 (C-5), 24.5 (C-6), 45.3 (C-7), 167.0 (C-8), 53.1 (C-9), 170.8 (C-10), 58.9 (C-11), 27.9 (C-12), 22.9 (C-13), 45.1 (C-14), 35.4 (C-15), 23.4 (C-16), 12.7

(C-17), 15.4 (C-18), 38.3 (C-19), 24.3 (C-20), 22.5 (C-21), 22.4 (C-22)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **12** 为 cyclo-(Leu-Pro-Ile-Pro)。

化合物 **13**: 白色粉末(氯仿), ESI-MS m/z : 183.1 $[M+H]^+$ 。结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_9H_{10}O_4$ 。 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.66 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-2), 6.51 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-5), 6.31 (1H, dd, J = 8.6, 2.8 Hz, H-3), 3.74 (3H, s, H-7), 3.66 (3H, s, H-8); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 115.4 (C-1), 140.4 (C-2), 104.2 (C-3), 152.6 (C-4), 100.3 (C-5), 148.2 (C-6), 55.6 (C-7), 55.3 (C-8), 170.3 (C-9)。以上数据与文献报道基本一致^[20-21], 故鉴定化合物 **13** 为 2,4-二甲氧基苯甲酸。

化合物 **14**: 白色粉末 (DMSO), ESI-MS m/z : 125.1 $[M+H]^+$ 。结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_7H_8O_2$ 。 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.51 (1H, s, 1-OH), 7.04 (1H, t, J = 8.1 Hz, H-5), 6.35 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 6.33 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-4), 6.31 (1H, t, J = 2.2 Hz, H-2), 3.68 (3H, s, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 158.6 (C-1), 101.2 (C-2), 160.5 (C-3), 104.5 (C-4), 129.8 (C-5), 107.8 (C-6), 54.8 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致^[22-23], 故鉴定化合物 **14** 为 3-甲氧基苯酚。

4 讨论

本实验对繁茂膜海绵内生真菌——青霉属真菌的次级代谢产物进行了研究, 利用色谱和波谱技术从青霉属真菌发酵液的醋酸乙酯提取物中分离出 14 个化合物, 分别属于生物碱类、黄酮类、简单苯的衍生物、肽类、酯类等成分。文献报道过生物碱类化合物具有多种生物活性如抗菌^[24]、抗炎^[25]以及细胞毒^[26]作用。2012 年 6,8,5'6'-四羟基-3'-甲基黄酮作为新化合物首次从青霉属真菌中分离出来, 具有抗污损作用^[9]。随着陆源微生物药物资源的日益枯竭, 海洋微生物正成为新型药物的重要来源, 由于海绵来源真菌不断的研究与开发, 更多新化合物以及海洋新药先导化合物被发现, 充实了海洋药物宝库。本实验对繁茂膜海绵内生真菌进行了系统研究, 分离到的化合物为以后研究海绵来源真菌代谢产物以及开发海洋药物提供了依据。

参考文献

- [1] Blunt J W, Copp B R, Keyzers R A, *et al.* Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2014, 31: 160-258.
- [2] Blunt J W, Copp B R, Munro M H G, *et al.* Marine natural

products [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(5): 196-268.

- [3] 李庆欣, 史雪凤, 黄 智, 等. 海洋真菌来源吡啶生物碱类化合物的结构和活性研究 [J]. 热带海洋学报, 2013, 32(1): 35-47.
- [4] Zhao C Y, Zhu T H, Zhu W M. New marine natural products of microbial origin from 2010 to 2013 [J]. *Chin J Org Chem*, 2013, 33(6): 1195-1234.
- [5] Rateb M E, Ebel R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(6): 290-344.
- [6] Ding B, Yin Y, Zhang F, *et al.* Recovery and phylogenetic diversity of culturable fungi associated with marine sponges *Clathrina luteoculcitella* and *Holoxea* sp. in the South China Sea [J]. *Mar Biotechnol*, 2011, 13(4): 713-721.
- [7] An C Y, Li X M, Li C S, *et al.* Triazoles and Other N-containing metabolites from the marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* EN-118 [J]. *Helv Chim Acta*, 2013, 96(4): 682-687.
- [8] El-Mehalawy A A, Abd-Allah N A, Mohammed R M, *et al.* Actinomycetes antagonizing plant and human pathogenic fungi. II. Factors affecting antifungal production and chemical characterization of the active components [J]. *Int J Agri Biol*, 2005, 7(2): 188-196.
- [9] Bao J, Sun Y L, Zhang X Y, *et al.* Antifouling and antibacterial polyketides from marine gorgonian coral-associated fungus *Penicillium* sp. SCSGAF 0023 [J]. *J Antibiot*, 2013, 66(4): 219-223.
- [10] Ohtani K, Fujioka S, Shimada A, *et al.* Nematicidal activities of 4-hydroxyphenylacetic acid and oidiolactone D produced by the fungus *Oidiodendron* sp. [J]. *Z Naturforsch C*, 2011, 66(1/2): 31-34.
- [11] Smelcerovic A A, Palic R M, Jordjevic S M D. A new example of diketopiperazine isolated from marine actinomycete [J]. *Res J Chem Environ*, 2001, 5(1): 57-58.
- [12] 张起辉, 田 黎, 闫政清, 等. 海洋真菌 *Nigrospora sphaerica* 中化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(1): 26-29.
- [13] Li Z, Peng C, Shen Y, *et al.* L, L-Diketopiperazines from *Alcaligenes faecalis* A72 associated with South China Sea sponge *Stelletta tenuis* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2008, 36(3): 230-234.
- [14] Zhang W, Lou H X, Li G Y, *et al.* A new triterpenoid from *Entodon okamurae* Broth [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2003, 5(3): 189-195.
- [15] 毕淑峰, 汤 苏, 孙丹中, 等. 螳螂共生真菌 TG-3 次生代谢产物的研究 [J]. 中成药, 2013, 35(4): 742-744.
- [16] 曲新颜, 顾谦群, 崔承彬, 等. 海洋来源的放线菌 3295

- 代谢产物的结构鉴定及抗肿瘤活性 (I) [J]. 中国海洋药物, 2004, 23(6): 1-4.
- [17] Liu S, Wang H, Su M, *et al.* New metabolites from the sponge-derived fungus *Aspergillus sydowii* J05B-7F-4 [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 31(14): 1682-1686..
- [18] 许向前, 洪文荣, 陈代杰. 黑麦角菌产生麦角甾醇的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(6): 379-381.
- [19] Gao C H, Chen Y N, Pan L X, *et al.* Two new cyclic tetrapeptides from deep-sea bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* GAS 00152 [J]. *J Antibiot*, 2014, 67(7): 541-543.
- [20] Gao X, Luo W, Xie G, *et al.* Characteristics and kinetics of inhibition of polyphenol oxidase from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *J Integr Agr*, 2003, 37(5): 687-691.
- [21] Ferenc W, Walków-Dziewulska A. Thermal and spectral features of yttrium and heavy lanthanide complexes with 2, 4-dimethoxybenzoic acid [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2001, 63(3): 865-877.
- [22] Gong P, Yuan H, Zhai P, *et al.* Investigation on the degradation of benzophenone-3 by UV/H₂O₂ in aqueous solution [J]. *Chem Eng J*, 2015, 277(3): 97-103.
- [23] Ullrich S, Geppert W D, Dessent C E H, *et al.* Observation of rotational isomers I: A ZEKE and hole-burning spectroscopy study of 3-methoxyphenol [J]. *J Phys Chem A*, 2000, 104(51): 11864-11869.
- [24] Zhang Y, Li X M, Shang Z, *et al.* Meroterpenoid and diphenyl ether derivatives from *Penicillium* sp. MA-37, a fungus isolated from marine mangrove rhizospheric soil [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(11): 1888-1895.
- [25] Zhao W Y, Zhu T J, Fan G T, *et al.* Three new dioxopiperazine metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus fumigatus* Fres [J]. *Nat Prod Rep*, 2010, 24(10): 953-957.
- [26] Song F, Ren B, Yu K, *et al.* Quinazolin-4-one coupled with pyrrolidin-2-iminium alkaloids from marine-derived fungus *Penicillium aurantiogriseum* [J]. *Mar Drugs*, 2012, 10(6): 1297-1306.