

• 化学成分 •

手参化学成分及神经保护活性研究

秦娟^{1,2}, 薛诗意^{1,2}, 王建斌^{1,2}, 袁海恋^{1,2}, 刘量^{1,2*}

1. 扬州大学医学院 (转化医学研究院), 江苏 扬州 225009

2. 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏 扬州 225009

摘要: 目的 对手参 *Gymnadenia conopsea* 块茎的化学成分进行研究, 并评价其神经保护作用。方法 采用硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱和半制备 HPLC 等手段进行分离纯化, 通过理化性质、波谱数据和单晶 X-射线衍射鉴定化合物的结构。同时, 评价化合物对氧糖剥夺/再灌注 (OGD/R) 损伤的 PC12 细胞的保护作用。结果 从手参乙醇提取物中分离得到 7 个化合物, 被鉴定为 (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-2,3,8,9-四羟基-7-甲基-五氧杂四环[6.6.2.0^{4,5}.0^{7,8}]十六烷 (1)、(5*S*)-5-(羟基甲基)-4-[(*E*)-[5'-(羟基甲基)呋喃-2'-基]甲基]-2-[(*Z*)-(4"-羟基苯基)甲基]四氢呋喃-3-酮 (2)、5-羟甲基糠醛 (3)、双-(5-甲酰基糠基)醚 (4)、pollenfuran A (5)、pollenfuran B (6)、5-((4-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基苄氧基)甲基)-呋喃-2-甲醛 (7)。与 OGD/R 组相比, 化合物 1~2、4 和 7 在 1.062 5~50 μmol/L 的浓度范围内能显著提高 PC12 细胞活力。结论 化合物 1 和 2 为新化合物, 分别命名为手参环醇和手参呋喃 B; 化合物 4~7 首次从手参属中分离得到。化合物 1~2、4 和 7 具有神经保护活性。

关键词: 手参; 手参环醇; 手参呋喃 B; 双-(5-甲酰基糠基)醚; 神经保护活性; PC12 细胞

中图分类号: R914 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)23-7923-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.23.001

Chemical constituents and neuroprotective effects of *Gymnadenia conopsea*QIN Juan^{1,2}, XUE Shiyi^{1,2}, WANG Jianbin^{1,2}, YUAN Hailian^{1,2}, LIU Liang^{1,2}

1. Institute of Translational Medicine, Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

2. Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: Objective The chemical constituents of *Gymnadenia conopsea* tubers were studied and their neuroprotective effects were evaluated. **Methods** The compounds were isolated and purified by silica gel column chromatography (CC), ODS CC, Sephadex LH-20 CC and semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). The structures of the compounds were identified by physicochemical properties, spectral data and single crystal X-ray diffraction. At the same time, the protective effects of the compounds on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-injured rat pheochromocytoma (PC12) cells were determined. **Results** Seven compounds were isolated from 95% ethanol extract of *G. conopsea*, and they were identified as (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-2,3,8,9-tetrahydroxy-7-methyl-pentaoxatetracyclo [6.6.2.0^{4,5}.0^{7,8}]hexadecane (1), (5*S*)-5-(hydroxymethyl)-4-[(*E*)-[5'-(hydroxymethyl)-2'-furyl]methylidene]-2-[(*Z*)-(4"-hydroxyphenyl) methylidene] tetrahydrofuran-3-one (2), 5-hydroxymethylfurfural (3), bis (5-formylfurfuryl) ether (4), pollenfuran A (5), pollenfuran B (6), and 5-((4-*O*-β-*D*-glucopyranosylbenzyloxy)methyl)-furan-2-carbaldehyde (7). Compared with OGD/R group, compounds 1—2, 4 and 7 could significantly enhance the viability of PC12 cells at the concentrations of 1.062 5 to 50 μmol/L. **Conclusion** Compounds 1 and 2 are new compounds named gymnaoxa and gymnafuran B, respectively. Compounds 4—7 were isolated from this genus for the first time. Compounds 1—2, 4 and 7 showed neuroprotective activities.

Key words: *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br.; gymnaoxa; gymnafuran B; bis (5-formylfurfuryl) ether; neuroprotective effect; PC12 cell

收稿日期: 2024-09-20

基金项目: 扬州大学“高端人才支持计划”项目 (20190223); 江苏省研究生科研创新项目 (KYCX22_3573)

作者简介: 秦娟 (1999—), 女, 硕士研究生, 从事中药/民族药药效物质基础研究。E-mail: qinjuan0324@163.com

*通信作者: 刘量 (1980—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药/民族药药效物质基础与作用机制、活性天然产物靶点识别与确证研究。

E-mail: enjoyyz@163.com

手参 *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. 是兰科手参属 *Gymnadenia* R. Br. 多年生草本植物, 分布于四川、云南、西藏和青海等地, 以产于西藏为佳^[1-2]。手参药用部分是块茎, 以手掌状的外观和特有的手指状突起而闻名, 因其块茎生长极其缓慢, 被藏族人民称为“不老草”^[3]。手参性温、味甘, 为《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药分册》收载品种, 具有补肾益气、生精润肺的功效^[4]。目前, 从手参中已报道了包括苣基酯葡萄糖苷类^[5-7]、联苣基类^[8]、菲类^[8]、酚类^[9-10]、生物碱类^[11]等在内的 100 余个化合物。手参粗提物和部分单体成分具有补益抗疲劳^[12]、神经保护^[13]、镇静催眠^[14]、免疫调节^[15]和抗氧化^[16]等多种作用。近几年来, 手参以其显著的药理活性和结构新颖多样的化学成分, 引起越来越多的关注。由于需求量剧增, 手参野生资源急剧减少, 已被列为濒危植物^[17]。因此, 对手参进行深入研究、充分高效利用其资源显得尤为迫切。为了进一步丰富手参的化学成分, 本实验采用正反相硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶柱色谱和半制备高效液相等多种分离手段对手参的乙醇提取物进行了化学成分研究, 共得到了 7 个化合物 (图 1), 分别鉴定为 (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-2,3,8,9-四羟基-7-甲基-五氧杂四环[6.6.2.0^{4,5}.0^{7,8}]十六烷 ((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-2,3,8,9-tetrahydroxy-7-methyl-pentaoxatetracyclo[6.6.2.0^{4,5}.0^{7,8}]hexadecane, **1**)、(5*S*)-5-(羟基甲基)-4-[(*E*)-[5'-(羟基甲基)呋喃-2'-基]甲亚基]-2-[(*Z*)-(4''-羟基苯基)甲亚基]四氢呋喃-3-酮 ((5*S*)-5-(hydroxymethyl)-4-[(*E*)-[5'-(hydroxymethyl)-2'-furyl]methylidene]-2-[(*Z*)-(4''-hydroxyphenyl)methylidene]tetrahydrofuran-3-one, **2**)、5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural, **3**)、双-(5-甲酰基糠基)醚 [bis(5-formylfurfuryl) ether, **4**]、pollenfuran A (**5**)、pollenfuran B (**6**) 和 5-((4-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基苣基)甲基)-呋喃-2-甲醛 [5-((4-*O*-β-*D*-glucopyranosylbenzyloxy)methyl)-furan-2-carbaldehyde, **7**]。其中化合物 **1** 和 **2** 为新化合物, 分别命名为手参环醇 (gymnaoxa) 和手参呋喃 B (gymnafuran B); 化合物 **4**~**7** 首次从手参属中分离得到。神经保护活性评价结果显示, 化合物 **1**~**2**、**4** 和 **7** 对氧糖剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 损伤的 PC12 细胞具有保护作用。

1 仪器与材料

Bruker AVANCE 600 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司), TMS 作为内标; maXis 超高分辨飞行时间质谱仪 (德国 Bruker 公司); X 射线单晶衍射仪、670-IR+610-IR 型显微红外光谱仪 (美国 Varian 公司); J-810 型圆二色光谱仪 (日本 JASCO 公司); U-3900 型紫外光谱仪 (日本 Shimadzu 公司); WZZ-2B 型自动旋光仪 (上海精密科学仪器有限公司); LC 3050 型半制备高效液相色谱仪 (北京创新通恒科技有限公司); Cosmosil 5C₁₈-MS-II 半制备色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μm, 日本 Nacalai Tesque 公司); 三用紫外分析仪 (上海析牛莱伯仪器有限公司); D101 大孔树脂 (0.3~1.25 mm, 天津

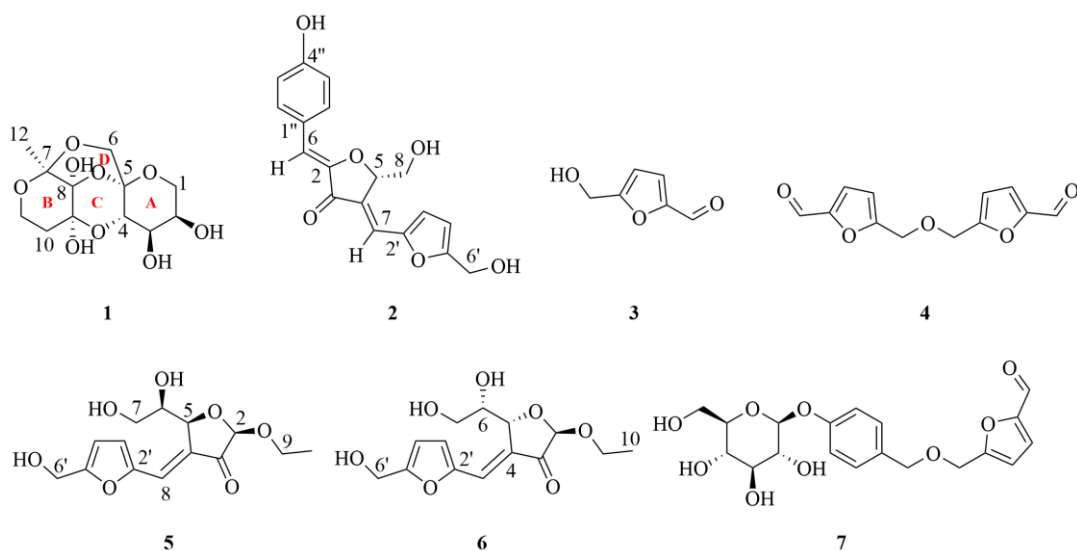


图 1 化合物 1~7 的化学结构

Fig.1 Chemical structures of compounds 1—7

南开和成科技有限公司); 柱色谱用硅胶(200~300 目)、硅胶 H(青岛海洋化工集团); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(美国 GE Healthcare 公司); 反相柱色谱 ODS C₁₈ 填料(40~63 μm)、高效正反相铝制硅胶板(德国 Merck 公司); 分析级乙醇、甲醇和二氯甲烷与色谱乙腈等试剂(国药集团化学试剂有限公司); PC12 细胞(上海基斯德诺生物科技有限公司); 依达拉奉(西安赛美科医药研发有限公司, 批号 35508)。

手参块茎(20 kg)于 2020 年 3 月采购于西藏, 由扬州大学医学院刘量教授鉴定为 *G. conopsea* (L.) R. Br. 凭证标本(SZS20201012)存放于扬州大学医学院中药标本馆。

2 方法

2.1 提取与分离

将手参块茎 95%乙醇提取物经 D-101 大孔树脂分离, 得到 30%乙醇部位(Fr. 1, 231.4 g)、50%乙醇部位(Fr. 2, 78.8 g)和 75%乙醇部位(Fr. 3, 78.3 g)^[18]。Fr. 1 经硅胶柱色谱(200~300 目)分离, 以二氯甲烷-甲醇(50:1、25:1、10:1、8:1、5:1、3:1、1:1、0:1)梯度洗脱, 合并为 9 个流分(Fr. 1.1~1.9)。Fr. 1.2 经凝胶柱色谱分离, 以甲醇洗脱, 共得到 3 个流分(Fr. 1.2.1~1.2.3), 其中 Fr. 1.2.2 经硅胶柱色谱(硅胶 H)分离, 以二氯甲烷-甲醇(50:1、25:1、10:1、8:1、5:1、3:1、1:1、0:1)梯度洗脱, 得到 6 个流分(Fr. 1.2.2.1~1.2.2.6), Fr. 1.2.2.3 重结晶得到化合物 4(8.4 mg)。Fr. 1.2.3 经半制备 HPLC 纯化, 以乙腈-水(1:4)洗脱, 得到化合物 3(2.2 mg, $t_R=9.1$ min)。Fr. 1.5 经 ODS 柱色谱分离, 以甲醇-水(1:9、3:17、1:4、3:7、1:1、1:0)梯度洗脱, 得到 6 个流分(Fr. 1.5.1~1.5.6), Fr. 1.5.2 经凝胶柱色谱分离, 以甲醇洗脱, 共得到 3 个流分(Fr. 1.5.2.1~1.5.2.3), 其中 Fr. 1.5.2.2 经硅胶柱色谱(硅胶 H)分离, 以二氯甲烷-甲醇(50:1、25:1、10:1、8:1、5:1、3:1、1:1、0:1)梯度洗脱, 合并为 6 个流分(Fr. 1.5.2.2.1~1.5.2.2.6), 其中 Fr. 1.5.2.2.4 为化合物 6(29.6 mg)。Fr. 1.6 经硅胶柱色谱(硅胶 H)分离, 以二氯甲烷-甲醇(50:1、25:1、10:1、8:1、5:1、3:1、1:1、0:1)梯度洗脱, 合并为 6 个流分(Fr. 1.6.1~1.6.6), Fr. 1.6.5 经 ODS 柱色谱分离, 以甲醇-水(1:9、3:17、1:4、3:7、1:1、1:0)梯度洗脱, 得到 5 个流分(Fr. 1.6.5.1~

1.6.5.5), 其中 Fr. 1.6.5.2 经半制备 HPLC 纯化, 以乙腈-水(3:17)洗脱, 得到化合物 5(13.3 mg, $t_R=34.2$ min)。Fr. 1.7 经硅胶柱色谱(200~300 目)分离, 以二氯甲烷-甲醇(50:1、25:1、10:1、8:1、5:1、3:1、1:1、0:1)梯度洗脱, 合并为 6 个流分(Fr. 1.7.1~1.7.6)。Fr. 1.7.3 经硅胶柱色谱(硅胶 H)分离, 以二氯甲烷-甲醇(50:1~0:1)梯度洗脱, 合并为 5 个流分(Fr. 1.7.3.1~1.7.3.5), 其中 Fr. 1.7.3.2 经 ODS 柱色谱分离, 以甲醇-水(1:9、3:17、1:4、3:7、1:1、1:0)梯度洗脱, 共得到 5 个流分(Fr. 1.7.3.2.1~1.7.3.2.5), Fr. 1.7.3.2.2 经凝胶柱色谱分离, 以甲醇洗脱, 共得到 5 个流分(Fr. 1.7.3.2.2.1~1.7.3.2.2.5), 其中 Fr. 1.7.3.2.2.4 经重结晶得到化合物 1(1.0 mg)。Fr. 1.7.4 经硅胶柱色谱(硅胶 H)分离, 以二氯甲烷-甲醇(50:1、25:1、10:1、8:1、5:1、3:1、1:1、0:1)梯度洗脱, 合并为 7 个流分(Fr. 1.7.4.1~1.7.4.7), Fr. 1.7.4.6 经 ODS 柱色谱分离, 以甲醇-水(1:9、3:17、1:4、3:7、1:1、1:0)梯度洗脱, 得到 9 个流分(Fr. 1.7.4.6.1~1.7.4.6.9), Fr. 1.7.4.6.6 经凝胶柱色谱分离, 以甲醇洗脱, 共得到 5 个流分(Fr. 1.7.4.6.6.1~1.7.4.6.6.5), Fr. 1.7.4.6.6.3 经半制备 HPLC 纯化, 以乙腈-水(3:17)洗脱, 得到化合物 7(10.7 mg, $t_R=46.1$ min)。Fr. 2 经硅胶柱色谱(200~300 目)分离, 以二氯甲烷-甲醇(50:1、25:1、10:1、8:1、5:1、3:1、1:1、0:1)梯度洗脱, 合并为 9 个流分(Fr. 2.1~2.9)。Fr. 2.3 经过硅胶柱色谱(硅胶 H)分离, 以二氯甲烷-甲醇(50:1、25:1、10:1、8:1、5:1、3:1、1:1、0:1)梯度洗脱, 合并为 4 个流分(Fr. 2.3.1~2.3.4), Fr. 2.3.2 经凝胶柱色谱分离, 以甲醇洗脱, 共得到 5 个流分(Fr. 2.3.2.1~2.3.2.5), 其中 Fr. 2.3.2.3 经半制备 HPLC 纯化, 以乙腈-水(3:7)洗脱, 得到化合物 2(9.5 mg, $t_R=24.5$ min)。

2.2 单晶 X-射线衍射

采用 Ga K α ($\lambda=1.341$ 39) 在 Gemini A Ultra X 射线衍射仪上进行 X 射线衍射。在数据收集期间, 晶体保持在 170.00 K, Flack 参数为 0.15(9)。该结构使用 SHELXT 结构求解程序, 用 Intrinsic Phasing 求解, 并使用 SHELXL 对结构进行最小二乘法精化。

2.3 神经保护活性评价

2.3.1 细胞毒性评价 将 PC12 细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 分为对照

组和给药组 (50、25、12.5、6.25、3.125 和 1.062 5 $\mu\text{mol/L}$ 待测化合物), 每组 6 个复孔。同时设空白组, 每孔不加细胞只加培养基。待细胞贴壁后, 用 PBS 清洗 2 遍。对照组加入含 5% 血清培养基, 给药组加入含化合物或依达拉奉 5% 血清培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 然后加入 CCK-8 工作液 10 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 90 min, 用酶标仪检测细胞在 450 nm 波长下的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3.2 OGD/R 致 PC12 细胞损伤模型建立及药物干预 将细胞以 5×10^4 个/ mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 分为对照组、OGD/R 组和给药组, 每组 5 个复孔。同时设空白组, 每孔不加细胞只加培养基。待细胞贴壁后, 用 PBS 清洗 2 遍。对照组加入含 5% 血清培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, OGD/R 组和给药组加入含 5% 血清无糖培养基, 在含 1% O_2 、94% N_2 和 5% CO_2 的三气培养箱中低氧处理 6 h。6 h 后弃培养基, 给药组加入含药 10% 血清培养基, 对照组和 OGD/R 组加入含 10% 血清培养基, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。24 h 后, 结束干预, 加入 CCK-8 工作液 10 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续孵育 90 min, 使用酶标仪检测细胞在 450 nm 波长下的 A 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药或 OGD/R}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 1: 白色斜方结晶 (甲醇); HR-ESI-MS m/z : 329.084 9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值为 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_9\text{Na}$, 329.084 3), 确定其分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_9$, 计算不饱和度为 4。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 19.83$ (c 0.01, MeOH); IR (KBr) 谱图提示有羟基 (ν_{max} 3 403 cm^{-1}) 的存在。

^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (表 1) 显示化合物 1 在高场区存在 1 个甲基 (3H, s, δ_{H} 1.30)。 ^1H 、 ^{13}C 结合 HSQC NMR 谱图和 DEPT 谱图, 确定化合物 1 中存在 1 个甲基 (δ_{H} 1.30; δ_{C} 17.4)、4 个亚甲基 (δ_{H} 1.69, 1.82, 3.37, 3.96, 3.56, 3.80, 3.54, 3.76; δ_{C} 36.5, 57.3, 65.2, 69.6)、3 个次甲基 (δ_{H} 4.54, 3.72, 3.74; δ_{C} 68.3, 68.4, 74.1)、4 个羟基 (δ_{H} 4.42, 4.70, 5.88, 6.37)。此外, ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱图显示该化合物无不饱和键, 表明该化合物中存在的 4 个不饱和度来自于四环系统。

表 1 化合物 1 的 NMR 信号数据 (600/150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	3.56 (1H, m), 3.80 (1H, m)	65.2
2	3.72 (1H, m)	68.4
3	4.54 (1H, m)	68.3
4	3.74 (1H, m)	74.1
5		94.7
6	3.54 (1H, m), 3.76 (1H, m)	69.6
7		97.7
8		92.9
9		90.9
10	1.69 (1H, m), 1.82 (1H, m)	36.5
11	3.37 (1H, m), 3.96 (1H, m)	57.3
12	1.30 (3H, s)	17.4

HMBC 谱 (图 2) 显示, δ_{H} 3.56, 3.80 (m, H-1) 与 C-2 (δ_{C} 68.4)、C-3 (δ_{C} 68.3)、C-5 (δ_{C} 94.7) 相关, δ_{H} 3.72 (m, H-2) 与 C-3 (δ_{C} 68.3)、C-4 (δ_{C} 74.1) 相关, δ_{H} 4.54 (m, H-3) 与 C-2 (δ_{C} 68.4)、C-4 (δ_{C} 74.1) 相关, δ_{H} 3.74 (m, H-4) 与 C-2 (δ_{C} 68.4)、C-3 (δ_{C} 68.3)、C-5 (δ_{C} 94.7)、C-9 (δ_{C} 90.9) 相关。 ^1H - ^1H COSY 谱图显示, δ_{H} 3.72 (m, H-2) 与 δ_{H} 4.54 (m, H-3) 相关, H-2 与 2-OH 相关, H-3 与 3-OH 相关, 其共同组成了 1 个含氧六元环 A。此外, ^1H - ^1H COSY 谱图还显示 δ_{H} 1.69, 1.82 (m, H-10) 与 δ_{H} 3.37 和 3.96 (m, H-11) 相关, 结合 HMBC 谱图, δ_{H} 1.69, 1.82 (m, H-10) 与 C-4 (δ_{C} 74.1)、C-9 (δ_{C} 90.9)、C-11 (δ_{C} 57.3) 相关, δ_{H} 3.37, 3.96 (m, H-11) 与 C-8 (δ_{C} 92.9)、C-9 (δ_{C} 90.9)、C-10 (δ_{C} 36.5) 相关, δ_{H} 5.88 (s, 8-OH) 与 C-7 (δ_{C} 97.7)、C-8 (δ_{C} 92.9)、C-9 (δ_{C} 90.9) 相关, δ_{H} 6.37 (s, 9-OH) 与 C-8 (δ_{C} 92.9)、C-9 (δ_{C} 90.9)、C-10 (δ_{C} 36.5) 相关, δ_{H} 1.30 (s, H-12) 与 C-7 (δ_{C} 97.7)、C-8 (δ_{C} 92.9)、C-11 (δ_{C} 57.3) 相关, 以上信号组成了 1 个在 C-7 位有甲基取代的含氧六元环 B, 且与环 A 通过 2 个氧原子相连形成含氧六元环 C, 环 C 与环 A 共用 C-4 和 C-5, 与环 B 共用 C-8 和 C-9。除上述描述结构外, 仅剩 1 个亚甲基 (δ_{H} 3.54, 3.76; δ_{C} 69.6) 与 1 个氧原子, 根据 HMBC 谱图呈现的相关信号, δ_{H} 3.54, 3.76 (m, H-6) 分别与 C-4 (δ_{C} 74.1), C-5 (δ_{C} 94.7) 和 C-7 (δ_{C} 97.7) 相关, 表明其形成 1 个含氧六元环 D, 且与环 A、C 共用 C-5, 与环 B 共用 C-7, 与环 B、C 共用 C-8, 与环 C 共用 1 个氧原子。C-5 (δ_{C} 94.7) 和 C-7 (δ_{C} 97.7) 相关, 表明其形成 1 个

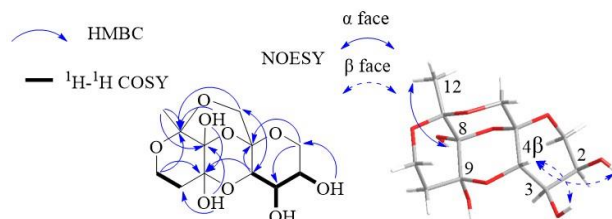


图 2 化合物 1 的关键 HMBC、¹H-¹H COSY 和 NOESY 信号

Fig. 2 Key HMBC, ¹H-¹H COSY and NOESY correlations of compound 1

含氧六元环 D，且与环 A、C 共用 C-5，与环 B 共用 C-7，与环 B、C 共用 C-8，与环 C 共用 1 个氧原子。至此，该化合物的平面结构由此确定，该化合物是 1 个具有 6/6/6/6 四环系统的化合物。

在 NOESY 谱（图 2）中，H-4 (δ_{H} 3.74) 被随机确定为 β 位。H-4 与 2-OH 和 3-OH 有相关，因此它们均被认定是 β 位。H-4 与 8-OH 和 9-OH 无相关信号，因此它们被认定为 α 位。H-12 与 8-OH 有相关，因此它被认定为 α 位。因此化合物 1 的相对构型为 $2R^*, 3R^*, 4S^*, 5S^*, 7S^*, 8S^*, 9S^*$ 。此外，应用重结晶的方法在甲醇中获得了单晶，进行 X 射线单晶衍射后证实了这一结构（CCDC 2290908，图 3）。因此，确认化合物 1 的结构为 $(2R, 3R, 4S, 5S, 7S, 8S, 9S)$ -2,3,8,9-四羟基-7-甲基-五氧杂四环[6.6.2.0^{4,5}.0^{7,8}]-十六烷，经 SciFinder 检索可知，化合物 1 为新化合物，命名为手参环醇（gymnaoxa）。

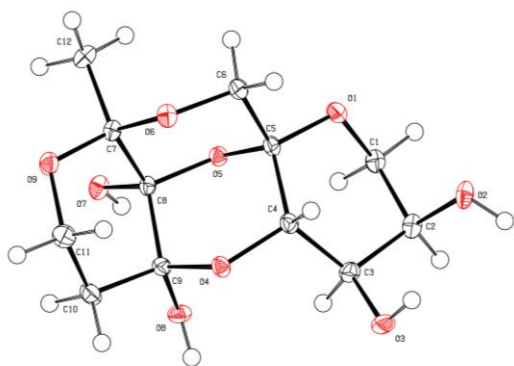


图 3 化合物 1 的 X-射线晶体结构

Fig. 3 X-ray crystal structure of compound 1

单晶数据如下：斜方晶系，空间群 $P2_12_12_1$ (no. 19)，晶胞参数： $a=0.68741(4)$ nm， $b=0.73398(5)$ nm， $c=2.44544(15)$ nm，体积= $1.23384(13)$ nm³， $Z=4$ ，计算密度= 1.649 g/cm³。

化合物 2：红色粉末；HR-ESI-MS m/z : 351.083 5 $[M+Na]^+$ （计算值为 $C_{18}H_{16}O_6Na$ ，351.083 9），确定其分子式为 $C_{18}H_{16}O_6$ ，计算不饱和度为 11。旋光

度为 $[\alpha]_D^{25} + 1.31$ (c 0.35, MeOH)；UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 205.5 (3.42)、255.5 (3.11)，提示有苯环的存在，365.5 (3.19)、437.5 (3.23)，提示有共轭系统的存在；IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 340, 1 608, 1 511, 1 367, 1 251, 1 164, 1 022, 833，提示有羟基（3 340 cm⁻¹）、羰基（1 608 cm⁻¹）和苯环（1 511 cm⁻¹）的存在；CD (MeOH) 图谱 212.4 nm (+8.22)、234.8 nm (-4.74)、257.8 nm (+5.73)、347.9 nm (-4.50)、391.9 nm (+4.43)。

¹H-NMR 数据（表 2）表明化合物 2 存在 8 个芳香或烯质子，分别为 δ_{H} 7.71 (d, $J=8.4$ Hz, H-2'', 6''), 7.31 (d, $J=2.4$ Hz, H-7), 6.98 (d, $J=3.6$ Hz, H-3'), 6.76 (d, $J=8.4$ Hz, H-3'', 5''), 6.55 (d, $J=3.6$ Hz, H-4'), 6.35 (s, H-6)。¹³C-NMR 谱图显示化合物 2 具有 2 个亚甲基、9 个次甲基（包括 8 个烯烃碳）和 7 个季碳。

¹H-NMR 谱显示了 1 组 AA'BB'信号 δ_{H} 7.71 (d,

表 2 化合物 2 的 NMR 数据 (600/150 MHz, Methanol-*d*₄)

Table 2 NMR data of compound 2 (600/150 MHz,

Methanol-*d*₄)

碳位	δ_{H}	δ_{C}
2		149.3
3		189.5
4		130.0
5	5.77 (1H, m)	84.0
6	6.35 (1H, s)	108.5
7	7.31 (1H, d, $J=2.4$ Hz)	120.7
8	4.11 (1H, dd, $J=12.6, 2.4$ Hz); 3.93 (1H, dd, $J=12.6, 4.8$ Hz)	65.1
2'		151.8
3'	6.98 (1H, d, $J=3.6$ Hz)	122.0
4'	6.55 (1H, d, $J=3.6$ Hz)	111.8
5'		161.4
6'	4.63 (2H, d, $J=5.4$ Hz)	57.6
1''		125.7
2'', 6''	7.71 (2H, d, $J=8.4$ Hz)	133.5
3'', 5''	6.76 (2H, d, $J=8.4$ Hz)	117.6
4''		162.3

$J=8.4$ Hz, H-2'', 6'') 和 6.76 (d, $J=8.4$ Hz, H-3'', 5''), HMBC 谱 (图 4) 中显示 H-6 ($\delta_{\text{H}} 6.35$) 与 C-2'', 6' ($\delta_{\text{C}} 133.5$) 有相关, 提示苯环的存在。此外, $\delta_{\text{H}} 6.98$ (d, $J=3.6$ Hz, H-3') 与 $\delta_{\text{H}} 6.55$ (d, $J=3.6$ Hz, H-4') 也表现出 2 个相互耦合的双烯烃信号。 ^{13}C -NMR 谱中存在 2 个次甲基烯碳信号 $\delta_{\text{C}} 111.8$ 和 122.0 与 2 个连氧烯季碳 $\delta_{\text{C}} 151.8$ 和 $\delta_{\text{C}} 161.8$, 提示呋喃环的存在。HMBC 谱图显示 $\delta_{\text{H}} 4.63$ (d, $J=5.4$ Hz, H-6') 与 C-4' ($\delta_{\text{C}} 111.8$) 和 C-5' ($\delta_{\text{C}} 161.4$) 相关, $\delta_{\text{H}} 7.31$ (d, $J=2.4$ Hz, H-7) 与 C-2' ($\delta_{\text{C}} 151.8$) 和 C-3' ($\delta_{\text{C}} 122.0$) 相关, 表明其存在 2' 位取代的 5'-羟甲基呋喃。另外, ^1H -NMR 谱图显示还存在 1 个亚甲基 $\delta_{\text{H}} 3.93, 4.11$ (1H, dd, $J=12.6, 4.8$ Hz; 1H, dd, $J=12.6, 2.4$ Hz, H-8) 和 1 个次甲基 $\delta_{\text{H}} 5.77$ (1H, m, H-5), 提示其与氧原子相连; ^1H - ^1H COSY 谱表明 H-8 和 H-5 相关。HMBC 谱图显示 H-8 ($\delta_{\text{H}} 3.93, 4.11$) 分别与 C-4 (δ_{C}

130.0) 和 C-5 ($\delta_{\text{C}} 84.0$) 相关, H-5 ($\delta_{\text{H}} 5.77$) 分别与 C-2 ($\delta_{\text{C}} 149.3$)、C-3 ($\delta_{\text{C}} 189.5$)、C-4 ($\delta_{\text{C}} 130.0$)、C-7 ($\delta_{\text{C}} 120.7$) 和 C-8 ($\delta_{\text{C}} 65.1$) 相关, H-6 ($\delta_{\text{H}} 6.35$) 分别与 C-2 ($\delta_{\text{C}} 149.3$) 和 C-3 ($\delta_{\text{C}} 189.5$) 相关, H-7 ($\delta_{\text{H}} 7.31$) 分别与 C-3 ($\delta_{\text{C}} 189.5$)、C-4 ($\delta_{\text{C}} 130.0$) 和 C-5 ($\delta_{\text{C}} 84.0$) 相关。这表明化合物 **2** 中存在 1 个 2 位, 4 位和 5 位取代的二氢呋喃-3-酮^[9], 且通过 C-6 位与 1,4-二取代苯基单元相连, 通过 C-7 位与 5'-羟甲基呋喃相连。

在 NOESY 谱 (图 4) 中 $\delta_{\text{H}} 7.31$ (d, $J=2.4$ Hz, H-7) 与 $\delta_{\text{H}} 5.77$ (1H, m, H-5) 没有明显的相关, $\delta_{\text{H}} 6.98$ (d, $J=3.6$ Hz, H-3') 与 $\delta_{\text{H}} 5.77$ (m, H-5) 和 $\delta_{\text{H}} 4.11, 3.93$ (H-8) 没有明显相关, 这表明 C-7 位双键为 *E* 构型。接下来, 通过 MMFF94 分子力场搜索构象, 在 Gaussian 09 软件包中的 B3LYP/6-31G (2d, p) 水平进行 DFT 计算。NMR 计算确定 C-6 位和 C-7 位双键构型 (图 5), 化合物 **2** 在 C-6 位为 *Z* 构型、C-7 位为 *E* 构型组合时, 碳谱拟合 ($R^2=0.996$) 和氢谱拟合 ($R^2=0.985$) 结果最好。此外, 在 MeOH 中进行 B3LYP/6-311G (d, p) 水平的 TDDFT 计算, 并通过 Spec Dis1.71 进行拟合。将计算 ECD 曲线与实验 ECD 曲线进行拟合确定 C-5 位构型。拟合结果显示 (图 6), 化合物 **2** 的 C-7 位的双键是 *E* 构型, C-6 位的双键是 *Z* 构型, C-5 位的绝对构型为 5*S*。因此, 确认化合物 **2** 的结构为 (5*S*)-5-(羟基甲基)-4-[(*E*)-[5'-(羟基甲基)呋喃-2'-基]甲亚基]-2-[(*Z*)-(4''-

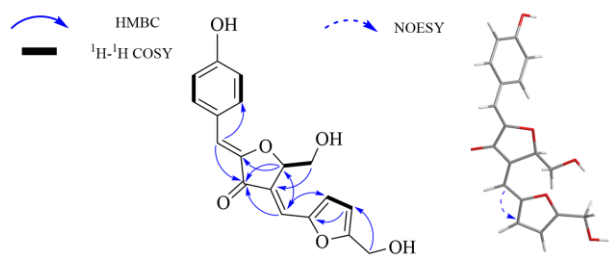


图 4 化合物 **2** 的关键 HMBC、 ^1H - ^1H COSY 和 NOESY 信号
Fig. 4 Key HMBC, ^1H - ^1H COSY and NOESY correlations of compound **2**

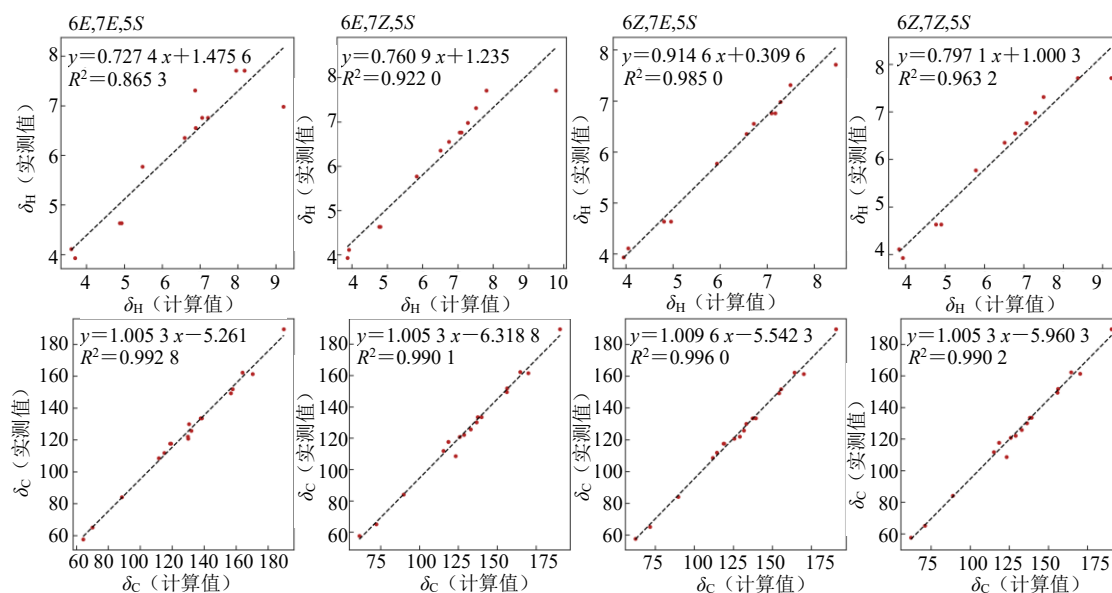


图 5 化合物 **2** 的 NMR 拟合
Fig. 5 NMR fitting of compound **2**

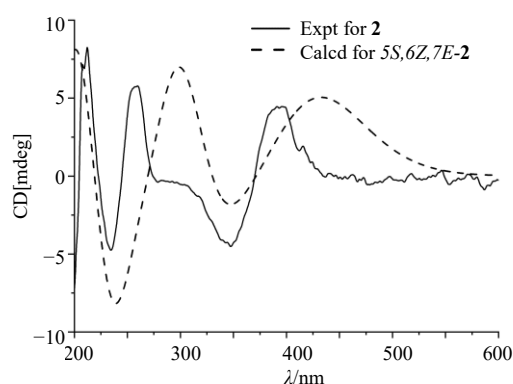


图 6 化合物 2 的实测和计算 ECD 图谱

Fig. 6 Experimental and calculated ECD of compound 2

羟基苯基)甲亚基]四氢呋喃-3-酮,经 SciFinder 检索可知,化合物 2 为新化合物,将此化合物命名为手参呋喃 B (gymnafuran B)。

化合物 3: 淡黄色油状物。HR-ESI-MS m/z : 149.021 1 $[M+Na]^+$; 分子式为 $C_6H_6O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 9.54 (1H, s, 2-CHO), 7.39 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-3), 6.59 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-4), 4.61 (2H, s, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 179.4 (2-CHO), 163.0 (C-2), 153.6 (C-5), 125.0 (C-3), 110.9 (C-4), 57.5 (C-6)。以上波谱数据与文献基本一致^[20],故确定化合物 3 为 5-羟甲基糠醛。

化合物 4: 无色针状晶体 (二氯甲烷)。HR-ESI-MS m/z : 257.042 1 $[M+Na]^+$; 分子式为 $C_{12}H_{10}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.62 (2H, s, CHO), 7.20 (2H, d, $J = 3.6$ Hz, H-4, 4'), 6.56 (2H, d, $J = 3.0$ Hz, H-3, 3'), 4.63 (4H, s, H-6, 6'); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 177.9 (CHO), 157.3 (C-2, 2'), 152.9 (C-5, 5'), 122.1 (C-4, 4'), 112.0 (C-3, 3'), 64.7 (C-6')。以上波谱数据与文献基本一致^[21],故确定化合物 4 为双-(5-甲酰基糠基)醚。

化合物 5: 棕黄色粉末。HR-ESI-MS m/z : 321.093 0 $[M+Na]^+$; 分子式为 $C_{14}H_{18}O_7$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.22 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 7.00 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-3'), 6.54 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-4'), 5.61 (1H, brs, H-5), 5.13 (1H, s, H-2), 4.62 (2H, s, H-6'), 4.19 (1H, m, H-6), 3.76 (1H, m, H-9a), 3.67 (1H, m, H-9b), 3.53 (2H, m, H-7), 1.21 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-10); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 199.8 (C-3), 161.4 (C-5'), 151.4 (C-2'), 127.6 (C-4), 122.7 (C-8), 121.9 (C-3'), 111.7 (C-4'), 100.0 (C-2), 82.7 (C-5), 75.6 (C-6),

64.9 (C-9), 63.2 (C-7), 57.6 (C-6'), 15.5 (C-10)。以上波谱数据与文献基本一致^[19],故确定化合物 5 为 pollenfuran A。

化合物 6: 棕黄色粉末。HR-ESI-MS m/z : 321.093 7 $[M+Na]^+$; 分子式为 $C_{14}H_{18}O_7$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.30 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 7.07 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-3'), 6.53 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-4'), 5.55 (1H, dd, $J = 4.8, 2.4$ Hz, H-5), 5.00 (1H, s, H-2), 4.61 (2H, s, H-6'), 4.07 (1H, m, H-6), 3.93 (1H, m, H-9a), 3.68 (3H, m, H-9b, 7), 1.26 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-10); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 198.9 (C-3), 161.4 (C-5'), 151.6 (C-2'), 127.6 (C-4), 123.3 (C-8), 122.9 (C-3'), 111.7 (C-4'), 100.1 (C-2), 82.8 (C-5), 76.0 (C-6), 66.1 (C-9), 64.1 (C-7), 57.6 (C-6'), 15.4 (C-10)。以上波谱数据与文献基本一致^[19],故确定化合物 6 为 pollenfuran B。

化合物 7: 浅黄色油状物。HR-ESI-MS m/z : 417.114 5 $[M+Na]^+$; 分子式为 $C_{19}H_{22}O_9$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 9.55 (1H, s, H-6), 7.37 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-3), 7.28 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 7.08 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.63 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-4), 4.90 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 4.56 (2H, s, H-7'), 4.53 (2H, s, H-7), 3.89 (1H, dd, $J = 12.0, 2.4$ Hz, H-6'a), 3.70 (1H, dd, $J = 12.0, 5.4$ Hz, H-6'b), 3.44 (4H, m, H-2''~5''); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 179.6 (C-6), 160.1 (C-5), 158.9 (C-1), 154.2 (C-2), 132.8 (C-4'), 130.6 (C-3', 5'), 124.4 (C-3), 117.7 (C-2', 6'), 112.7 (C-4), 102.3 (C-1''), 78.1 (C-3''), 78.0 (C-5''), 74.9 (C-2''), 73.3 (C-7'), 71.4 (C-4''), 64.6 (C-7), 62.5 (C-6'')。以上波谱数据与文献报道基本一致^[22],故鉴定化合物 7 为 5-((4-O- β -D-吡喃葡萄糖基苄氧基)甲基)-呋喃-2-甲醛。

3.2 单体化合物神经保护活性结果

采用 PC12 细胞建立 OGD/R 诱导的 PC12 细胞损伤模型,评价单体化合物体外神经保护活性。细胞毒性评价结果表明 (图 7),化合物 2 在 12.5、25 和 50 μ mol/L 浓度下具有细胞毒性,在 1.062 5、3.125 和 6.25 μ mol/L 浓度下对 PC12 细胞活力无影响,其余化合物在 1.062 5、3.125、6.25、12.5、25、50 μ mol/L 下与对照组相比无显著性差异,对 PC12 细胞活力无影响。神经保护活性评价结果 (图 8) 显示,与 OGD/R 组相比,阳性药依达拉奉和化合物 1 在 12.5、25、50 μ mol/L 浓度下能显著提高细

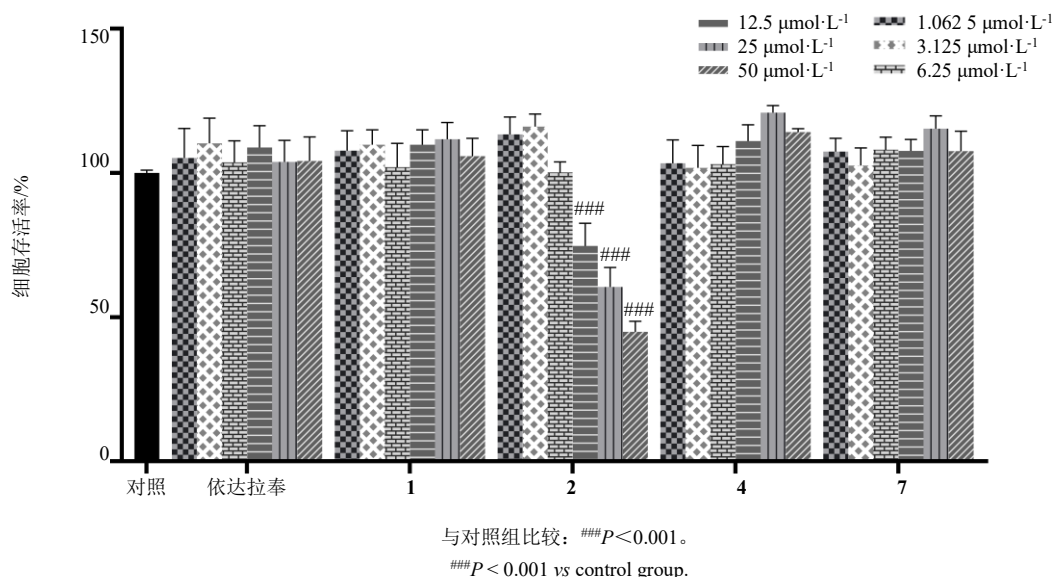


图 7 单体化合物对正常培养的 PC12 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of compounds on viability of normal cultured PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

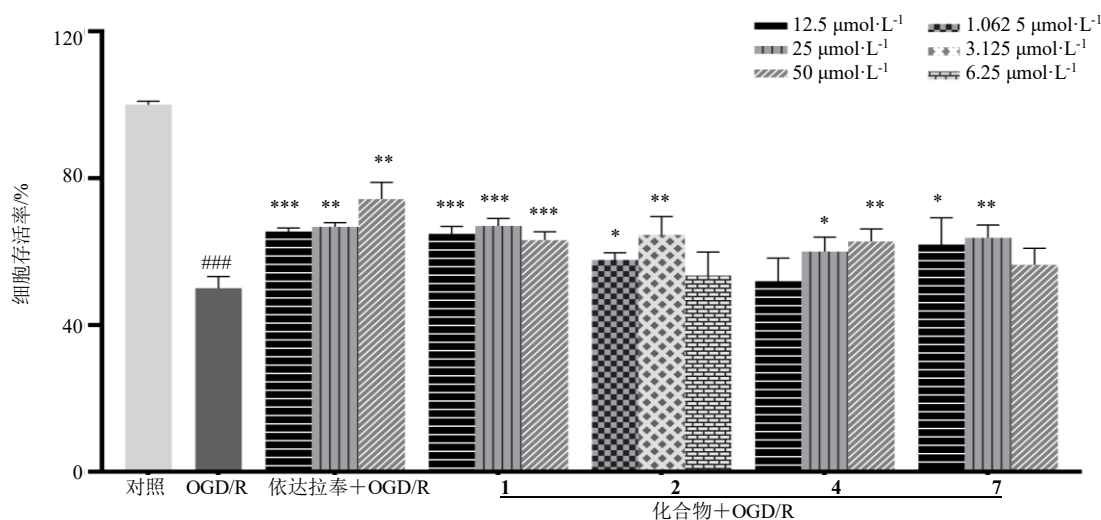


图 8 单体化合物对 OGD/R 损伤的 PC12 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 8 Effect of compounds on viability of OGD/R-induced PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

胞活力, 化合物 2 在 1.0625、3.125 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下能显著提高细胞活力, 化合物 4 在 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下能显著提高细胞活力, 化合物 7 在 12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下能显著提高细胞活力。

4 讨论

本研究通过对手参 95%乙醇提取物化学成分进行分离和鉴定, 共得到 7 个单体化合物, 其中化合物 1 和 2 为新化合物, 化合物 4~7 为首次从手参属中分离得到。此外, 前人仅在手参中发现 1 个呋喃类化合物 (5-羟甲基糠醛) [2], 本研究中, 分离

得到的化合物 2~7 均为呋喃类; 同时, 化合物 2、4 和 7 能显著提高 OGD/R 损伤的 PC12 细胞活力, 提示呋喃类化合物可能是手参中一类具有神经保护作用的活性成分, 值得被关注。手参与天麻 *G. elata* Bl. 都为兰科兰亚科药用植物。化合物 7 为首次从天麻中分离得到 [22], 本研究从手参中再次发现化合物 7, 相关研究结果为近缘种具有相似甚至相同的化学成分这一植物化学分类学原理提供了依据。本研究丰富了手参的化学成分和生物活性研究结果, 为手参的进一步开发利用提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lin M, Xiong H, Xiang X C, *et al.* The effect of plant geographical location and developmental stage on root-associated microbiomes of *Gymnadenia conopsea* [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1257.
- [2] Shang X F, Guo X, Liu Y, *et al.* *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br.: A systemic review of the ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology of an important Asian folk medicine [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 24.
- [3] Wang X, Zhong X J, Zhou N, *et al.* Rapid characterization of chemical constituents of the tubers of *Gymnadenia conopsea* by UPLC-orbitrap-MS/MS analysis [J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 898.
- [4] 刘玉仙, 王敏, 张金魁, 等. 手参属藏药材研究进展及质量标记物预测分析 [J]. 中国药物化学杂志, 2024, 34(2): 139-156.
- [5] 李敏, 郭顺星, 王春兰, 等. 手参块茎化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(22): 1696-1698.
- [6] 李敏, 郭顺星, 王春兰, 等. 手参块茎化学成分研究 II [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(6): 409-412.
- [7] Zi J C, Li S, Liu M T, *et al.* Glycosidic constituents of the tubers of *Gymnadenia conopsea* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(5): 799-805.
- [8] Matsuda H, Morikawa T, Xie H H, *et al.* Antiallergic phenanthrenes and stilbenes from the tubers of *Gymnadenia conopsea* [J]. *Planta Med*, 2004, 70(9): 847-855.
- [9] 岳正刚, 瞿佳辰, 朱承根, 等. 手掌参的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21): 2852-2861.
- [10] 李帅, 王栋, 匡海学, 等. 手掌参的化学成分研究 [J]. 中草药, 2001, 32(1): 18.
- [11] Zi J C, Lin S, Zhu C G, *et al.* Minor constituents from the tubers of *Gymnadenia conopsea* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(6): 477-484.
- [12] 金亮, 王秀兰. 不同炮制方法对手参滋补强壮作用的影响 [J]. 中国民族医药杂志, 2009, 15(1): 28-29.
- [13] 周雅楠, 杨彬, 戴景峰, 等. 藏药旺拉提取物 CE 保护 A β 25-35 介导的大鼠前额叶神经元损伤的作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1065-1068.
- [14] 周欣欣, 熊平, 林志成, 等. 手参镇静催眠作用的实验研究 [J]. 中国现代中药, 2009, 11(9): 33-35.
- [15] 尚林, 张国燕, 李建菊, 等. 藏药旺拉多糖对免疫抑制小鼠免疫活性的调节 [J]. 中药与临床, 2015, 6(3): 43-45.
- [16] 李红兵, 刘晔玮, 李立, 等. 手掌参不同溶剂提取物清除自由基活性评价 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(12): 3253-3255.
- [17] Ostojić J, Ljubojević M, Narandžić T, *et al.* *In vitro* culture conditions for asymbiotic germination and seedling development of *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich. and *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br [J]. *S Afr N J Bot*, 2022, 150: 829-839.
- [18] Qin J, Xue S Y, Xu C, *et al.* Bioactivity-guided isolation of antistroke compounds from *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br [J]. *Molecules*, 2024, 29(18): 4389.
- [19] Guo J L, Yang Y N, He J, *et al.* Two new furan derivatives from bee-collected rape pollen [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(10): 930-933.
- [20] Zhou H F, Jian R J, Kang J, *et al.* Anti-inflammatory effects of caper (*Capparis spinosa* L.) fruit aqueous extract and the isolation of main phytochemicals [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(24): 12717-12721.
- [21] Feng X L, Lu J C, Xin H L, *et al.* Anti-arthritis active fraction of *Capparis spinosa* L. fruits and its chemical constituents [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2011, 131(3): 423-429.
- [22] Li Z, Wang Q, Ouyang H, *et al.* New compounds with neuroprotective activities from *Gastrodia elata* [J]. *Phytochemistry Lett*, 2016, 15: 94-97.

[责任编辑 王文倩]