

药西瓜中 1 个新的葫芦烷型三萜皂苷

赵志强¹, 安学瑞¹, 于雪慧², 孙禹薇¹, 杨鑫¹, 刘伟^{1,2*}

1. 伊犁师范大学 新疆维吾尔自治区教育厅天然产物化学与应用重点实验室, 新疆 伊宁 835000

2. 伊犁师范大学 伊犁河谷资源植物保护与利用重点实验室, 新疆 伊宁 835000

摘要: 目的 研究药西瓜 *Citrullus colocynthis* 的化学成分及其体外抗炎活性。方法 综合运用正相硅胶、ODS、Sephadex LH-20 凝胶及半制备型高效液相色谱等多种色谱技术进行分离纯化, 依据 HR-ESI-MS、IR、NMR 等谱学技术确定化合物结构。采用 CCK-8 法筛选化合物对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 的细胞毒性, 通过脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型对低毒性化合物进行抗炎活性评价。结果 从药西瓜醋酸乙酯相中分离得到 9 个化合物, 分别鉴定为 (20*R*,23*E*)-2-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-20-hydroxycucurbita-1,5,23-triene-25-acetoxy-3,11,16,22-tetraone (1)、葫芦素 E-2-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷 (2)、colocynthenin G (3)、khekadaengoside G (4)、khekadaengoside H (5)、葫芦素 E (6)、colocynin D (7)、endecaphyllacin B (8) 和 colocynin A (9)。化合物 1~3 和 6 (40 μmol/L) 对 RAW264.7 细胞显示出明显的细胞毒性, 化合物 4、5、7~9 对 LPS 诱导下 RAW264.7 细胞释放 NO 具有一定的抑制作用, IC₅₀ 为 (21.49±3.48)~(39.97±3.50) μmol/L。结论 化合物 1 为新的葫芦烷型三萜皂苷, 命名为葫芦素酮 A (cucurbitacone A), 化合物 8 为首次从该植物分离得到; 化合物 4、5、7~9 表现出一定的抗炎活性。

关键词: 药西瓜; 葫芦烷型三萜皂苷; 抗炎; 细胞毒性; 葫芦素酮 A; 葫芦素 E

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)24-8328-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.003

A new cucurbitane-type triterpenoid glycoside from *Citrullus colocynthis*

ZHAO Zhiqiang¹, AN Xuerui¹, YU Xuehui², SUN Yuwei¹, YANG Xin¹, LIU Wei^{1,2}

1. Key Laboratory of Natural Product Chemistry and Application at Education Department of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Yili Normal University, Yining 835000, China

2. Key Laboratory for Resource Plants Protection and Utilization of Yili Valley in Xinjiang, Yili Normal University, Yining 835000, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents of *Citrullus colocynthis* and their anti-inflammatory activities. **Methods** The compounds were isolated and purified by using a positive silica gel, ODS, Sephadex LH-20, and semi-preparative HPLC, and their structures were elucidated by HR-ESI-MS, IR, NMR. Screening cytotoxicity of all compounds to RAW264.7 cells using the CCK-8 method, and evaluating the anti-inflammatory activity of low toxicity compounds through the RAW264.7 cell inflammatory model induced by lipopolysaccharide (LPS). **Results** A total of nine compounds were isolated from the ethyl acetate phase of *C. colocynthis* and identified as (20*R*,23*E*)-2-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-20-hydroxycucurbita-1,5,23-triene-25-acetoxy-3,11,16,22-tetraone (1), cucurbitacin E 2-*O*-β-*D*-glucopyranoside (2), colocynthenin G (3), khekadaengoside G (4), khekadaengoside H (5), cucurbitacin E (6), colocynin D (7), endecaphyllacin B (8), colocynin A (9). Compounds 1, 2, 3 and 6 (40 μmol/L) showed significant cytotoxicity to RAW264.7 cells, while compounds 4, 5, 7—9 exhibited a certain inhibitory effect on the release of NO by RAW264.7 cells induced by LPS with IC₅₀ value ranging from (21.49±3.48) to (39.97±3.50) μmol/L. **Conclusion** Compound 1 is a new compound and named cucurbitacone A, and compound 8 is first isolated from the plant. Compounds 4, 5, 7—9 show certain anti-inflammatory activity.

Key words: *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad.; cucurbitane-type triterpene glycosides; anti-inflammation; cytotoxicity; cucurbitacone A; cucurbitacin E

收稿日期: 2024-08-20

基金项目: 伊犁师范大学提升学科综合实力专项项目 (22XKZZ08); 国家自然科学基金资助项目 (82060774)

作者简介: 赵志强 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为民族药药效物质基础。E-mail: ZZQ113961@126.com

*通信作者: 刘伟, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为民族药药效物质基础。E-mail: ucasliuwei@126.com

药西瓜是葫芦科西瓜属植物药西瓜 *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. 的成熟果实, 为卫生部药品标准《维吾尔药分册》收录的经典药材^[1-2]。药西瓜在传统医学中应用历史悠久, 广泛用于糖尿病、抗菌、哮喘、支气管炎及胃肠道疾病的治疗^[3-5], 其潜在的生物学和药理学价值在近年来的科学研究中逐渐显露。药西瓜化学成分的系统研究表明, 其主要成分包括葫芦素、生物碱、黄酮和甾体皂苷等。现代药理研究表明其具有抗癌^[6-7]、抗炎^[8]、免疫调节^[9]等生物活性。为进一步研究药西瓜中的化学成分, 对其甲醇提取物的醋酸乙酯萃取部分进行分离纯化, 得到 9 个化合物, 通过多种谱学技术并结合文献比对, 分别鉴定为 (20*R*,23*E*)-2-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-20-hydroxycucurbita-1,5,23-triene-25-acetoxy-3,11,16,22-tetraone (**1**)、葫芦素 E-2-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 (cucurbitacin E 2-*O*- β -*D*-glucopyranosid, **2**)、colocynthenin G (**3**)、khekadaengoside G (**4**)、khekadaengoside H (**5**)、葫芦素 E (cucurbitacin E, **6**)、colocynin D (**7**)、endecaphyllacin B (**8**) 和 colocynin A (**9**)。其中, 化合物 **1**~**5** 为葫芦烷型三萜皂苷, 化合物 **6** 为葫芦烷型三萜, 化合物 **7**~**9** 为葫芦烷型降三萜^[10]。化合物 **1** 为新的葫芦烷型三萜皂苷, 并命名为葫芦素酮 A (cucurbitacone A), 化合物 **8** 为首次从该植物中分离。体外抗炎活性测试结果显示, 化合物 **1**~**3**、**6** (40 $\mu\text{mol/L}$) 对 RAW264.7 细胞显示出明显的细胞毒性, 化合物 **4**、**5**、**7**~**9** 对脂多糖诱导下 RAW264.7 细胞释放 NO 具有一定的抑制作用, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 值分别为 (21.49 $\pm$ 3.48)、(25.37 $\pm$ 3.12)、(35.35 $\pm$ 3.53)、(38.52 $\pm$ 2.91)、(39.97 $\pm$ 3.50) $\mu\text{mol/L}$ 。与阳性药地塞米松相比, 上述化合物显示出一定的抗炎活性。

1 仪器与材料

Bruker 400 MHz 型核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); Autopol IV 型旋光仪 (美国 Rudolph 公司); Primaide 半制备型高效液相色谱仪 (日本日立高新技术公司); Hei-VAP-Precision 型旋转蒸发仪 (德国 Heidolph 科学仪器有限公司); Cary 630 型红外光谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); Q-Exactive 型高分辨质谱仪、Multiskan GO 型全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司); KQ5200DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); BSA 12s 型电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; MiniQ-6C 型离心机

(上海巴玖事业有限公司); YMC-Pack ODS-A column 型半制备色谱柱 (250 mm $\times$ 10.0 mm, 5 μm)、YMC-Pack ODS-A 型分析柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、ODS-A-HG 型填料 (日本 YMC 公司); Sephadex LH-20 型凝胶填料 (瑞典 Ge Healthcare Bio Sciences 公司); MCI CHP20P 型填料 (75~150 μm , 日本三菱化学); 300~400 目硅胶、TLC 硅胶薄层板 (青岛海洋化工有限公司); 甲醇、乙腈 [色谱纯, Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司]; 甲醇、二氯甲烷、石油醚、醋酸乙酯 (分析纯)、DMEM 高糖培养基 (上海泰坦科技股份有限公司); 脂多糖、一氧化氮试剂盒、DMSO、胎牛血清、RAW264.7 小鼠巨噬细胞 (上海碧云天生物科技有限公司); CCK-8 试剂盒、双抗 (青霉素/链霉素), 武汉塞维尔生物科技有限公司。

药西瓜果实于 2023 年 3 月购自中国新疆绿宝药业有限公司, 经伊犁师范大学生物科学与技术学院杨晓绒教授鉴定为药西瓜 *C. colocynthis* (L.) Schrad. 的干燥果实。凭证标本 (HX-YXG-230401) 保存于伊犁师范大学新疆维吾尔自治区教育厅天然产物化学与应用重点实验室。

2 方法

2.1 提取与分离

干燥的药西瓜果实 4 kg, 于室温下用 12 L 甲醇浸提 (7 d $\times$ 3)。合并浸提液减压浓缩得到浸膏 343.8 g。随后将浸膏混悬于 1 L 水中, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取。经减压浓缩得石油醚组分 12.5 g、醋酸乙酯组分 85.4 g、正丁醇组分 71.7 g 及水相 85.1 g。醋酸乙酯组分 (84 g) 经 MCI 柱色谱 (甲醇-水 20:80~100:0) 梯度洗脱得 8 个组分 Fr. A~H。利用正相硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 9:1~1:1) 对 Fr. E 梯度洗脱得 5 个组分 Fr. E1~E5。Fr. E2 经 MCI 柱色谱 (甲醇-水 46:54~100:0) 梯度洗脱得 6 个组分 (Fr. E2a~E2f)。通过薄层色谱 (石油醚-醋酸乙酯 2:1) 对 Fr. E2f 纯化得 2 个组分 (Fr. E2f1 和 Fr. E2f2)。Fr. E2f2 经半制备液相色谱 (乙腈-水 58:42~64:36, 0~25 min) 分离得化合物 **6** (6.0 mg, t_{R} =32 min)。Fr. E3 经硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 7:1~3:1) 梯度洗脱得组分 Fr. E3a~E3c。Fr. E3b 经半制备液相色谱 (甲醇-水, 0~17 min, 58:42~64:36; 17~23 min, 64:36~64:36) 纯化得化合物 **7** (3.0 mg, t_{R} =17.5 min) 和 **8** (8.2 mg, t_{R} =22 min)。Fr. E3c 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇) 纯化得组分 Fr. E3c1。Fr. E3c1

经半制备液相色谱(67%甲醇-水)分离得化合物 9 (7.1 mg, t_R =15 min)。Fr. E5 经 ODS 柱色谱(甲醇-水 40:60~100:00)梯度洗脱得 9 个组分(Fr. E5a~E5i)。Fr. E5e 通过薄层色谱(二氯甲烷-甲醇 10:1)纯化得 5 个组分(Fr. E5e1~E5e5)。Fr. E5e2 经半制备液相色谱(63%甲醇-水)分离得化合物 2 (18.5 mg, t_R =14.5 min)和 3 (12.1 mg, t_R =18 min)。Fr. E5f 经正相硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇 50:1~25:1)梯度洗脱得 4 个组分(Fr. E5f1~E5f4)。Fr. E5f4 经半制备液相色谱(0~30 min, 甲醇-水 60:40~70:30)分离得化合物 1 (4.8 mg, t_R =18 min)。Fr. E5h 经正相硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇 15:1~8:1)梯度洗脱得 3 个组分(Fr. E5h1~E5h3)。通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(甲醇)对 Fr. E5h2 纯化得组分 Fr. E5h2A 后经半制备液相色谱(69%甲醇-水)分离得化合物 4 (70 mg, t_R =22.5 min)和 5 (23.1 mg, t_R =24.3 min)。

2.2 细胞毒性检测

为避免因细胞毒性引起的抗炎活性假阳性结果,采用 CCK-8 法评估所有化合物的细胞毒性。根据文献报道方法^[11-12],将 RAW264.7 细胞(密度约为 2×10^4 个/孔)接种于 96 孔板中,并在 5% CO_2 和 37 °C 的条件下培养 24 h。之后,弃去 96 孔板中的培养基,添加不同浓度的待测样品,并设置空白对照组、对照组和阳性对照组,每组设 6 个复孔,继续培养 24 h 之后,弃去培养基,每孔加入含有 CCK-8 的培养基(10%, 100 μL),继续孵育 1~2 h 后,使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(A)值。

2.3 抗炎活性检测

通过建立化合物抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 模型来评价化合物的抗炎活性。将 RAW264.7 细胞以 100 μL /孔的方法接种至 96 孔板(2×10^4 个/孔)中,并在 5% CO_2 、37 °C 条件下培养 24 h。之后,弃去培养基,实验组添加不同浓度(10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)的待测样品 50 μL /孔;阳性对照组添加浓度为 10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 dexamethasone 50 μL /孔,每个浓度设置 3 个复孔;空白组、对照组加入培养基(50 μL /孔)后继续培养 2 h。之后加入含 LPS (2.0 $\mu\text{g/mL}$, 50 μL) 的培养基(空白组除外),继续培养 24 h 后取上清液 50 μL 与 50 μL Griess I 试剂混合,避光静置 5 min 后加入 50 μL Griess II 试剂,再次避光静置 5 min 后使用酶标仪在 540 nm 波长下测定 A 值。

3 结果

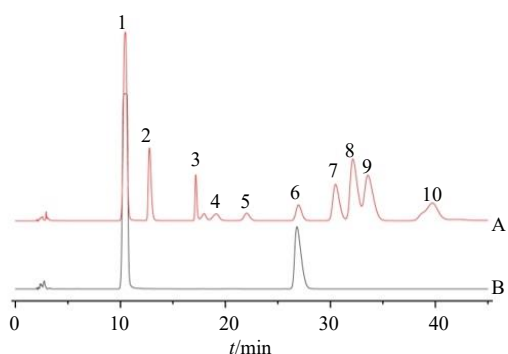
3.1 结构鉴定

化合物 1: 白色无定型粉末, $[\alpha]_D^{20}$ -62.4°(c 0.16, MeOH), 紫外显示最大吸收波长为 204 nm 和 224 nm, 碘缸染色呈棕褐色。HR-ESI-MS 显示 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 739.330 2 (计算值 $\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{O}_{13}\text{Na}$ 为 739.330 6), 结合 NMR 数据, 确定其分子式为 $\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{O}_{13}$, 不饱和度为 13。红外光谱显示化合物含有羟基(3 342 cm^{-1})和羰基(1 685 cm^{-1})官能团。在 ^1H -NMR 谱(表 1)的高场区观察到 8 个 s 峰甲基信号(δ_{H} 1.08, 1.09, 1.27, 1.29, 1.32, 1.35, 1.55, 1.56); 1 个乙酰基质子信号 δ_{H} 2.00 (3H, s); 4 个烯烃质子信号 δ_{H} 5.84 (1H, brs), 6.14 (1H, d, J =2.6 Hz), 6.93 (1H, d, J =16.0 Hz), 6.94 (1H, d, J =15.9 Hz); 在 δ_{H} 3.30~4.80 存在多个质子信号, 其中化学位移 δ_{H} 4.64 (1H, d, J =6.9 Hz)和 δ_{C} 101.2 为典型的葡萄糖端基氢(H-1')、碳(C-1')信号, 结合化合物 1 水解、单糖衍生化的 HPLC 分析结果(图 1), 确定化合物结构中存在 1 个 β -D-葡萄糖片段^[13-14]。化合物 1 的 ^{13}C -NMR 显示 36 个碳信号, 根据 HSQC 谱图归类为 9 个甲基(包括 1 个乙酰基)、2 个亚甲基、7 个次甲基(包括 4 个 sp^2 杂化碳)、12 个季碳(包括 2 个 sp^2 杂化碳和 5 个羰基碳)及葡萄糖片段上 6 个碳信号, 通过与文献报道^[15]对比, 分析化合物 1 可能为葫芦烷型三萜皂苷。

通过 ^1H - ^1H COSY 与 HMBC 谱图的解析, 确定其平面结构。在 COSY 谱中获得了 4 个自旋耦合的结构片段 H-6/H-7/H-8、H-1/H-10、H-4'/H-5'/H-6'、H-1'/H-2' (图 2)。HMBC 谱中, H₃-28/29 与 C-3 (δ_{C} 199.7)、C-4 (δ_{C} 50.2)、C-5 (δ_{C} 137.5) 相关; H-1 与 C-3、C-5 相关; H₃-19 与 C-8 (δ_{C} 42.6)、C-9 (δ_{C} 51.3)、C-10 (δ_{C} 36.5)、C-11 (δ_{C} 214.8) 相关; H₃-18 与 C-12 (δ_{C} 49.1)、C-13 (δ_{C} 48.9)、C-14 (δ_{C} 45.5)、C-17 (δ_{C} 63.5) 相关; H₃-30 与 C-8、C-14、C-15 (δ_{C} 50.5) 相关; H-17 与 C-16 (δ_{C} 215.9)、C-20 (δ_{C} 80.8) 相关; H-15 与 C-13、C-16 相关; H₃-21 与 C-17、C-20、C-22 (δ_{C} 205.7) 相关; H-23 与 C-22、C-24 (δ_{C} 152.0) 相关; H-24 与 C-25 (δ_{C} 81.1) 相关; H₃-26/27 与 C-24、C-25 相关, 根据 HMBC 相关将这些片段与其它官能团相连接, 得到三萜苷元结构; H-1' 与 C-2 存在 HMBC 相关, 确定葡萄糖片段连接在 A 环的 C-2 位。乙酰基上的甲基 (δ_{H} 2.00) 只与羰基碳 (δ_{C} 171.8) 相关, 无法确定其连接位置。参考葫芦烷型三萜的侧链结构^[16], 推断乙酰基与 25-OH 反应成酯

表 1 化合物 1 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据 (400/100 MHz, CD_3OD)
Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound 1 (400/100 MHz, CD_3OD)

碳位	δ_{H}	δ_{C}	碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	6.14 (1H, d, $J = 2.6$ Hz)	123.5	20		80.8
2		147.3	21	1.35 (3H, s)	24.9
3		199.7	22		205.7
4		50.2	23	6.94 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	121.6
5		137.5	24	6.93 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	152.0
6	5.84 (1H, brs)	122.1	25		81.1
7	2.08 (1H, m), 2.46 (1H, m)	24.7	26	1.55 (3H, s)	26.9
8	2.36 (1H, m)	42.6	27	1.56 (3H, s)	26.5
9		51.3	28	1.27 (3H, s)	28.2
10	3.74 (1H, brs)	36.5	29	1.29 (3H, s)	20.8
11		214.8	30	1.32 (3H, s)	18.8
12	2.72 (1H, d, $J = 14.9$ Hz), 3.49 (1H, m)	49.1	Ac	2.00 (3H, s)	21.9
13		48.9			171.8
14		45.5	1'	4.64 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	101.2
15	2.07 (1H, m), 2.28 (1H, d, $J = 17.3$ Hz)	50.5	2'	3.40 (1H, m)	74.3
16		215.9	3'	3.41 (1H, m)	77.6
17	3.41 (1H, m)	63.5	4'	3.51 (1H, m)	70.7
18	1.09 (3H, s)	20.8	5'	3.34 (1H, m)	78.1
19	1.08 (3H, s)	20.6	6'	3.85 (1H, dd, $J = 12.1, 3.6$ Hz), 4.04 (1H, d, $J = 12.2$ Hz)	62.0



1-PMP; 2-甘露糖; 3-葡萄糖醛酸; 4-鼠李糖; 5-半乳糖醛酸; 6-葡萄糖; 7-半乳糖; 8-木糖; 9-阿拉伯糖; 10-岩藻糖。
1-PMP; 2-Man; 3-GlcA; 4-Rha; 5-GalA; 6-Glc; 7-Gal; 8-Xyl; 9-Ara; 10-Fuc.

图 1 单糖混合标准品 (A) 与化合物 1 (B) 水解、衍生化成分 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of monosaccharide standard mixture (A) and compound 1 (B) after hydrolysis and derivatization

后以乙酰氧基片段连接在 C-25 位。具有类似侧链结构的 cucurbitacin E 中 C-25 (δ_{C} 79.3) 连有羟基^[17], 而化合物 1 中 C-25 (δ_{C} 81.1) 向低场偏移 8.0。当 C-25 连有乙酰氧基时, 羰基的强吸电子效应导致 C-25 上

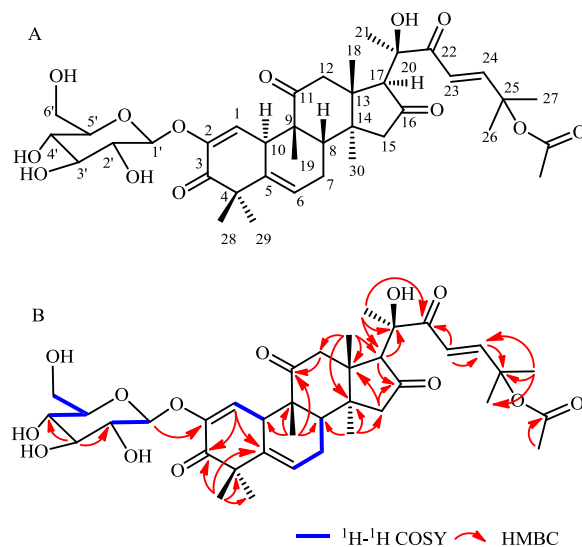


图 2 化合物 1 的结构 (A) 及主要 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关 (B)

Fig. 2 Chemical structure (A) and Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations (B) of compound 1

的电子云更偏向氧原子, 使得其化学位移会向低场偏移, 由此确定乙酰基的位置。

葫芦烷型三萜的主要特点为 H-5、H-8、H₃-18 及 H₃-19 为 β 构型, 同时 C-17 位连有 β 侧链, 而

H-10、H-17、H-21 和 H₃-30 为 α 构型^[18]。化合物 1 的 NOESY 谱图 (图 3) 显示 H-8 (δ_{H} 2.36) 与 H₃-18 (δ_{H} 1.09), H₃-19 (δ_{H} 1.08) 相关, 说明 H-8、H₃-18、H₃-19 共平面, 为 β 构型; 同时观察到 H-17 (δ_{H} 3.41) 与 H₃-21 (δ_{H} 1.35)、H₃-30 (δ_{H} 1.32) 以及 H-10 (δ_{H} 3.74) 与 H₃-30 (δ_{H} 1.32) 的明显相关信号, 说明 H-10、H-17、H₃-21、H₃-30 共平面, 为 α 构型。通过含时密度泛函理论 (TDDFT)^[19] 比较实验和计算的 ECD 光谱 (图 4), 同时结合葫芦烷型三萜类化合物生源合成途径^[20], 由此确定了化合物 1 的绝对构型, 经 SciFinder 检索后为新化合物, 命名为葫芦素酮 A。

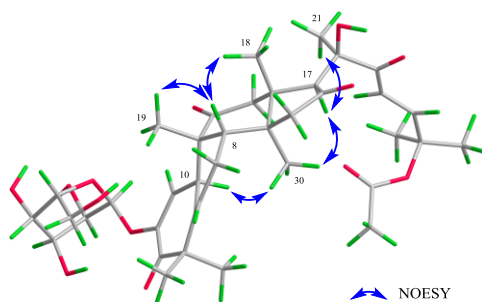


图 3 化合物 1 的关键 NOESY 相关

Fig. 3 Key NOESY correlations of compound 1

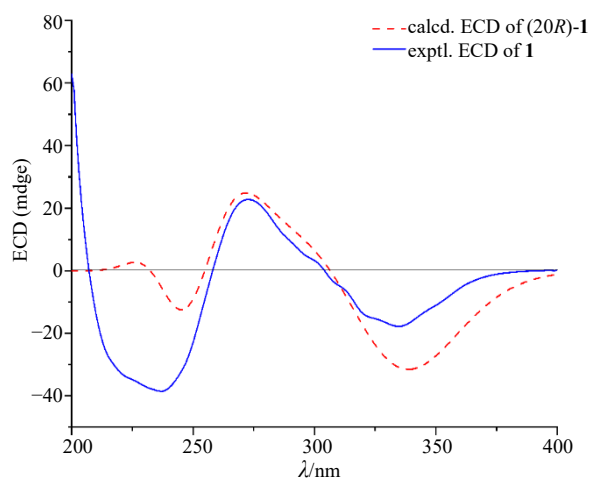


图 4 化合物 1 的实验和计算 ECD 谱图

Fig. 4 Calculated and experimental ECD spectra of compound 1

化合物 2: 白色无定型粉末; ESI-MS m/z : 717.35 $[M-H]^-$, C₃₈H₅₄O₁₃; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.98 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-24), 6.85 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-23), 6.11 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-1), 5.84 (1H, brs, H-6), 4.58 (1H, t, J = 7.9 Hz, H-16), 2.01 (3H, s, -COCH₃), 1.57 (3H, s, 27-CH₃), 1.55 (3H, s, 26-CH₃), 1.41 (3H,

s, 28-CH₃), 1.41 (3H, s, 21-CH₃), 1.30 (3H, s, 30-CH₃), 1.28 (3H, s, 29-CH₃), 1.01 (3H, s, 19-CH₃), 0.90 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 216.6 (C-11), 205.3 (C-22), 199.8 (C-3), 171.9 (-COCH₃), 151.6 (C-24), 147.2 (C-2), 137.5 (C-5), 123.6 (C-1), 122.7 (C-23), 122.4 (C-6), 101.2 (C-1'), 81.1 (C-25), 80.3 (C-20), 78.4 (C-3'), 77.6 (C-5'), 74.3 (C-2'), 71.9 (C-16), 70.7 (C-4'), 62.0 (C-6'), 60.2 (C-17), 51.6 (C-13), 50.4 (C-9), 50.1 (C-12), 50.0 (C-14), 46.7 (C-15), 43.2 (C-8), 36.5 (C-10), 28.3 (C-29), 26.9 (C-27), 26.4 (C-26), 25.4 (C-21), 24.7 (C-7), 21.9 (-COCH₃), 20.8 (C-19, 28), 20.6 (C-30), 18.7 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 2 为葫芦素 E-2-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 3: 白色无定型粉末; ESI-MS m/z : 773.34 $[M+Na]^+$, C₃₉H₅₈O₁₄; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.12 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-1), 5.84 (1H, brs, H-6), 4.45 (1H, t, J = 7.9 Hz, H-16), 3.70 (1H, brs, H-10), 3.43 (3H, s, -OCH₃), 1.96 (3H, s, -COCH₃), 1.50 (3H, s, 27-CH₃), 1.42 (3H, s, 26-CH₃), 1.41 (3H, s, 21-CH₃), 1.40 (3H, s, 28-CH₃), 1.30 (3H, s, 29-CH₃), 1.28 (3H, s, 30-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.96 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 216.5 (C-11), 214.3 (C-22), 199.8 (C-3), 172.2 (-COCH₃), 147.2 (C-2), 137.5 (C-5), 123.7 (C-1), 122.4 (C-6), 101.2 (C-1'), 85.3 (C-25), 82.4 (C-24), 80.7 (C-20), 78.1 (C-3'), 77.6 (C-5'), 74.3 (C-2'), 71.4 (C-16), 70.7 (C-4'), 62.0 (C-6'), 61.0 (-OCH₃), 59.2 (C-17), 51.8 (C-13), 50.3 (C-12), 50.3 (C-9), 50.1 (C-4), 48.1 (C-14), 46.9 (C-15), 43.1 (C-8), 40.1 (C-23), 36.5 (C-10), 28.3 (C-29), 25.4 (C-21), 24.7 (C-7), 22.9 (C-26), 22.4 (-COCH₃), 22.2 (C-27), 20.8 (C-30), 20.7 (C-28), 20.6 (C-19), 18.7 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[21], 故鉴定化合物 3 为 colocynthenin G。

化合物 4: 黄色无定型粉末; ESI-MS m/z : 644.36 $[M+H]^+$, C₃₆H₅₂O₁₀; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.44 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-1), 5.71 (1H, brs, H-6), 1.68 (3H, s, 19-CH₃), 1.30 (3H, s, 29-CH₃), 1.26 (3H, s, 27-CH₃), 1.25 (3H, s, 28-CH₃), 1.18 (3H, s, 26-CH₃), 0.96 (6H, s, 21, 30-CH₃), 0.94 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 215.2 (C-11), 198.5 (C-3), 145.7 (C-2), 136.4 (C-5), 136.1 (C-25), 125.4 (C-24), 123.8 (C-1), 121.1 (C-6), 100.3 (C-1'), 77.4 (C-5'),

76.2 (C-16), 75.9 (C-3'), 73.2 (C-23), 72.7 (C-20), 72.2 (C-2'), 69.7 (C-4'), 61.7 (C-6'), 55.4 (C-17), 49.8 (C-9), 48.9 (C-4, 12), 48.7 (C-22), 48.4 (C-13), 48.1 (C-14), 41.6 (C-15), 41.3 (C-8), 35.3 (C-10), 29.3 (C-21), 28.0 (C-29), 25.9 (C-26), 23.9 (C-7), 20.5 (C-27, 28, 30), 20.0 (C-18), 18.6 (C-19)。以上数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 **4** 为 khekadaengoside G。

化合物 **5**: 黄色无定型粉末; ESI-MS m/z : 644.36 $[M+H]^+$, $C_{36}H_{52}O_{10}$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.44 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-1), 5.71 (1H, brs, H-6), 1.65 (3H, s, 19-CH₃), 1.30 (3H, s, 29-CH₃), 1.28 (3H, s, 27-CH₃), 1.24 (3H, s, 28-CH₃), 1.18 (3H, s, 26-CH₃), 0.95 (6H, s, 18, 21, 30-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 215.1 (C-11), 198.4 (C-3), 145.8 (C-2), 136.2 (C-5), 135.2 (C-25), 125.3 (C-24), 123.1 (C-1), 121.0 (C-6), 100.1 (C-1'), 77.4 (C-3'), 76.6 (C-5'), 75.9 (C-2'), 73.3 (C-20), 72.7 (C-23), 71.4 (C-4'), 70.2 (C-16), 61.5 (C-6'), 55.4 (C-17), 49.7 (C-9), 49.1 (C-4, 12), 48.7 (C-22), 48.4 (C-13), 48.3 (C-14), 41.6 (C-8, 15), 35.2 (C-10), 29.9 (C-21), 28.0 (C-29), 26.2 (C-26), 23.9 (C-7), 20.5 (C-30), 20.4 (C-27, 28), 19.9 (C-18), 18.1 (C-19)。以上数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 **5** 为 khekadaengoside H。

化合物 **6**: 白色无定型粉末; ESI-MS m/z : 579.28 $[M+Na]^+$, $C_{32}H_{44}O_8$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.96 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-24), 6.83 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-23), 5.79 (1H, brs, H-6), 5.73 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-1), 4.56 (1H, t, $J = 8.0$, H-16), 3.63 (1H, brs, H-10), 1.99 (3H, s, -COCH₃), 1.56 (3H, s, 27-CH₃), 1.53 (3H, s, 26-CH₃), 1.40 (6H, s, 21, 30-CH₃), 1.29 (3H, s, 29-CH₃), 1.25 (3H, s, 28-CH₃), 0.96 (3H, s, 19-CH₃), 0.87 (3H, s, 18-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 216.3 (C-11), 205.2 (C-22), 199.8 (C-3), 171.9 (COCH₃), 151.6 (C-24), 146.7 (C-2), 138.5 (C-5), 122.7 (C-23), 121.7 (C-6), 116.8 (C-1), 81.1 (C-25), 80.3 (C-20), 72.0 (C-16), 60.1 (C-17), 51.7 (C-13), 50.3 (C-14), 49.8 (C-12), 49.7 (C-9), 49.2 (C-4), 46.7 (C-15), 43.3 (C-8), 36.0 (C-10), 28.4 (C-28), 26.9 (C-26), 26.4 (C-27), 25.3 (C-21), 24.6 (C-7), 21.9 (-COCH₃), 20.8 (C-29), 20.7 (C-18), 20.2 (C-19), 18.9 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[23], 故鉴定化合物 **6** 为葫芦素 E。

化合物 **7**: 白色无定型粉末; ESI-MS m/z : 355.19 $[M-H]^-$, $C_{22}H_{28}O_4$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ :

5.98 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-6), 1.30 (3H, s, 28-CH₃), 1.22 (3H, s, 18-CH₃), 1.17 (3H, s, 30-CH₃), 0.98 (3H, s, 29-CH₃), 0.85 (3H, s, 19-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 218.7 (C-16), 213.1 (C-2), 211.8 (C-11), 140.0 (C-5), 122.3 (C-6), 81.5 (C-3), 51.2 (C-9), 51.0 (C-15), 50.1 (C-17), 47.4 (C-4), 46.8 (C-12), 46.2 (C-13), 45.4 (C-14), 44.6 (C-8), 40.4 (C-1), 37.5 (C-10), 25.1 (C-7), 24.6 (C-28, 29), 21.6 (C-19), 20.2 (C-18), 19.7 (C-30) 以上数据与文献报道基本一致^[24], 故鉴定化合物 **7** 为 colocynin E。

化合物 **8**: 白色无定型粉末; ESI-MS m/z : 357.20 $[M+H]^+$, $C_{22}H_{28}O_4$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.82 (1H, dt, $J = 5.3, 2.5$ Hz, H-1), 5.78 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-6), 3.73 (1H, brs, H-10), 1.32 (3H, s, 28-CH₃), 1.31 (3H, s, 30-CH₃), 1.27 (3H, s, 29-CH₃), 1.07 (3H, s, 19-CH₃), 1.02 (3H, s, 18-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 218.7 (C-16), 214.0 (C-11), 200.0 (C-3), 146.9 (C-2), 138.4 (C-5), 121.3 (C-6), 116.6 (C-1), 51.6 (C-9), 51.2 (C-15), 50.2 (C-17), 49.2 (C-4), 47.1 (C-12), 46.4 (C-13), 45.5 (C-14), 43.5 (C-8), 36.1 (C-10), 28.2 (C-28), 24.9 (C-7), 24.5 (C-18), 20.8 (C-29), 20.2 (C-19), 19.0 (C-30) 以上数据与文献报道基本一致^[25], 故鉴定化合物 **8** 为 endecaphyllacin B。

化合物 **9**: 白色无定型粉末; ESI-MS m/z : 339.16 $[M-H]^-$, $C_{21}H_{24}O_4$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.33 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), 6.07 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-1), 1.54 (3H, s, 19-CH₃), 1.25 (6H, s, 30, 29-CH₃), 1.14 (3H, s, 18-CH₃), 1.07 (3H, s, 30-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 217.2 (C-16), 208.5 (C-11), 208.4 (C-2), 199.1 (C-7), 167.9 (C-10), 165.7 (C-5), 130.8 (C-1), 122.9 (C-6), 59.9 (C-8), 52.4 (C-9), 50.2 (C-15), 49.6 (C-17), 48.0 (C-12), 47.7 (C-4), 46.2 (C-14), 44.0 (C-13), 28.9 (C-19), 24.7 (C-18), 23.3 (C-28), 21.9 (C-29), 20.1 (C-30) 以上数据与文献报道基本一致^[24], 故鉴定化合物 **9** 为 colocynin A。

3.2 细胞毒活性

如图 5 所示, 在 40 $\mu\text{mol/L}$ 时化合物 **1~3** 和 **6** 对 RAW264.7 细胞的生长具有显著的抑制作用, 存活率均低于 55%; 化合物 **4** 和 **5** 在测试浓度下对细胞具有很低的毒性; 化合物 **7~9** 对细胞显示出一定的促生长作用。

3.3 抗炎活性评价

如表 2 所示, 与阳性对照地塞米松相比, 化合

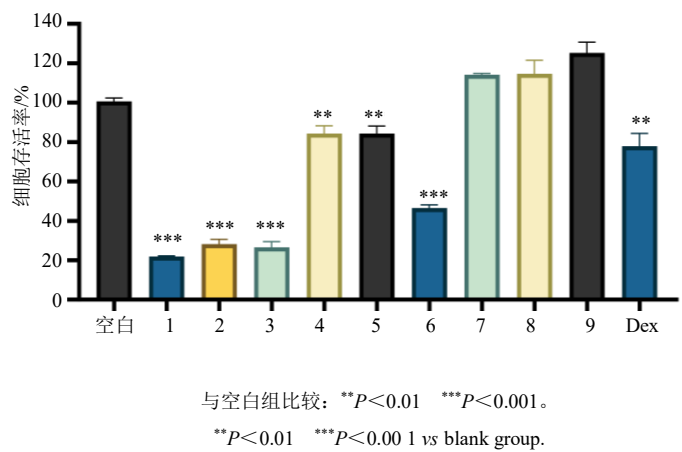


图 5 化合物 1~9 对 RAW264.7 的细胞毒性评价 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 Evaluation of cytotoxicity of compounds 1–9 against RAW264.7 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 2 化合物 4、5、7~9 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO 产生的抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of compounds 4, 5, 7–9 on LPS induced NO production in RAW264.7 cells

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol L}^{-1}$)
4	21.49 $\pm$ 3.48
5	25.37 $\pm$ 3.12
7	35.35 $\pm$ 3.53
8	38.52 $\pm$ 2.91
9	39.97 $\pm$ 3.50
地塞米松	23.21 $\pm$ 1.17

物 4、5、7~9 对 RAW264.7 细胞中 NO 的产生均有抑制作用，表现出一定的抗炎活性。

4 讨论

本研究从药西瓜中分离了 9 个化合物，其中化合物 1 为新的葫芦烷型三萜皂苷，化合物 8 首次从该植物中分离得到。对所有化合物进行了细胞毒性筛选及低毒化合物的体外抗炎活性测定，结果显示，相对于阳性对照地塞米松 [IC₅₀ = (23.21 $\pm$ 1.17) $\mu\text{mol/L}$]，化合物 4、5、7~9 显示出一定的抗炎活性，IC₅₀ 值分别为 (21.49 $\pm$ 3.48)、(25.37 $\pm$ 3.12)、(35.35 $\pm$ 3.53)、(38.52 $\pm$ 2.91)、(39.97 $\pm$ 3.50) $\mu\text{mol/L}$ 。本研究通过对药西瓜化学成分及其抗炎活性的研究，丰富了对药西瓜物质基础的认识，为其在医药领域的开发及安全性评价提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 何江, 杨伟俊, 满尔哈巴 海如拉, 等. 药西瓜在新疆昌吉地区引种表现及栽培技术 [J]. 种子, 2010, 29(11): 68-70.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 68.

[3] Liu Y S, Chen G Y, Chen X Y, *et al.* Colocynthenins A-D, ring-a seco-cucurbitane triterpenoids from the fruits of *Citrullus colocynthis* [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(9): 2115-2119.

[4] Hussain A I, Rathore H A, Sattar M Z, *et al.* *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (bitter apple fruit): A review of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1): 54-66.

[5] Li Q Y, Munawar M, Saeed M, *et al.* *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (bitter apple fruit): Promising traditional uses, pharmacological effects, aspects, and potential applications [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 791049.

[6] Abdulridha M K, Al-Marzoqi A H, Ghasemian A. The anticancer efficiency of *Citrullus colocynthis* toward the colorectal cancer therapy [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2020, 51(2): 439-444.

[7] Mandour Y M, Refaat E, Hassanein H D. Anticancer activity, phytochemical investigation and molecular docking insights of *Citrullus colocynthis* (L.) fruits [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 20038.

[8] Marzouk B, Marzouk Z, Haloui E, *et al.* Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(1): 15-19.

[9] Stein C, Voigts J, Niederreiter L, *et al.* Antiproliferative and immunomodulative potential of *Citrullus colocynthis* and its bioactive compounds in human lymphocytes and lung cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 328: 118053.

[10] 霍晓爽, 王钧麓, 斯建勇. 葫芦烷型降三萜类化合物的

- 研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1558-1569.
- [11] Zhang F, Wang J S, Gu Y C, *et al.* Cytotoxic and anti-inflammatory triterpenoids from *Toona ciliata* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(4): 538-546.
- [12] Liu W, Gao J, Li M M, *et al.* Tirucallane triterpenoids from the mastic (*Pistacia lentiscus*) and their anti-inflammatory and cytotoxic activities [J]. *Phytochemistry*, 2021, 182: 112596.
- [13] 薛淑田, 刘伟, 袁涛. 广东紫珠化学成分及止血活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(14): 3815-3825.
- [14] Dai J, Wu Y, Chen S W, *et al.* Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 82(3): 629-635.
- [15] 苗静, 张洁, 邓世明, 等. 维药药西瓜化学成分的分离与鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 432-435.
- [16] 吉海杰, 郝淑兰, 吕林, 等. 胡黄连葫芦烷型四环三萜类化合物及其生物活性的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4875-4881.
- [17] Seger C, Sturm S, Mair M E, *et al.* ^1H and ^{13}C NMR signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader and *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae) [J]. *Magn Reson Chem*, 2005, 43(6): 489-491.
- [18] 孔令义. 复杂天然产物波谱解析 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012: 566-568.
- [19] Jiao S G, Su G Z, Zhou X C, *et al.* Three pairs of enantiomeric sesquiterpenoids from *Syringa pinnatifolia* [J]. *J Org Chem*, 2021, 86(10): 7263-7270.
- [20] Shibuya M, Adachi S, Ebizuka Y. Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(33): 6995-7003.
- [21] 吴俊凌, 刘玉霜, 赵曦, 等. 药西瓜中 3 个新的葫芦烷型三萜苷及其抗炎活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(15): 4124-4129.
- [22] Kanchanapoom T, Kasai R, Yamasaki K. Cucurbitane, hexanorcucurbitane and octanorcucurbitane glycosides from fruits of *Trichosanthes tricuspidata* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(2): 215-228.
- [23] 王爱琴, 冯雷, 黄伟俊, 等. 药西瓜化学成分的研究 [J]. 中成药, 2023, 45(10): 3306-3312.
- [24] Lv H W, Wang Q L, Li S W, *et al.* Cucurbitane-type triterpenoids from the fruits of *Citrullus colocynthis* [J]. *Fitoterapia*, 2023, 165: 105405.
- [25] Zhang X, Tao M H, Zhang W M, *et al.* Five cucurbitacins from *Aquilaria sinensis* peels and their cytotoxic activities [J]. *Nat Prod Res and Dev*, 2014, 26: 354-357.

[责任编辑 王文倩]