

中图分类号: R932; R284.1; R286.0
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.17.007

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2026)17-0044-04



β_2 肾上腺素能受体色谱法筛选桂芍镇痫片生物活性成分*

崔小丽, 孙 宁, 赵 瑞, 贾瑞华[△]

(陕西省人民医院, 陕西 西安 710068)

摘要:目的 建立筛选桂芍镇痫片生物活性成分的固定化 β_2 肾上腺素能受体(β_2 -AR)色谱法。方法 采用两步柱色谱法分离、纯化 β_2 -AR色谱柱,再通过重氮盐反应合成受体色谱固定相,制备固定化 β_2 -AR色谱柱(50 mm×4.6 mm, 7 μ m),流动相为20 mmol/L磷酸水溶液(pH=7.40),流速为0.20 mL/min,柱温为25℃,检测波长为210, 230 nm,进样量为10 μ L,记录时间为60 min。在此色谱条件下进行桂芍镇痫片的生物活性成分筛选。结果 桂芍镇痫片中的汉黄芩素、甘草酸、黄芩素、苯甲酰芍药苷、汉黄芩苷、甘草苷、黄芩苷、阿魏酸、芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸甲酯、羟基芍药苷、没食子酸13种成分均在 β_2 -AR色谱柱上有保留行为,保留时间>2.265 min。结论 所建立的 β_2 -AR色谱法快速高效、分离能力强、操作简便,可用于桂芍镇痫片中的生物活性成分筛选。

关键词:桂芍镇痫片; β_2 肾上腺素能受体色谱法;生物活性成分;成分筛选

Application of β_2 - Adrenoceptor Chromatography in Screening of Bioactive Ingredients in Guishao Zhenxian Tablets

Cui Xiaoli, Sun Ning, Zhao Rui, Jia Ruihua[△]

(Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710068, China)

Abstract: Objective To establish an immobilized β_2 - adrenergic receptor (β_2 - AR) chromatographic method for screening the bioactive ingredients of Guishao Zhenxian Tablets. **Methods** Two step column chromatography was used to separate and purify β_2 - AR column. Then, a receptor chromatographic stationary phase was synthesized by diazonium salt reaction to prepare an immobilized β_2 - AR column (50 mm × 4.6 mm, 7 μ m), the mobile phase was 20 mmol / L phosphoric acid aqueous solution (pH = 7.40), the flow rate was 0.20 mL / min, the column temperature was 25 °C, the detection wavelengths were 210 nm and 230 nm, the injection volume was 10 μ L, and the recording time was 60 min. Bioactive ingredients in Guishao Zhenxian Tablets were screened under these chromatographic conditions. **Results** All 13 bioactive ingredients (wogonin, glycyrrhizic acid, baicalin, benzoyl paeoniflorin, wogonoside, ferulic acid, baicalin, liquiritin, paeoniflorin, albiflorin, methyl gallate, hydroxypaeoniflorin, and gallic acid) in Guishao Zhenxian Tablets exhibited retention behavior on the β_2 - AR column with a retention time of > 2.265 min. **Conclusion** The established β_2 - AR chromatography method is fast, efficient, simple, and has strong separation ability, which can be used for the screening of bioactive ingredients in Guishao Zhenxian Tablets.

Key words: Guishao Zhenxian Tablets; β_2 - AR chromatographic method; bioactive ingredients; screening ingredients

癫痫是一种由多种疾病引起的慢性脑部疾病,以脑神经元过度放电导致反复性、发作性、短暂性的中枢神经系统功能失常为特征,其发病机制主要与离子通道和遗传、神经递质、细胞因子及免疫、神经胶质细胞等关系密切^[1]。 β_2 肾上腺素能受体(β_2 -AR)分布在中枢神经系统的特定区域,如蓝斑核(去甲肾上腺素能神经元密集区)、孤束核(参与心血管和呼吸调节)、下丘脑(调控代谢和应激反应)、海马(与学习记忆相关)^[2-3]。源自蓝斑核的去甲肾上腺素能纤维密集支配边缘结构(包括梨状皮质)是癫痫阈值最低的边缘结构,去甲肾上腺素通过 β_2 -AR刺激自噬,调节边缘癫痫发作^[4]。

中药治疗癫痫有确切疗效,如桂芍镇痫片单用或联用左乙拉西坦、卡马西平、丙戊酸钠等均有良好的治疗效果^[5-10]。桂芍镇痫片为收载于2025年版《中国药典(一部)》的中药复方制剂,由桂枝、白芍、党参等9味中药材组方,主要用于治疗各种发作类型的癫痫^[11]。据报道,桂芍镇痫片有46个相关抗癫痫靶点和127种活性成分^[12],定量了汉黄芩素、甘草酸、黄芩素等13种功效成分^[13-15]。目前,中药功效成分筛选方法有多种,主要包括受体模型和酶、传统生物色谱、基因芯片、计算机模拟、整体动物模型、细胞模型等技术,其中受体色谱法具有高靶向性、高分离能力、高特异性等优点,故成为

* 基金项目:陕西省自然科学基金研究计划项目[2024JC-YBMS-603];陕西省人民医院2022年科技人才支持计划[2022JY-61];陕西省人民医院2023年科技发展孵化基金项目(医技药类)[2023YJY-86]。

第一作者:崔小丽,女,硕士,副主任医师,研究方向为癫痫的诊治,(电子信箱)lili6416669@126.com。

[△]通信作者:贾瑞华,男,博士,副主任医师,研究方向为神经介入与癫痫的诊治,(电子信箱)jrh8@163.com。

药物分析领域的重要研究方法^[16-20]。本研究中采用 β_2 -AR 色谱法,通过制备固定化 β_2 -AR 色谱柱,分析了桂芍镇痫片中13种活性成分的保留行为,以为该制剂的生物活性成分筛选提供方法学依据,为进一步的作用机制研究奠定基础。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

KQ-5200D型数控超声波发生器(昆山市超声仪器有限公司,功率为200 W,频率为40 kHz);LC-2030C PLUS型高效液相色谱(HPLC)仪(日本Shimadzu公司),配有Labsolution工作站及自动进样系统;XPE105型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为十万分之一); β_2 -AR 色谱柱(安徽通用生物股份有限公司)。

1.2 试剂

黄芩素对照品(BN,批号为RG158H2),汉黄芩素对照品(WN,批号为HW158604),苯甲酰芍药苷对照品(BP,批号为HB003022),甘草酸对照品(GD,批号为HA062610),芍药内酯苷对照品(AF,批号为HA003021),芍药苷对照品(PF,批号为HP003024),汉黄芩苷对照品(WS,批号为HW158601),羟基芍药苷对照品(HP,批号为HO003023),没食子酸甲酯对照品(MG,批号为HA063031),没食子酸对照品(GA,批号为HG230820),甘草苷对照品(LN,批号为HL042238),黄芩苷对照品(BL,批号为RG158H8),阿魏酸对照品(FA,批号为1135-24-6),含量均 $\geq 98\%$,均购自宝鸡市辰光生物科技有限公司;亚硝酸钠(成都金山化学试剂有限公司,批号为240626,含量 $\geq 99\%$);桂芍镇痫片(陕西君碧莎制药有限公司,国药准字Z20083016,规格为每片0.35 g,批号为240912);水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);乙腈、甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 受体纯化与受体柱制备^[21-23]

发酵培养可表达 His-tag β_2 -AR 的基因工程菌株,经异丙基- β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)诱导,超声(功率为200 W,频率为40 kHz)破碎,离心,收集上清液。采用两步柱色谱法分离、纯化 β_2 -AR 色谱柱,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测纯度为96%。将 His-tag β_2 -AR 通过重氮盐反应定向固定于大孔硅胶表面,合成受体色谱固定相,湿法装柱,即得受体柱。

2.2 桂芍镇痫片中生物活性成分筛选

2.2.1 色谱条件

色谱柱: β_2 -AR 色谱柱(50 mm $\times$ 4.6 mm,7 μ m);流动相:20 mmol/L 磷酸水溶液(pH=7.40);流速:

0.20 mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;检测波长:210,230 nm;进样量:10 μ L;记录时间:60 min。

2.2.2 溶液制备

供试品溶液:取除去糖衣后的桂芍镇痫片15片,研碎,混匀,取粉末0.1 g,精密称定,置50 mL棕色容量瓶中,加75%甲醇溶解,超声(功率为200 W,频率为40 kHz)15 min,冷却,用75%甲醇定容,摇匀,取4 mL,置50 mL棕色容量瓶中,加水定容,摇匀,0.22 μ m微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

亚硝酸钠溶液:取亚硝酸钠适量,精密称定,加水制成质量浓度为0.1 mg/mL的溶液,0.22 μ m微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

对照品溶液:取WN,BN,WS,BP,FA,AF,GD,LN,BL各适量,加甲醇制成质量浓度分别为20,20,30,50,100,50,100,50,20 μ g/mL的对照品溶液I;取PF,HP,MG,GA各适量,加水制成质量浓度均为50 μ g/mL的对照品溶液II。

2.2.3 β_2 -AR 色谱柱死体积测定

取2.2.2项下亚硝酸钠溶液适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定 β_2 -AR 色谱柱死体积,因亚硝酸钠与 β_2 -AR 色谱柱无保留行为,故无结合作用;若保留时间(RT)超过2.265 min,则认为有保留行为,即与受体有结合作用。详见图1A。

2.2.4 供试品与 β_2 -AR 色谱柱作用

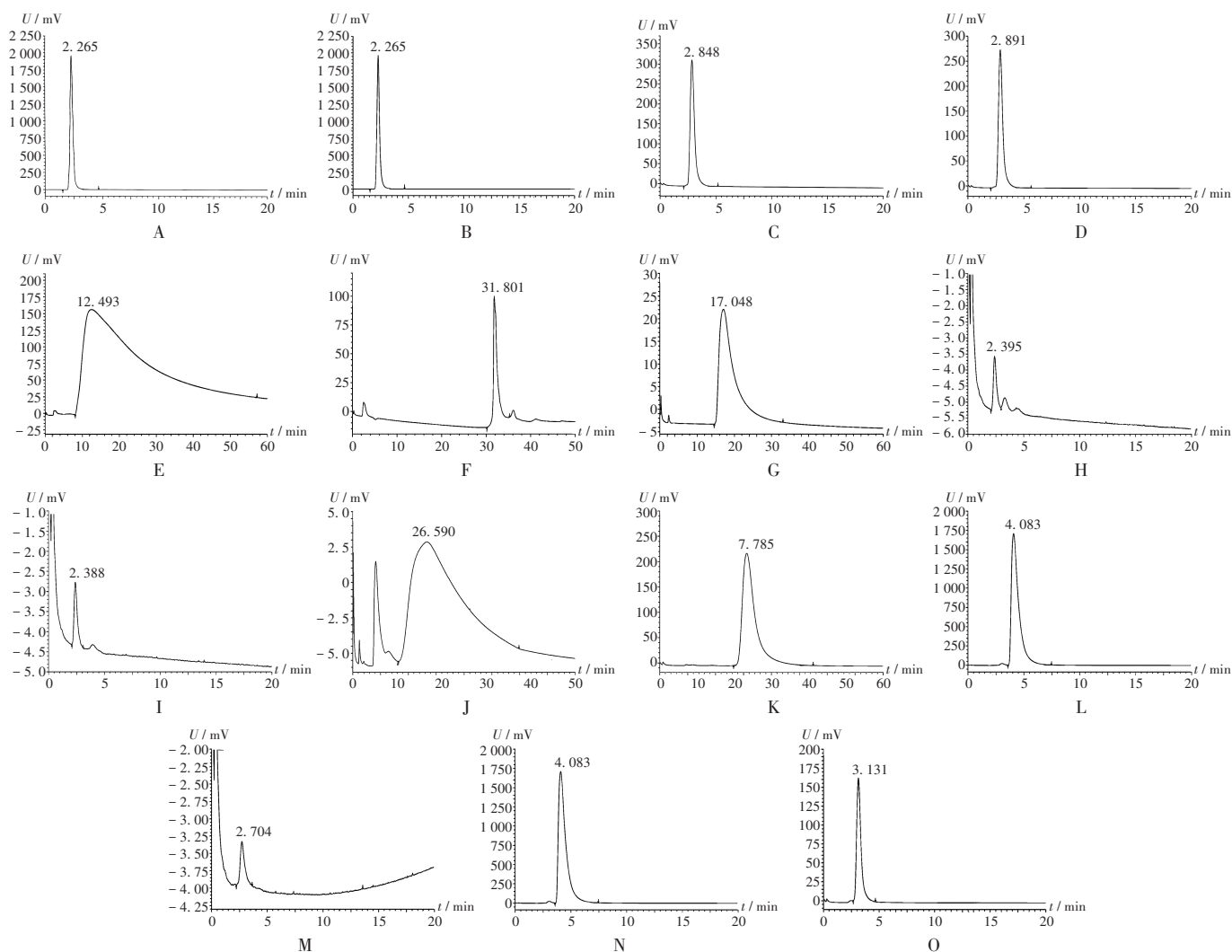
取2.2.2项下供试品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定,结果供试品溶液中有成分与 β_2 -AR 色谱柱结合。详见图1B。

2.2.5 各成分与 β_2 -AR 色谱柱作用

取2.2.2项下对照品溶液I和II各适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定,结果13种成分均在 β_2 -AR 色谱柱上有保留行为(RT>2.265 min),提示13种成分可与 β_2 -AR 色谱柱结合,表明13种成分可能是该制剂的主要活性成分。详见图1C至图1O。

3 讨论

癫痫是大脑神经元突发性异常放电,导致短暂的大脑功能障碍,主要表现为发作性运动、感觉、自主神经、意识、精神障碍。据报道,我国年发病率为0.288%,已成为神经科的常见疾病,西药治疗癫痫的药品不良反应较大^[24]。中药是人类防治疾病的重要手段,其有效成分复杂,有原药成分,也有与其他药材相互作用或经酶促合成形成的效应物质,使得以中药等天然产物为源泉进行新药创制成为当今的重点科学问题,但其瓶颈为活性成分的高效筛选。受体色谱法是基于亲和色谱提出的一种色谱分离技术,具有独特、高效筛选活性成分的能力,已成为当今药物分析领域重要的研究方



A. 工具药(亚硝酸钠)溶液(210 nm) B. 桂芍镇痫片供试品溶液(230 nm) C. 芍药苷对照品溶液(230 nm) D. 芍药内酯苷对照品溶液(230 nm) E. 没食子酸对照品溶液(230 nm) F. 黄芩苷对照品溶液(230 nm) G. 汉黄芩苷对照品溶液(230 nm) H. 黄芩素对照品溶液(230 nm) I. 汉黄芩素对照品溶液(230 nm) J. 甘草酸对照品溶液(230 nm) K. 苯甲酰芍药苷对照品溶液(230 nm) L. 没食子酸甲酯对照品溶液(230 nm) M. 甘草苷对照品溶液(230 nm) N. 阿魏酸对照品溶液(230 nm) O. 羟基芍药苷对照品溶液(230 nm)

图1 固定化 β_2 -AR色谱图

A. Tool drug (sodium nitrite) solution (210 nm) B. Guishao Zhenxian Tablets test solution (230 nm) C. Paeoniflorin reference solution (230 nm) D. Albiflorin reference solution (230 nm) E. Gallic acid reference solution (230 nm) F. Baicalin reference solution (230 nm) G. Wogonoside reference solution (230 nm) H. Baicalein reference solution (230 nm) I. Wogonin reference solution (230 nm) J. Glycyrrhizic acid reference solution (230 nm) K. Benzoyl paeoniflorin reference solution (230 nm) L. Methyl gallate reference solution (230 nm) M. Liquiritin reference solution (230 nm) N. Ferulic acid reference solution (230 nm) O. Hydroxypaeoniflorin reference solution (230 nm)

Fig. 1 Fixed β_2 -AR chromatograms

法^[16-20]。有文献报道,桂芍镇痫片中的汉黄芩素、黄芩素、甘草酸、苯甲酰芍药苷、汉黄芩苷、甘草苷、黄芩苷、阿魏酸、芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸甲酯、羟基芍药苷、没食子酸13种成分具有明显的抗癫痫作用^[22,25-26]。故研究该制剂的物质基础(即活性成分)与 β_2 -AR色谱柱的结合,对于阐明抗癫痫的作用机制具有重要意义。

前期试验中对色谱条件进行了筛选,流速选择0.10,0.20,0.30 mL/min,结果流速过慢时出峰时间过

长,流速过快时易冲塌色谱柱;柱温选择20,25,30℃,结果柱温过低时出峰时间过长,柱温过高时易使填充蛋白变性及色谱柱使用时间缩短;流动相选择10,20,30 mmol/L磷酸水溶液(pH=7.40),结果20 mmol/L的分离效果较佳。因此,仅在流动相为20 mmol/L磷酸水溶液(pH=7.40)、流速为0.20 mL/min、柱温为25℃、检测波长为210 nm和230 nm条件下,样品中各成分的柱效、出峰时间、分离度等均较理想。为保证色

谱的理想效果,使用前参考文献[23]用沙丁胺醇对 β_2 -AR色谱柱的固定相活性进行了验证,确保受体结合位点完整;通过竞争洗脱试验评估配体的特异性,RT偏差 $\leq 1\%$;柱效与稳定性测试理论板数(N) $\geq 5\,000$,分离度(R) ≥ 1.5 ;并进行了连续30 d的长期稳定性测试后,要求柱效下降应 $< 10\%$ 。

本研究中采用HPLC法进行 β_2 -AR色谱柱结合试验,筛选出了13种活性成分,该方法具有快速、高效、高分离能力等特点;同时使用当前普及的HPLC仪,操作及数据分析简单,不需配备专业的操作与技术人员,但 β_2 -AR色谱柱制备过程较复杂、费时,且需专业人员及专业设备制备。尽管制备复杂,但本方法简化了复杂的设备操作与数据分析过程,节省了试验成本,同时也为研究桂芍镇痫片抗癫痫的作用提供了直接依据。

综上所述,通过固定化 β_2 -AR色谱柱,可筛选桂芍镇痫片中的生物活性成分及其他复杂体系中中药复方中的活性成分,为筛选中药活性成分提供了方法学参考。该制剂筛选出的13种生物活性成分为本制剂物质基础的研究提供了依据,为该制剂进一步的机制研究奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 王学峰. 癫痫研究新进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2022, 22(7): 543-548.
- [2] 杨宝峰, 陈建国. 药理学(第10版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2022: 78-96.
- [3] 黄宇光, 罗爱伦, 杭燕南, 等. 疼痛治疗药[M]. 上海: 上海世界图书出版公司, 2017: 202-203.
- [4] Biagioni F, Celli R, Puglisi - Allegra S, et al. Noradrenaline and Seizures: A Perspective on the Role of Adrenergic Receptors in Limbic Seizures[J]. Curr Neuropharmacol, 2023, 21(11): 2233-2236.
- [5] 李建娟, 张永全. 中医药治疗癫痫的研究进展[J]. 大众科技, 2021, 23(1): 74-76.
- [6] 陈俊宁, 戴志仙, 乐卫东, 等. 桂芍镇痫片治疗癫痫的临床观察[J]. 中成药研究, 1982, 5(12): 22-23.
- [7] 马婷. 桂芍镇痫片联合左乙拉西坦治疗癫痫的疗效及对血清炎症因子的影响[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(10): 1632-1634.
- [8] 徐琴. 桂芍镇痫片联合卡马西平片对癫痫患者认知功能及血清NSE、S100 β 水平的影响[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2021, 5(4): 108-110.
- [9] 张小红, 张淑琴, 吴丹, 等. 桂芍镇痫片联合卡马西平治疗癫痫的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(12): 3139-3142.
- [10] 连新生, 孙思胜, 申金星, 等. 桂芍镇痫片联合丙戊酸钠治疗小儿癫痫的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(7): 1377-1380.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025: 1470-1471.
- [12] 赵鑫, 黄碧云, 吴丹, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨桂芍镇痫片治疗颞叶癫痫的作用机制[J]. 山东科学, 2023, 36(3): 27-37.
- [13] 崔小丽, 孙宁, 贾瑞华, 等. 桂芍镇痫片制备过程中12种成分含量测定及转移率研究[J]. 中国药业, 2025, 34(18): 63-68.
- [14] 崔小丽, 孙宁, 赵瑞, 等. 高效液相色谱法同时测定桂芍镇痫片中13种成分的含量[J]. 中南药学, 2023, 21(11): 3024-3029.
- [15] 崔小丽, 孙宁, 赵瑞, 等. 基于HPLC的桂芍镇痫片指纹图谱分析方法的建立[J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(6): 847-856.
- [16] Xue Y, Zhang Z L, Wang G, et al. Protein superglue inspired in-situ one-step site-specific immobilization of β_2 -adrenoceptor and its application in bioactive compound screening from Cortex Magnoliae Officinalis[J]. J Chromatogr A, 2023, 1690: 463780.
- [17] 刘嘉君, 贾晓妮, 王静, 等. 受体色谱: 中药靶向活性成分高效筛选技术[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(8): 1476-1481.
- [18] Jin Y H, Wang W W, Zhang Z L, et al. Stepwise Frontal Analysis Coupled with Affinity Chromatography: A Fast and Reliable Method for Potential Ligand Isolation and Evaluation from Mahuang-Fuzi-Xixin Decoction[J]. Chem Biodivers, 2023, 20(3): e202201057.
- [19] Zhang H S, Wang J, Wang C Z. Multi-target bioactive compound screening from the infructescence of Platycarya strobilacea Sieb. et Zucc. by affinity chromatography using immobilized β_2 -adrenoceptor and muscarinic-3 acetylcholine receptor as the stationary phase[J]. J Sep Sci, 2023, 46(16): e2300129.
- [20] Fu X Y, Zhao X, Zheng X X, et al. Rapidly identifying bioactive compounds from Zhisou oral liquid by immobilized receptor-based high-performance affinity chromatography[J]. J Sep Sci, 2021, 44(17): 3219-3228.
- [21] 张建丰, 梁琦, 李刚刚, 等. 固定化蛋白质色谱模型的建立及其在先导化合物筛选中的应用[J]. 西北药学杂志, 2023, 38(5): 37-41.
- [22] 崔小丽, 孙宁, 赵瑞, 等. NMDA受体色谱在桂芍镇痫片活性成分筛选中的应用[J]. 山西医科大学学报, 2025, 56(7): 800-804.
- [23] 杨荣. β_2 -肾上腺素受体与药物相互作用的研究[D]. 西安: 西北大学, 2008: 18-26.
- [24] 黄琰洪, 王冬. 中医药治疗癫痫的研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2025, 23(5): 158-160.
- [25] 廖煜雄, 何乾超, 高玉广, 等. 中药单体化合物治疗癫痫的实验研究进展[J]. 大众科技, 2021, 23(11): 75-79.
- [26] 夏蕾, 尤斯涵, 殷宏艳, 等. 基于网络药理学方法探讨白芍治疗癫痫的活性成分和作用机制[J]. 神经药理学报, 2024, 14(2): 26-30.

(收稿日期: 2025-09-26; 修回日期: 2026-07-23)