

## 基于特征多肽的地龙鉴别与伪品保宁腔蚓检查方法的建立及应用

刘蕊<sup>1,2</sup>, 张静娴<sup>2\*</sup>, 胡青<sup>2</sup>, 孙健<sup>2</sup>, 于泓<sup>2</sup>, 冉莹瑛<sup>2</sup>, 黄帆<sup>2</sup>,  
毛秀红<sup>2</sup>, 季申<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海市食品药品检验研究院, 上海 201203)

**摘要:** 基于种属特异性多肽, 采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱 (UHPLC-MS/MS) 建立了地龙鉴别和伪品保宁腔蚓的检查方法, 并应用于地龙及两种成方制剂的检测分析。采用 CORTECS T3 C18 色谱柱分离, 以 0.1% 甲酸溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 采用 ESI<sup>+</sup> 离子源、多重反应监测 (MRM) 模式, 同时监测 3 组离子对。结果表明, 本方法具有良好的专属性, 可以鉴定出广地龙、沪地龙、保宁腔蚓, 鉴定结果与 DNA 条形码分子鉴定结果一致。掺伪检查研究表明, 保宁腔蚓多肽 M 的检出限为 1  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 广地龙中掺入 1% 保宁腔蚓时即可检出, 方法灵敏度高。54 批市售地龙样品中广地龙占比 35%、沪地龙 35%、保宁腔蚓 15%, 另外 15% 未检出任何目标离子, 经 DNA 条形码分子鉴定发现这些样品主要来源为远盲蚓属, 部分样品性状与沪地龙相似。成方制剂分析结果显示, 3 批小活络丸 (3/6) 未检出任何多肽离子, 2 批伸筋丹胶囊 (2/4) 中检出保宁腔蚓。本研究建立的方法专属性好、灵敏度高、可行性强, 可以用于地龙及其相关制剂的质量控制研究中, 对于提高质量标准、规范地龙药材市场具有重要意义。

**关键词:** 地龙; 保宁腔蚓; 特征多肽; 质量标准; 小活络丸; 伸筋丹胶囊

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)10-2842-07

## Development and application of a method for identifying *Pheretima* and a common counterfeit of *Metaphire magna* based on signature peptides

LIU Rui<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing-xian<sup>2\*</sup>, HU Qing<sup>2</sup>, SUN Jian<sup>2</sup>, YU Hong<sup>2</sup>, RAN Ying-ying<sup>2</sup>, HUANG Fan<sup>2</sup>,  
MAO Xiu-hong<sup>2</sup>, JI Shen<sup>1,2\*</sup>

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Based on the species-specific peptides of *Pheretima* and its common counterfeit (*Metaphire magna*), an identification method was established using ultra-high performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for quality evaluation of *Pheretima* and its preparations. Separation was performed on a CORTECS T3 C18 column with 0.1% formic acid and acetonitrile as the mobile phases. Mass spectrometry with multiple reaction monitoring (MRM) using ESI<sup>+</sup> mode was used to simultaneously monitor three ion pairs. The results indicated that the method was specific and could distinguish Guang Dilong, Hu Dilong, and *M. magna*, which were consistent with those of DNA barcode identification. The adulteration test showed that the LOD of peptide M was 1  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Peptide M could be detected when 1% *M. magna* was added to Guang Dilong, indicating the high sensitivity of the method. Fifty-four batches of commercially available samples contained 35% Guang Dilong, 35% Hu Dilong, and 15% *M. magna*. No ions were detected in 15% of the samples, and DNA

收稿日期: 2024-04-03; 修回日期: 2024-07-28.

基金项目: 上海市中药和保健食品品质与安全检测专业技术服务平台 (21DZ2290200); 2024 年国家药品标准提高项目地龙 (2024Z010); 上海市人才发展资金 (2021085).

\*通讯作者 Tel: 86-21-50798195, E-mail: jishen2013@163.com;

Tel: 86-21-38839900-26126, E-mail: zhjx\_2003@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0316

barcode identification revealed that they were mainly from *Amyntas*, with similar appearance to Hu Dilong. The analysis results of the formulation showed that no peptide ions were detected in 3 batches of Xiaohuoluo pills (3/6) and *M. magna* were detected in 2 batches of Shenjindan capsules (2/4). The developed method in the study has good specificity, sensitivity, and feasibility, and could be used for quality control of *Pheretima* and its related preparations. It is of great significance for improving quality standards and regulating the medicinal market of *Pheretima*.

**Key words:** *Pheretima*; *Metaphire magna*; signature peptide; quality standard; Xiaohuoluo pill; Shenjindan capsule

地龙原动物为蚯蚓, 是传统动物来源中药, 在东亚地区有着悠久而广泛的使用历史。中国药典(2020年版) 收载地龙来源为钜蚓科参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmi* (Michaelsen) 或栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelsen 的干燥体, 前一种习称“广地龙”, 后三种习称“沪地龙”<sup>[1]</sup>。地龙具有清热定惊、通络、平喘、利尿的传统功效, 临床应用广泛。近些年来, 药用地龙资源紧张, 价格逐渐上涨, 非药用蚯蚓加工成的样品混入地龙药材市场。文献<sup>[2]</sup>报道目前市售地龙药材伪品和掺伪现象严重, 22% 来源为参环毛蚓, 22% 为通俗环毛蚓, 威廉环毛蚓和栉盲环毛蚓罕见, 而 55% 为非药典基原品种, 以保宁腔蚓 (*Metaphire magna*) 为主。另有文献<sup>[3]</sup>报道 48 批市售地龙饮片中 20 批为正品, 其中 18 批为参环毛蚓, 2 批为通俗环毛蚓, 26 批为伪品, 其中 14 批为暗孔远盲蚓 (*Amyntas obscuritoporus*), 12 批为大腔蚓 (即保宁腔蚓), 可见市场上地龙药材混伪品众多, 以保宁腔蚓居多。

地龙为典型的动物来源中药, 主要化学成分为蛋白质、多肽、氨基酸、核苷及其碱基等初级代谢产物<sup>[4,5]</sup>。中国药典中理化鉴别, 采用薄层色谱法鉴定赖氨酸、亮氨酸、缬氨酸或者与对照药材比较, 文献<sup>[6]</sup>还报道了高效液相色谱方法测定氨基酸、核苷等, 由于质控指标缺乏专属性, 正品与伪品无法区分; 分子鉴定技术可以准确鉴定药材、饮片种属来源<sup>[7-10]</sup>, 目前主要用于单品种样本的基原鉴定, 对于混合样本, 基于 Sanger 测序的 DNA 条形码分子鉴定法往往会给出套峰的结果, 无法进行序列读取, 因此该方法目前难以应用于混合样本 (掺伪样品、含地龙的成方制剂) 的鉴定中。由于缺乏有效的质控方法, 市场上地龙药材混伪品众多。中国药典(2020年版) 收载的含地龙的成方制剂有 50 个<sup>[1]</sup>, 但是普遍缺少地龙的相关质控项目。因此, 很有必要建立地龙专属性鉴别方法、伪品保宁腔蚓的检查方法, 并将其应用于成方制剂中。

特征多肽是基于高分辨质谱结合组学、生物信息学、数学集合比较等研究策略发现的不同物种之间差异氨基酸序列<sup>[11-13]</sup>, 可以在质谱上表现为母离子和子

离子不同, 实现鉴别, 因此具有物种的准确溯源性, 作为分子鉴定技术的补充, 特征多肽用于质控研究的报道越来越多<sup>[14-16]</sup>。课题组前期研究<sup>[17]</sup>中, 筛选出了广地龙、沪地龙及保宁腔蚓的特征多肽, 本文以这些特征多肽作为检测指标, 建立了地龙的鉴别方法和伪品保宁腔蚓的检查方法。选择以原粉入药, 且使用广泛的小活络丸和伸筋丹胶囊作为研究对象, 二者均收载于中国药典(2020年版) 一部<sup>[1]</sup>。小活络丸具有祛风散寒、化痰除湿、活血止痛的功效, 处方含有六味药, 包括胆南星、制川乌、制草乌、地龙、乳香和没药, 关于地龙的质量标准项目为薄层鉴别, 以地龙对照药材为对照, 对其中非极性成分进行鉴别。伸筋丹胶囊具有舒筋通络、活血祛瘀、消肿止痛的功效, 处方含有八味药, 包括地龙、制马钱子、红花、乳香、防己、没药、香加皮和烫骨碎补, 关于地龙的质量标准项目仅有显微鉴别。本文在建立药材鉴别和伪品保宁腔蚓检查方法的基础上, 将其应用于制剂质控研究中, 研究成果对于提高地龙及相关制剂的质量标准、规范药材市场具有重要的作用。

## 材料与方法

**仪器** 1290 高效液相色谱仪, 6495 三重四极杆质谱仪 (QQQ-MS, 美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); 电子分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); 离心机 (德国 Eppendorf 公司); 恒温混匀仪 MATRIX Orbital Delta F1.5 和涡旋仪 (德国 IKA 公司); 超声波清洗仪 (德国 Elma 公司)。

**试剂** 乙腈 (质谱纯) 购自德国 Merck 公司; 甲酸 (色谱纯) 购自阿拉丁试剂有限公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS) 购自德国 Serva 公司; 二硫苏糖醇 (DTT)、三(羟甲基) 氨基甲烷、碘乙酰胺 (IAA)、尿素、碳酸氢铵、胰蛋白酶均购自德国默克 Sigma 公司。保宁腔蚓多肽 M 对照品由上海吉尔生化有限公司合成, 纯度大于 95%。地龙对照药材 (来源参环毛蚓, 批号 120987-202109) 购自中国食品药品检定研究院。

**地龙样品收集** 共收集到地龙药材 54 批 (表 1), 代表性样品性状见图 1, 主要混伪品来源包括保宁腔

蚓 (*Metaphire magna*)、直隶腔蚓 (*M. tschiliensis*)、多肉远盲蚓 (*Amyntas carnosus*)、阿美远盲蚓 (*A. amis*) 以及湖北远盲蚓 (*A. hupeiensis*) 等, 其中保宁腔蚓与沪地龙性状相似, 宽度一般大于 2 cm, 较沪地龙略宽, 背部棕褐色至黑褐色, 腹部黄棕色, 较沪地龙颜色深; 直隶腔蚓、多肉远盲蚓、阿美远盲蚓与沪地龙相似。选择基原明确的沪地龙和保宁腔蚓各 5 批, 分别等比例混合后, 按照保宁腔蚓占比 1%、3%、5%、7%、10% 与沪地龙混合样混合均匀, 作为自制掺伪样品, 用于掺伪检查方法的建立。



**Figure 1** Typical sample pictures. A: Guang Dilong; B: Hu Dilong; C: *Metaphire magna*; D: *Amyntas carnosus*; E: *Metaphire tschiliensis*; F: *Amyntas amis*; G: *Amyntas hupeiensis*; H: *Amyntas*; I: *Metaphire birmanica*

**含地龙中成药收集** 收集到小活络丸 6 批 XHLW1~6 (其中 1、5 为大蜜丸, 2~4、6 为小蜜丸), 伸筋丹胶囊 4 批 SJD1~4。收集处方中除地龙外的药材各一批, 包括胆南星、制川乌、制草乌、乳香、没药、制马钱子、红花、防己、香加皮、烫骨碎补, 按照各自处方量比例和制法自制阳性样品 (含地龙对照药材) 和阴性样品, 用于专属性考察。

**基原鉴定** 依据中国药典 (2020 年版) 四部通则 9107 中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则进行品种鉴定。使用 COI 通用引物进行 PCR 扩增, 扩增产物委托苏州金唯智生物科技有限公司进行双向测序, 测序结果拼接后与 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和中草药 DNA 条形码鉴定数据库 (<http://www.gpgenome.com/blast>) 进行序列比对来鉴定样品基原。

**特征多肽序列鉴定** 课题组前期研究<sup>[17]</sup>中, 收集了多批次地龙药材, 通过 DNA 条形码技术进行基原鉴定, 包含中国药典收载的四个品种, 还包括四种来源的伪品, 即沪地龙常见伪品保宁腔蚓, 沪地龙常见伪品多肉远盲蚓、直隶腔蚓、阿美远盲蚓, 开展非标记定量蛋白质组学研究, 通过多元统计分析, 筛选出了沪地龙、沪地龙及保宁腔蚓的特征多肽, 合成对照品, 并验证特征多肽序列结构, 序列信息详见表 2。

**Table 1** Sample information. \*Purchase location

No.	Origin	DNA identification	No.	Origin	DNA identification
S1	Anhui	<i>Pheretima vulgaris</i>	S28	Shanghai*	<i>P. aspergillum</i>
S2	Shanghai	<i>P. vulgaris</i>	S29	Shanghai*	<i>P. aspergillum</i>
S3	Shanghai	<i>P. vulgaris</i>	S30	Shanghai*	<i>P. aspergillum</i>
S4	Shanghai	<i>P. vulgaris</i>	S31	Shanghai*	<i>P. aspergillum</i>
S5	Shanghai	<i>P. vulgaris</i>	S32	Shanghai*	<i>P. aspergillum</i>
S6	Shanghai	<i>Pheretima guillelmi</i>	S33	Shanghai*	<i>P. aspergillum</i>
S7	Anhui	<i>P. vulgaris</i>	S34	Shanghai*	<i>P. aspergillum</i>
S8	Anhui	<i>P. vulgaris</i>	S35	Shanghai*	<i>P. aspergillum</i>
S9	Shanghai	<i>P. vulgaris</i>	S36	Guangdong	<i>P. aspergillum</i>
S10	Anhui	<i>P. vulgaris</i>	S37	Shanghai*	<i>P. aspergillum</i>
S11	Shanghai	<i>P. vulgaris</i>	S38	Guangdong	Not assigned
S12	Anhui	<i>P. vulgaris</i>	S39	Guangdong	<i>Metaphire magna</i>
S13	Anhui	<i>P. vulgaris</i>	S40	Guangxi	<i>M. magna</i>
S14	Shanghai	<i>P. vulgaris</i>	S41	Fujian	<i>M. magna</i>
S15	Shanghai	<i>P. vulgaris</i>	S42	Hubei	<i>M. magna</i>
S16	Shanghai	<i>P. vulgaris</i>	S43	Guangxi	<i>M. magna</i>
S17	Shanghai	<i>P. vulgaris</i>	S44	Guangdong	<i>M. magna</i>
S18	Shanghai	<i>P. vulgaris</i>	S45	Guangdong	<i>M. magna</i>
S19	Hainan	<i>Pheretima aspergillum</i>	S46	Anhui	<i>Amyntas amis</i>
S20	Guangxi	<i>P. aspergillum</i>	S47	Anhui	<i>A. amis</i>
S21	Guangxi	<i>P. aspergillum</i>	S48	Shanghai	<i>Amyntas carnosus</i>
S22	Guangxi	<i>P. aspergillum</i>	S49	Shanghai	<i>Metaphire tschiliensis</i>
S23	Guangdong	<i>P. aspergillum</i>	S50	Hebei	<i>Amyntas hupeiensis</i>
S24	Anhui*	<i>P. aspergillum</i>	S51	Thailand	<i>Metaphire birmanica</i>
S25	Anhui*	<i>P. aspergillum</i>	S52	Guangdong	<i>Amyntas</i>
S26	Guangxi	<i>P. aspergillum</i>	S53	Unknown	<i>Amyntas</i>
S27	Shanghai*	<i>P. aspergillum</i>	S54	Shanghai*	Not assigned

**Table 2** The signature peptides sequences and MS parameters.

\*Quantitative ions

Name	Sequence	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Collision energy/eV
Peptide G	LITVWENYLK	639.9	1 052.5*	21
			852.4	29
Peptide H	FEELLGLQLQK	715.9	686.4*	19
			799.5	31
Peptide M	VLEGELAEAYER	658.1	1 102.5*	17
			674.3	29

**供试品溶液的制备** 药材与饮片: 取本品粉末 0.3 g, 加入蛋白裂解液 [4% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 20 mmol·L<sup>-1</sup> 二硫苏糖醇 (DTT), 50 mmol·L<sup>-1</sup> 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸溶液 (pH 8.8)] 5 mL, 置于 80 °C 超声处理 1 h, 放置至室温, 离心 20 min (12 000 r·min<sup>-1</sup>), 取上清液 200 μL, 加入 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 碘乙酰胺 (IAA) 溶液 20 μL, 室温避光封闭放置 45 min, 加入丙酮 900 μL (-20 °C 预冷), 充分混匀, -20 °C 沉淀 4 h, 于 4 °C 离心 20 min (12 000 r·min<sup>-1</sup>), 弃去上清液, 残渣用丙酮 (-20 °C 预冷) 洗涤 2 次, 每次 200 μL, 丙酮挥干, 残渣加 8 mol·L<sup>-1</sup> 尿素溶液 50 μL, 超声处理 30 min, 加 50 mmol·L<sup>-1</sup> 碳酸氢铵溶液 400 μL, 混匀, 加胰蛋白酶溶液 20 μL (1 mg·mL<sup>-1</sup>), 混匀, 37 °C 恒温酶解 18 h, 作为供试品溶液。地龙对照药材及自制掺伪样品按照上述相同方法制备供试品溶液。成方制剂: 按照处方量计算相当于 0.3 g 地龙的制剂量, 按照药材供试品制备方法制备成制剂供试品溶液。

**保宁腔蚓多肽 M 基质标准溶液的制备** 取地龙对照药材, 按照“供试品溶液的制备”方法至酶解处理前, 得地龙基质溶液。取保宁腔蚓多肽 M 适量, 加地龙基质溶液制成浓度为 1 μg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 作为标准储备溶液, 用地龙基质溶液配置浓度分别为 0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、0.75、1 μg·mL<sup>-1</sup> 的系列标准溶液。分别取上述溶液 90 μL, 加入胰蛋白酶溶液 (1 mg·mL<sup>-1</sup>) 4 μL, 摇匀, 37 °C 恒温酶解 18 h, 即得。

**色谱条件** 采用 CORTECS T3 C18 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm); 以乙腈为流动相 A, 以 0.1% 甲酸溶液为流动相 B, 洗脱梯度为 0~15 min, 13%~32% A; 进样量 5 μL; 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>。

**质谱条件** 采用电喷雾正离子模式 (ESI<sup>+</sup>), 进行多反应监测 (MRM), 干燥气温度 200 °C, 气体流速 13.0 L·min<sup>-1</sup>, 雾化气 35 psi, 鞘气流速 12 L·min<sup>-1</sup>, 碎裂电压 380 V, 母离子均为双电荷, 选择二级质谱图中响应好、碎片归属明确的子离子作为监测离子, 详见表 2。

**专属性** 分别精密吸取空白溶剂、广地龙 (S19)、沪地龙 (S1)、保宁腔蚓 (S39) 以及沪地龙常见伪品 (直

隶腔蚓、多肉远盲蚓、阿美远盲蚓)、湖北远盲蚓等的供试品溶液, 按照上述色谱条件和质谱条件测定, 同时记录广地龙多肽 G、沪地龙多肽 H 和保宁腔蚓多肽 M 相应的监测离子对, 来考察方法的专属性。

**重复性** 分别取广地龙样品 (S19)、沪地龙样品 (S1) 和自制掺伪样品 (保宁腔蚓掺入量 5%), 按照供试品溶液制备方法平行制备 6 份, 分别进样测定, 同时记录广地龙多肽 G、沪地龙多肽 H 与保宁腔蚓多肽 M 的定量离子的保留时间和峰强度, 计算相对标准偏差 (RSD) 值。

**稳定性** 分别取广地龙 (S19)、沪地龙 (S1) 和自制掺伪样品 (保宁腔蚓掺入量 5%) 的供试品溶液, 室温放置 2、4、6、8、12、16、24 h 后进样测定, 同时记录广地龙多肽 G、沪地龙多肽 H 与保宁腔蚓多肽 M 的定量离子的保留时间和峰强度, 计算 RSD 值。

**保宁腔蚓伪品检查方法基质效应** 地龙总蛋白酶解后的混合溶液多肽组成复杂, 可能会干扰目标多肽离子响应, 以对照品溶液的峰面积与基质加标溶液的峰面积之比来考察方法的基质效应。

**伪品保宁腔蚓检查方法基质标准曲线、线性范围及检出限** 分别精密吸取系列标准溶液, 进样分析, 测得峰面积。通过稀释保宁腔蚓多肽 M 对照品溶液, 以实际观察信噪比分别为 3、10 时相应的浓度, 作为检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。

**耐用性** 考察了三根色谱柱, CORTECS T3 C18 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm)、Agilent C18 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm, 2.7 μm) 和 WATERS BEH C18 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 按照上述色谱条件和质谱条件进样分析空白溶剂、地龙对照药材、保宁腔蚓多肽 M 基质对照品溶液 (浓度 100 ng·mL<sup>-1</sup>)、广地龙样品 (S19)、沪地龙样品 (S1) 和保宁腔蚓样品 (S39)。

## 结果

### 1 方法学考察

**1.1 专属性** 在广地龙多肽 G 的监测离子对 *m/z* 639.9→1 052.5 和 *m/z* 639.9→852.4 提取的色谱图中, 广地龙呈现相应的色谱峰, 空白溶剂、沪地龙、保宁腔蚓以及沪地龙常见伪品 (直隶腔蚓、多肉远盲蚓、阿美远盲蚓)、湖北远盲蚓等均未呈现相应色谱峰, 结果见图 2。在沪地龙多肽 H 的监测离子对 *m/z* 715.9→686.4 和 *m/z* 715.9→799.5 提取的色谱图中, 沪地龙呈现相应色谱峰, 空白溶剂、广地龙、保宁腔蚓以及沪地龙常见伪品 (直隶腔蚓、多肉远盲蚓、阿美远盲蚓)、湖北远盲蚓等均未呈现相应色谱峰。在保宁腔蚓多肽 M 的监测离子对 *m/z* 658.1→1 102.5 和 *m/z* 658.1→674.3 提取的色谱图

中, 保宁腔蚓呈现相应的色谱峰, 空白溶剂、广地龙、沪地龙以及沪地龙常见伪品(直隶腔蚓、多肉远盲蚓、阿美远盲蚓)、湖北远盲蚓等均未呈现相应色谱峰。以上结果表明地龙鉴别和伪品保宁腔蚓检查方法的专属性良好。

**1.2 重复性** 广地龙多肽 G、沪地龙多肽 H 与保宁腔蚓多肽 M 的保留时间 RSD 分别为 0.46%、0.52% 和 0.55%, 峰强度 RSD 分别为 5.0%、6.4% 和 4.1%, 说明该方法重复性良好。

**1.3 稳定性** 广地龙多肽 G、沪地龙多肽 H 与保宁腔蚓多肽 M 的保留时间 RSD 分别为 2.5%、2.4% 和 2.6%, 峰强度 RSD 分别为 3.4%、5.2% 和 7.0%, 表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

**1.4 保宁腔蚓伪品检查方法基质效应** 保宁腔蚓多肽 M 在标准曲线各浓度水平均存在较强的基质抑制效应(比值为 16%~27%), 因此配制基质对照品溶液可更准确地反映保宁腔蚓的含量。

**1.5 伪品保宁腔蚓检查方法基质标准曲线、线性范围及检出限** 以峰面积为纵坐标( $Y$ ), 保宁腔蚓多肽 M 对照品浓度( $X$ )为横坐标, 绘制标准曲线, 线性方程为  $Y=342.918\ 951X-14\ 708.880\ 87$ 、相关系数( $r$ )为 0.999 4, 在  $0.05\sim 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内线性关系良好, LOD 和 LOQ 分别为 1 和  $2\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

**1.6 耐用性** 不同色谱柱考察结果显示方法专属性良好、参比溶液的信噪比均大于 10, 可满足检验要求。

**1.7 伪品保宁腔蚓检查方法判定原则** 自制掺伪样品测定结果显示, 当保宁腔蚓掺入量为 1% 时, 即可检出保宁腔蚓多肽 M 的反应离子对  $m/z\ 658.1\rightarrow 1\ 102.5$  和  $m/z\ 658.1\rightarrow 674.3$ , 即检出保宁腔蚓; 掺入量 1%~10% 内呈现良好的线性关系( $r = 0.997$ )。考虑到地龙

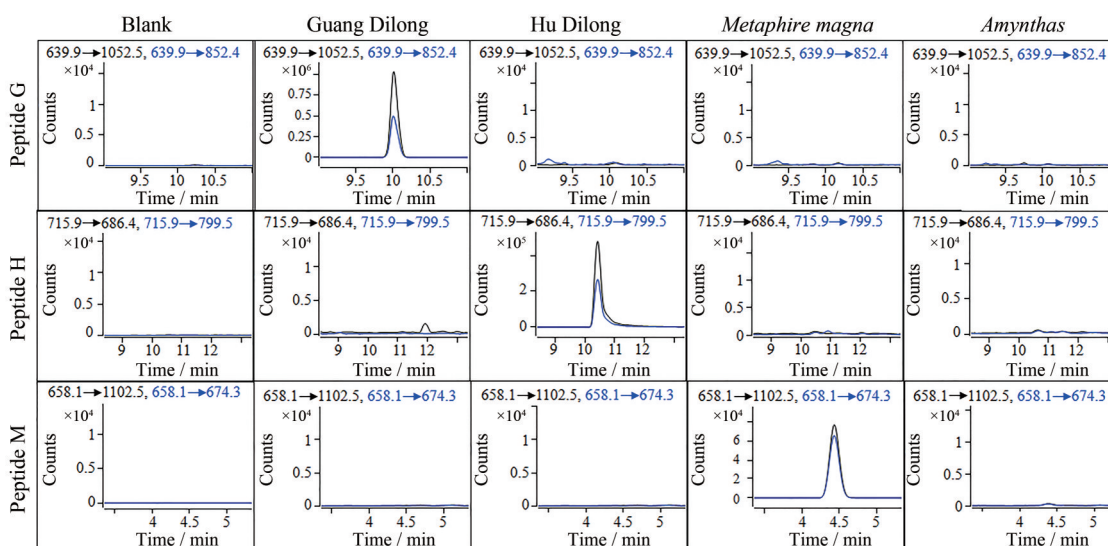
以野生为主, 同一区域内可能同时有广地龙、保宁腔蚓, 以广地龙中掺入 5% 保宁腔蚓时的对照品浓度作为限度要求, 浓度约为  $100\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果判定原则: ① 供试品的提取离子流色谱中, 未同时出现与对照品溶液色谱相应的色谱峰, 视为未检出; ② 供试品的提取离子流色谱中, 同时出现与对照品溶液色谱相应的色谱峰, 且供试品色谱中  $m/z\ 658.1\rightarrow 1\ 102.5$  的色谱峰面积值不大于对照品溶液中相应的峰面积值, 视为未检出; ③ 供试品的提取离子流色谱中, 同时出现与对照品溶液色谱相应的色谱峰, 且供试品色谱中  $m/z\ 658.1\rightarrow 1\ 102.5$  的色谱峰面积值大于对照品溶液中相应的峰面积值, 视为检出。

## 2 地龙药材测定

应用建立好的方法对 54 批市售地龙药材进行了分析, 结果显示 19 批(S1~S18、S54) 检出沪地龙多肽 H, 占比 35%, 绝大部分来源为通俗环毛蚓, 其中 S54 DNA 条形码分子鉴定结果显示为套峰, 除了检出威廉环毛蚓之外, 还检出了远盲蚓属未知品种; 19 批(S19~S37) 检出广地龙多肽 G, 占比 35%; 8 批(S38~S45) 检出保宁腔蚓多肽 M, 占比 15%, 其中 S38 还同时检出了多肽 G 和多肽 H, 证明该样品为三种地龙混合样; 8 批(S46~S53) 未检出任何多肽, 占比 15%。可见地龙药材市场约 30% 样品为非药典规定的基原品种, 其中最主要的伪品来源为保宁腔蚓。

## 3 成方制剂中地龙的鉴别与伪品保宁腔蚓的检查分析

在广地龙多肽 G 离子对提取的色谱图中, 阳性样品均呈现与地龙对照药材保留时间一致的色谱峰, 阴性样品中均未呈现相应色谱峰, 表明方法的专属性良



**Figure 2** Specificity investigation. Peptide G was only detected in Guang Dilong, peptide H was only detected in Hu Dilong, and peptide M was only detected in *M. magna*

好。检测结果显示6批小活络丸中2批检出广地龙, 1批检出沪地龙, 3批样品未检出任何监测离子; 4批伸筋丹胶囊中, 2批检出广地龙, 1批检出保宁腔蚓, 1批同时检出了广地龙和保宁腔蚓。

## 讨论

供试品溶液制备过程包括蛋白提取、纯化、还原烷基化、酶解等过程, 提取溶剂考察了水、0.9%氯化钠溶液和1%碳酸氢铵溶液, 参考中国药典(2020年版)中阿胶<sup>[1]</sup>的前处理方法, 结果显示均未检测到目标离子, 可见水溶液直接超声处理无法获取目标蛋白。参考文献<sup>[18]</sup>方法, 考察了蛋白裂解液超声处理, 结果可检测到目标离子, 考察了超声温度对提取效率的影响, 以离子 $m/z$  639.9→1 052.5和 $m/z$  715.9→686.4的峰面积为指标, 结果显示, 随着温度的升高, 提取量逐渐增加, 80和90℃时差异不明显, 因此确定超声温度为80℃。

结果显示, 市场上地龙混伪品众多, 主要存在以下原因: 蚯蚓在我国品种繁多、产地分布广泛, 同一区域可能分布有多种蚯蚓品种。目前地龙药材来源仍以野生为主, 缺乏正品药用蚯蚓的养殖基地。同时, 因药用资源匮乏, 地龙收购价格水涨船高, 导致部分农户采用电击方式灭绝式捕杀, 更是加剧了正品资源的急剧减少。保宁腔蚓等伪品并非传统药用地龙来源, 缺乏药效及毒理作用的系统研究。因此, 建立规范的药用蚯蚓养殖和加工基地, 从源头把控药材质量是目前解决地龙混伪品众多的根本方法。

因地域差异, 中国药典中将地龙分为广地龙和沪地龙, 质量标准项目中薄层鉴别项以对照药材为对照, 来源为参环毛蚓, 即广地龙, 尚无沪地龙对照药材。本课题组前期研究发现广地龙和沪地龙在小分子初级代谢产物、蛋白多肽大分子成分以及溶栓活性物质分布方面均具有较大的差异, 因此有必要增加沪地龙对照药材, 建议选择市场主流品种通俗环毛蚓作为对照药材来源。

综上所述, 本研究采用UHPLC-MS/MS建立了地龙的鉴别和伪品保宁腔蚓特征多肽的检查方法, 检测结果与DNA条形码分子鉴定结果一致, 方法准确性好, 可用于地龙及其相关制剂的质量控制, 同时本研究对于推广动物类中药中特征多肽质控方法研究具有一定的参考价值。

**作者贡献:** 刘蕊负责实验操作、数据采集与分析、文章撰写; 张静娴负责总体方向、数据分析与文章撰写; 胡青、孙健负责数据分析和阐释; 于泓、冉莹瑛、黄帆负责方法考察和优化; 毛秀红负责审阅文章与行政支持; 季申负责技术与材料支持和获取研究经费。

**利益冲突:** 本文无任何利益冲突。

## References

- [1] National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [2] Ge XG, Jiang C, Tian N, et al. DNA sequencing to identify zoological origin of commercial *Pheretima* from Chinese herbal markets and discussion on its herbal textual research [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2019, 21: 1206-1214.
- [3] Sun H, Tian F, Mao RQ, et al. Identification of commercial Di Long pieces by DNA barcode technology [J]. Strait Pharm J (中药与天然药物), 2019, 31: 35-38.
- [4] Zhang JX, Yang WZ, Li SR, et al. An intelligentized strategy for endogenous small molecules characterization and quality evaluation of earthworm from two geographic origins by ultra-high performance HILIC/QTOFMSE and progenesis QI [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408: 3881-3890.
- [5] Cheng TF, Zhang YH, Ye J, et al. Investigation of the chemical compounds in *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) using a combination of mass spectral molecular networking and unsupervised substructure annotation topic modeling together with *in silico* fragmentation prediction [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 184: 113197.
- [6] Sun J, Tian F, Zhang Y, et al. Chromatographic fingerprint and quantitative analysis of commercial *Pheretima aspergillum* (Guang Dilong) and its adulterants by UPLC-DAD [J]. Int J Anal Chem, 2019. DOI: 10.1155/2019/4531092.
- [7] Huang Q, Li ZW, Ma ZG, et al. Specific and rapid identification of the *Pheretima aspergillum* by loop-mediated isothermal amplification [J]. Biosci Rep, 2019, 39: BSR20181943.
- [8] Xing ZM, Gao H, Wang D, et al. A novel biological sources consistency evaluation method reveals high level of biodiversity within wild natural medicine: a case study of *Amyntas* earthworms as "Guang Dilong" [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13: 1755-1770.
- [9] Gao XY, Zhao Y, Guo Y, et al. Morphological and DNA double barcode identification of *Pheretima* and its adulterants [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 2530-2537.
- [10] Zhang QC, Liu HM, Liu N, et al. The design of specific primers of *Pheretima aspergillum* and the identification of adulterants [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2020, 36: 408-413.
- [11] Liu R, Wu WX, Zhu Y, et al. Progress and prospects of modern research methodology of animal derived traditional Chinese medicines [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2022, 38: 857-869.
- [12] Liu R, Zhao M, Duan JA. Ideas and strategies for investigating the bioactive constituents of animal derived traditional Chinese medicines based on integrated "proteomics/peptidomics-modifications" methods [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55:

- 1735-1743.
- [13] Yang B, Gao WY, Zhang YJ. Research ideas and methods of protein and peptides in animal medicine based on transcriptomics-proteomics-peptidomics integrated association analysis strategy [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 1033-1038.
- [14] Xue F, Wang B, Guo DX, et al. Discovery of species-specific peptide markers and development of quality-evaluation strategies for deer horn gelatin using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and a label-free methodology [J]. J Chromatogr A, 2023, 1705: 464153.
- [15] Liao JM, Gao M, Ding YL, et al. Characterization of the natural peptidome of four leeches by integrated proteogenomics and pseudotargeted peptidomics [J]. Anal Bioanal Chem, 2023, 415: 2795-2807.
- [16] Luo XH, Bi QR, Huang DD, et al. Characterization of natural peptides in *Pheretima* by integrating proteogenomics and label-free peptidomic [J]. J Pharm Biomed Anal, 2023, 13: 1070-1079.
- [17] Gu YF, Zhang JX, Sun J, et al. Marker peptide screening and species-specific authentication of *Pheretima* using proteomics [J]. Anal Bioanal Chem, 2021, 413: 3167-3176.
- [18] Liu R, Zhao M, Liu X, et al. Identification of specific peptides from Bubali Cornu by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 1279-1285.