

## 土鳖虫药材及其制剂特征离子鉴别研究

何嘉莹<sup>1</sup>, 胡绮萍<sup>1</sup>, 童培珍<sup>1</sup>,  
邱韵静<sup>1</sup>, 李国卫<sup>1\*</sup>, 陈向东<sup>1</sup>, 郭嘉亮<sup>2\*</sup>, 孙冬梅<sup>1</sup><sup>1</sup>广东一方制药有限公司, 佛山 528244; <sup>2</sup>佛山科学技术学院, 佛山 528000

**摘要:** 建立土鳖虫特征离子质谱测定方法, 对土鳖虫及其制剂进行真伪鉴别和质量评价。使用超高效液相色谱-三重四级杆质谱, 采用多反应监测模式, 选择质荷比( $m/z$ ) 415.72 (双电荷)  $\rightarrow$  406.72、415.72 (双电荷)  $\rightarrow$  667.34 作为检测离子对, 对土鳖虫药材及其制剂进行检测。24 批不同产地的土鳖虫药材、21 批土鳖虫提取物、6 批成方制剂均能检出该离子对色谱峰, 6 批不同动物药(地龙、龟甲、僵蚕、鸡内金、蝉蜕、水蛭)药材和 3 批土鳖虫混伪品(金边土鳖、金边龙虱、美洲大蠊)中均未检出相应的色谱峰。本研究建立的方法为有效补充土鳖虫药材及其饮片检验标准上的不足, 提高其质量控制水平, 及保证土鳖虫相关药品临床用药的安全性提供了参考依据。

**关键词:** 土鳖虫; 特征离子; 质谱; 质量控制

中图分类号: Q503

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)12-2108-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.12.010

Characteristic ion identification of *Eupolyphaga Steleophaga* and its preparationsHE Jia-ying<sup>1</sup>, HU Qi-ping<sup>1</sup>, TONG Pei-zhen<sup>1</sup>,  
QIU Yun-jing<sup>1</sup>, LI Guo-wei<sup>1\*</sup>, CHEN Xiang-dong<sup>1</sup>, GUO Jia-liang<sup>2\*</sup>, SUN Dong-mei<sup>1</sup><sup>1</sup>Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China; <sup>2</sup>Foshan University, Foshan 528000, China

**Abstract:** To establish a method for the determination of characteristic ion mass spectrometry of *Eupolyphaga Steleophaga*, to identify the authenticity of *Eupolyphaga Steleophaga* and its preparations, and to evaluate the quality of the medicinal materials and preparations of *Eupolyphaga Steleophaga* in the market. Ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry was used to detect the medicinal materials and preparations of *Eupolyphaga Steleophaga*.  $m/z$  415.72 (double charge)  $\rightarrow$  406.72 (double charge) and 415.72 (double charge)  $\rightarrow$  667.34 were used as detection ion pairs. The ion-pair chromatographic peak could be detected in 24 batches of *Eupolyphaga Steleophaga* of different origins, 21 batches of *Eupolyphaga Steleophaga* extract and six batches of square preparations. However, the corresponding chromatographic peaks were not detected in six batches of different animal drugs or three batches of its adulterants. The method established in this study effectively supplements the deficiencies in the inspection standards of *Eupolyphaga Steleophaga*, improves its quality control level, and provides a reference for the safety and efficacy of clinical use of *Eupolyphaga Steleophaga* related drugs.

**Key words:** *Eupolyphaga Steleophaga*; characteristic ion; mass spectrometry; quality control

土鳖虫首载于《神农本草经》, 列为中品<sup>[1]</sup>。土鳖虫<sup>[2]</sup>为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 或冀地鳖 *Steleophaga planicy* (Boleny) 的雌虫干燥体。土鳖虫<sup>[3]</sup>主要含有氨基酸、蛋白质、挥

发油类化合物, 另含有生物碱、脂肪酸、纤溶活性成分及微量元素等其他成分。土鳖虫具有散血瘀, 消坚结、消肿止痛、下乳通经等功效, 用于跌打损伤、筋骨骨折、血瘀经闭、产后瘀阻腹痛、癥痕痞块等。近代药理学研究表明土鳖虫有抗凝血、抗肿瘤、调血脂、镇痛、抗炎杀菌等活性, 甚至被称为“调节血液流动的首选药物”<sup>[4]</sup>, 临床上应用较广(据药智网数据库统计, 共收载含有土鳖虫的中成药处方 151 个), 用量亦较大。目前, 市场上销售的土鳖虫分为野生和人工饲养两种, 但由于野生土鳖虫数量逐年

收稿日期: 2023-05-23

接受日期: 2023-08-29

基金项目: 国家自然科学基金(82173781); 广东省基础与应用基础研究基金(2020B1515120033); 广东省岭南中药全过程质量控制与精准分析工程技术研究中心支持项目(2023-172); 佛山市岭南道地药材分子鉴定工程技术研究中心(2017-203)

\* 通信作者 Tel: 86-015017592618; E-mail: v1ng\_m2@163.com, janal-guo@126.com

减少,人工饲养品在临床应用中占极大比例,人为掺假使杂的行为时有发生,仅通过性状对其进行鉴别可能会出现误判现象<sup>[5,6]</sup>。整体而言,2020年版中国药典土鳖虫项下收录的检测项目较为简单,无法全面准确地反映土鳖虫真伪和质量优劣。

土鳖虫主要含有氨基酸、蛋白质、挥发油类化合物等,现阶段其质量相关研究也多围绕这些成分展开<sup>[5-8]</sup>。近年来,也有学者采用分子生物学方法对土鳖虫的真伪鉴别进行了研究,如:Chen等<sup>[9]</sup>也通过色谱及分子生物学建立地鳖及其伪品金边土鳖的鉴别方法,通过DNA条形码在与数据库比对后,即给出最接近物种的序列及其比对情况,可明确地判定出品种来源;Lu等<sup>[10]</sup>采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,分别对三种及同种不同产地的土鳖虫蛋白质进行鉴别研究,该法分辨率高、重现性良好。然而,分子生物学技术对实验室要求较高,难以推广,具有一定的局限性。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)中,土鳖虫药材鉴别项下仅有显微鉴别及薄层鉴别,且该方法仅适用于原料鉴别,对经煎煮后的土鳖虫提取物及含土鳖虫成方制剂,方法传递性较差,无法有效区分。

特征肽作为具有物种差异性的生物标志物,在动物药研究中日趋成熟,已有学者通过特征肽技术,实现了龟鳖甲类<sup>[11,12]</sup>、羚羊角<sup>[13,14]</sup>、阿胶<sup>[14,15]</sup>、鹿角胶<sup>[16]</sup>、蜈蚣<sup>[17]</sup>、鹿角<sup>[18]</sup>等研究,其专属性好、操作简便的特点,更易于在日常检验中进行推广。基于质谱检测的特征肽技术可同时设定多个物种特征肽离子信息作为检测指标,有望在实现真伪鉴别的同时,进一步准确判定掺伪成分并对掺伪成分相对定量,具有广泛和明朗的应用前景。《中国药典》2020年版中阿胶、鹿角胶、龟甲胶的鉴别项中已收录离子对测定。特征多肽作为质量指标出现在我国的官方法典中,也结束了法定标准中动物药无专属性质量

控制成分的局面。其中提取物多采用水为溶媒,土鳖虫等动物药经煎煮、熬制后,胶原蛋白发生非特异性降解,形成水溶性良好的肽类成分,部分肽类可透过生物膜吸收入血而发挥多种生物效应。然而,目前国内外尚未见有关土鳖虫药材及其制剂特征离子鉴别的报道。本研究通过借鉴上述特征离子鉴别技术,将其应用于土鳖虫真伪品鉴别,为土鳖虫及其制剂的质量研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与材料

Waters Xevo TQ-S Micro 三重四极杆液质联用仪(沃特世公司);Infinity II-6470LC/TQ 三重四极杆液质联用仪(安捷伦公司);HWS-28 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SHH-250SD 药品稳定性试验箱(重庆市永生实验仪器厂);ME204E 万分之一天平(梅特勒-托利多公司);XP26 百万分之一天平(梅特勒-托利多公司);Milli-Q Direct 超纯水系统(默克股份有限公司)。

土鳖虫(地鳖)对照药材(批号:121533-201704)由中国食品药品检定研究院提供;胰蛋白酶(批号:SLCC9020)由Sigma公司提供。乙腈、碳酸氢铵、甲酸为色谱级;水为超纯水(实验室自制);其他试剂为分析纯。

本研究选取24批市售土鳖虫药材样品,经广州中医药大学黄海波副教授鉴定,21批为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 的雌虫干燥体,3批为冀地鳖 *Steleophaga plancyi* (Boleny) 的雌虫干燥体,并收集其伪品(金边土鳖、金边龙虱、美洲大蠊)及其他动物药(地龙、龟甲、僵蚕、鸡内金、蝉蜕、水蛭)等样品,信息见表1。另外收集土鳖虫提取物21批及成方制剂6批,信息见表2。

表1 药材信息表

Table 1 Information of medicinal materials

编号 No.	药材 Medicinal herb	基原 Origin	产地 Information of origin
TBC-1	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	江苏省镇江市
TBC-2	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	江苏省镇江市
TBC-3	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	江苏省镇江市
TBC-4	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	山东省平阳县

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	药材 Medicinal herb	基原 Origin	产地 Information of origin
TBC-5	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	山东省平邑县
TBC-6	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	山东省平邑县
TBC-7	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	河南郑州
TBC-8	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	河南郑州
TBC-9	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	河南郑州
TBC-10	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	河南开封
TBC-11	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	河南开封
TBC-12	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	河南开封
TBC-13	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	湖北襄阳
TBC-14	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	湖北襄阳
TBC-15	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	湖北襄阳
TBC-16	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	江苏省镇江市
TBC-17	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	山东省平邑县
TBC-18	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	河南开封
TBC-19	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	江苏省镇江市
TBC-20	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	江苏省镇江市
TBC-21	土鳖虫	<i>E. sinensis</i> Walker	江苏省镇江市
JDB-1	土鳖虫	<i>S. plancyi</i> (Boleny)	河北
JDB-2	土鳖虫	<i>S. plancyi</i> (Boleny)	河北
JDB-3	土鳖虫	<i>S. plancyi</i> (Boleny)	河北
JBTB	金边土鳖	<i>Opisthoplatia orientalis</i> Burm.	广东
JBSL	金边龙虱	<i>Cybister japonicus</i> Sharp	江苏徐州
MZDL	美洲大蠊	<i>Periplaneta americana</i>	安徽亳州
BJ	鳖甲	<i>Trionyx sinensis</i> Wiegmann	安徽亳州
DL	地龙	<i>Pheretima aspergillum</i> (E. Perrier)	广西玉林
GJ	龟甲	<i>Chinemys reevesii</i> (Gray)	江西宜春
JC	僵蚕	<i>Bombyx mori</i> Linnaeus	四川宜宾
JNJ	鸡内金	<i>Gallus gallus domesticus</i> Brisson	浙江金华
CT	蝉蜕	<i>Cryptotympana pustulata</i> Fabricius	山东临沂
SZ	水蛭	<i>Whitmania pigra</i> Whitman	江苏苏州

表 2 土鳖虫提取物及成方制剂信息表

Table 2 Information of Eupolyphaga Steleophaga extract and prescription preparation

批号 Lot. No	名称 Name	生产厂家 Manufacturer
TG-2022001	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022002	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022003	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022004	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022005	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022006	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022007	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022008	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司

续表 2(Continued Tab. 2)

批号 Lot. No	名称 Name	生产厂家 Manufacturer
TG-2022009	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022010	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022011	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022012	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022013	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022014	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022015	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022016	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022017	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022018	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022019	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022020	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
TG-2022021	土鳖虫提取物	广东一方制药有限公司
20191001	宫瘤清片	广东百澳药业有限公司
190703-2	宫瘤清胶囊	四川宝鉴堂药业有限公司
190602	郁金银屑片	陕西香菊药业集团有限公司
K01005	中风回春丸	广州白云山敬修堂药业股份有限公司
0H01 0360029	止痛化癥片	陕西东泰制药有限公司
201001 021	骨刺宁胶囊	山西天致药业有限公司

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 样品制备

将样本研磨后,取 0.1 g 粉末(过三号筛),加入 100 mL 1% 碳酸氢铵溶液,称定重量,加热回流 30 min,放冷,称定重量,再用 1% 碳酸氢铵溶液补足减失重量,摇匀,之后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤作为母液备用。取母液 1 mL 置于进样瓶中,加入 50 μL 1 mg/mL 胰蛋白酶溶液(1% 碳酸氢铵溶液与胰蛋白酶混合配制而成),摇匀,37 °C 恒温酶解 12 h,作为供试品溶液。

### 1.2.2 特征离子分析测定条件

色谱条件:采用 Waters ACQUITY HSS T3 (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱;以乙腈为流动相 A,以 0.1% 甲酸溶液为流动相 B,梯度洗脱:0 ~ 3 min, 3% → 8% A; 3 ~ 45 min, 8% → 22% A; 45 ~ 54 min, 22% → 32% A; 54 ~ 54.1 min, 32% → 100% A; 54.1 ~ 58 min, 100% A; 流速为 0.3 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量 2 μL。

质谱条件:使用 Thermo Q-Exactive Focus 高分辨液质联用仪,电喷雾正离子模式(ESI<sup>+</sup>),设置为 Full-MS-ddMS<sup>2</sup> 模式,鞘气流速为 30 L/min; 辅助气流速为 10 L/min; 喷雾电压为 3.30 kV; 毛细管温度

为 320 °C; 辅助气温度为 320 °C。

### 1.2.3 专属性测定条件

色谱条件同“1.2.2”项下。

质谱条件:采用三重四级杆液质联用仪进行多反应监测(MRM),以质荷比( $m/z$ ) 415.72(双电荷) → 406.72、415.72(双电荷) → 667.34 作为检测离子对进行检测。

## 2 结果

### 2.1 特征离子的选择

通过使用 Thermo Q-Exactive Focus 高分辨液质联用仪采集经胰蛋白酶酶解后溶液的一级和二级质谱数据,将所采集的质谱数据在 Thermo Xcalibur 质谱软件上进行筛选对比,发现  $m/z = 415.72(+2)$  特征离子在不同批次土鳖虫样品中均能检测到(一级与二级图谱见图 1),显示出较高的响应。

为了进一步确认该特征离子的重现性。首先对土鳖虫特征离子的二级离子的质谱条件进行优化和选择,筛选出响应较高的二级离子,分别为  $m/z$  415.72(双电荷) → 406.72、415.72(双电荷) → 667.34。之后取样品粉末约 0.1 g,平行称定 6 份,按“1.2.1”项下制备供试品溶液,按“1.2.3”项下色谱条件及质谱条件,以土鳖虫特征分子离子峰  $m/z$

415.72 (双电荷) → 406.72、415.72 (双电荷) → 667.34 作为检测离子对,重复测试 6 次。6 份土鳖

虫供试品溶液中均检出相应的土鳖虫特征离子峰。

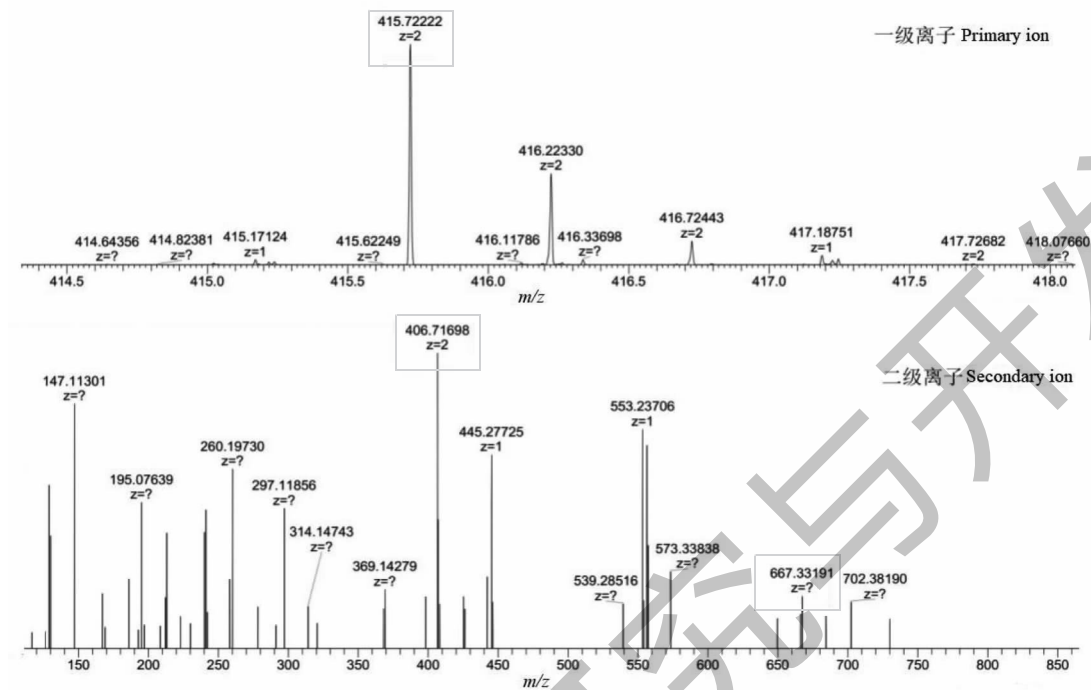


图 1 土鳖虫特征离子提取质谱图 ( $m/z = 415.72$ )

Fig. 1 Characteristic ion extraction mass spectrometry ( $m/z = 415.72$ ) of *Eupolyphaga Steleophaga*

## 2.2 稳定性试验

按上述方法重新配制了 6 份供试溶液,并分别对放置于常温 0、2、4、8、10、12 h 的供试溶液进行测定,从质谱提取流图发现该特征离子均能被检测到。

## 2.3 样品测定及定性鉴别

取 24 批土鳖虫药材(21 批地鳖、3 批冀地鳖)、6 种不同动物药(地龙、龟甲、僵蚕、鸡内金、蝉蜕、水蛭)药材和 3 种土鳖虫混伪品(金边土鳖、金边龙虱、美洲大蠊)药材样品,按“1.2.1”项下供试品制备方法制备供试品溶液和“1.2.3”项下色谱与质谱

条件分别进行测定,结果见表 3 及图 2,土鳖虫(地鳖)与土鳖虫(冀地鳖)特征离子色谱图见图 3,土鳖虫与其他动物药特征离子色谱图见图 4,以及土鳖虫与其他 3 种非药典土鳖虫品种特征离子色谱图见图 5。结果显示,在相应的保留时间处,以土鳖虫对照药材为参照,不同基原土鳖虫药材均检出明显色谱峰,不同动物药(地龙、龟甲、僵蚕、鸡内金、蝉蜕、水蛭)和土鳖虫混伪品(金边土鳖、金边龙虱、美洲大蠊)均未检出色谱峰,因此该特征离子可有效区别土鳖虫及其混伪品和其他动物药。

表 3 药材样品质谱测定结果

Table 3 Mass spectrometry results of medicinal materials

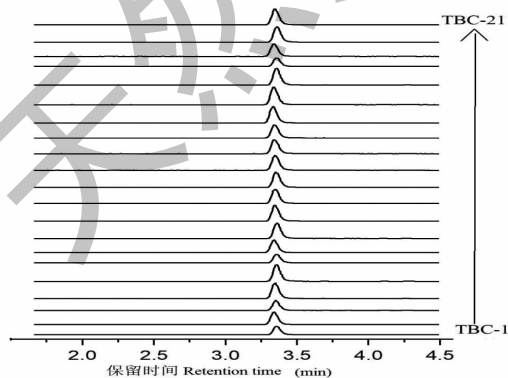
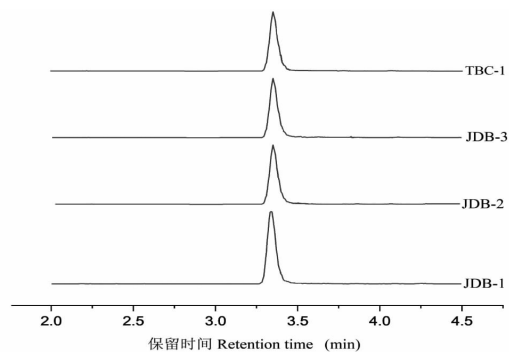
编号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	$m/z$ 415.72→406.72		$m/z$ 415.72→667.34	
		峰面积 Peak area	信噪比 Signal-to-noise ratio	峰面积 Peak area	信噪比 Signal-to-noise ratio
TBC-1	3.35	15 348	374	70	1 189
TBC-2	3.35	24 344	2 241	137	74
TBC-3	3.35	26 273	3 487	154	383
TBC-4	3.36	13 773	1 019	82	24
TBC-5	3.35	20 607	3 342	118	45

续表 3 (Continued Tab. 3)

编号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	$m/z$ 415.72→406.72		$m/z$ 415.72→667.34	
		峰面积 Peak area	信噪比 Signal-to-noise ratio	峰面积 Peak area	信噪比 Signal-to-noise ratio
TBC-6	3.36	24 501	2 062	141	82
TBC-7	3.35	24 559	3 582	154	56
TBC-8	3.35	22 502	2 854	127	46
TBC-9	3.35	23 986	2 496	131	104
TBC-10	3.35	23 980	1 233	138	82
TBC-11	3.34	22 295	2 386	161	47
TBC-12	3.34	21 092	2 167	128	14
TBC-13	3.33	27 028	2 586	159	426
TBC-14	3.34	28 638	1 962	182	274
TBC-15	3.35	27 620	1 828	155	75
TBC-16	3.35	10 705	1 544	47	729
TBC-17	3.39	11 601	1 798	50	773
TBC-18	3.38	8 547	2 137	40	675
TBC-19	3.36	29 445	8 486	135	70
TBC-20	3.36	29 329	6 481	144	34
TBC-21	3.36	26 479	3 286	134	208
JDB-1	3.36	22 904	5 044	164	303
JDB-2	3.36	22 814	3 024	187	290
JDB-3	3.36	22 893	3 533	196	313
JBTB	3.36	-	-	-	-
JBSL	3.36	-	-	-	-
MJDL	3.36	-	-	-	-
BJ	3.36	-	-	-	-
DL	3.36	-	-	-	-
GJ	3.36	-	-	-	-
JC	3.36	-	-	-	-
JNJ	3.36	-	-	-	-
CT	3.36	-	-	-	-
SZ	3.36	-	-	-	-

注:“-”表示未检出。

Note:“-” indicates that it is not detected.

图 2 21 批土鳖虫(地鳖)药材提取流图( $m/z=415.72$ )Fig. 2 Extracted ion chromatogram ( $m/z=415.72$ ) of 21 batches of *Eupolyphaga Steleophaga*图 3 土鳖虫(地鳖)与土鳖虫(冀地鳖)药材提取流图( $m/z=415.72$ )Fig. 3 Extracted ion chromatogram ( $m/z=415.72$ ) between *E. sinensis* Walker and *S. plancyi* (Boleny)

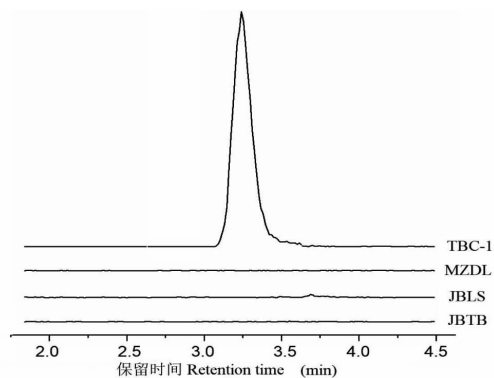


图4 土鳖虫及其伪品提取流图 ( $m/z = 415.72$ )

Fig. 4 Extracted ion chromatogram ( $m/z = 415.72$ ) of *Eupolyphaga Steleophaga* and its counterfeits

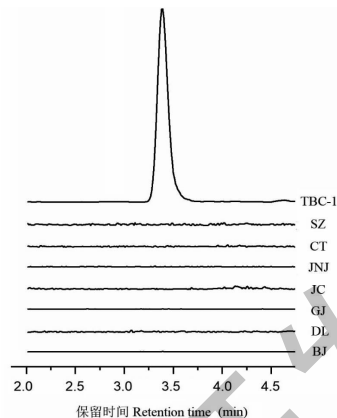


图5 不同品种动物药提取流图 ( $m/z = 415.72$ )

Fig. 5 Extracted ion chromatogram ( $m/z = 415.72$ ) of different species of animal medicine

## 2.4 土鳖虫提取物及制剂测定应用

取土鳖虫提取物及市售含土鳖虫成方制剂,按“1.2.1”项下供试品制备方法制备供试品溶液和“1.2.3”项下色谱与质谱条件进行测定,结果见表4。土鳖虫提取物和含土鳖虫成方制剂特征离子色

谱图见图6、图7。结果显示,在相应的保留时间处,以土鳖虫对照药材为参照,21批土鳖虫提取物及含土鳖虫成方制剂均检出明显色谱峰,该特征离子可有效从土鳖虫药材传递至其相关提取物及成方制剂。

表4 土鳖虫提取物及制剂样品质谱测定结果

Table 4 Mass spectrometry results of *Eupolyphaga Steleophaga* extract and its preparations

批号 Lot. No	保留时间 Retention time (min)	$m/z$ 415.72→406.72		$m/z$ 415.72→667.34	
		峰面积 Peak area	信噪比 Signal-to-noise ratio	峰面积 Peak area	信噪比 Signal-to-noise ratio
TG-2022001	3.35	85 380	5 799	586	169
TG-2022002	3.35	115 566	3 874	799	1 323
TG-2022003	3.36	154 354	7 179	1 120	360
TG-2022004	3.36	71 246	4 148	410	248
TG-2022005	3.33	93 823	4 087	635	566
TG-2022006	3.34	129 204	8 535	817	1 148
TG-2022007	3.34	123 066	6 393	833	278
TG-2022008	3.34	118 020	5 288	827	442
TG-2022009	3.34	119 428	5 076	778	72
TG-2022010	3.34	134 123	9 413	841	549
TG-2022011	3.34	128 953	7 466	800	299
TG-2022012	3.34	107 550	5 757	546	346
TG-2022013	3.34	159 112	5 979	791	265
TG-2022014	3.34	156 691	5 366	758	302
TG-2022015	3.34	137 327	6 984	615	117
TG-2022016	3.35	51 574	15 234	265	4 166
TG-2022017	3.37	44 032	5 754	205	3 396
TG-2022018	3.36	46 609	3 134	209	3 197
TG-2022019	3.36	83 771	10 891	419	232

续表 4(Continued Tab. 4)

批号 Lot. No	保留时间 Retention time (min)	$m/z$ 415.72→406.72		$m/z$ 415.72→667.34	
		峰面积 Peak area	信噪比 Signal-to-noise ratio	峰面积 Peak area	信噪比 Signal-to-noise ratio
TG-2022020	3.36	71 528	15 928	343	125
TG-2022021	3.30	90 367	9 805	468	260
20191001	3.35	945	11	52	10
190703-2	3.35	946	12	48	7
190602	3.35	584	6	31	3
K01005	3.36	382	6	30	4
0H01 0360029	3.35	745	13	72	11
201001 021	3.36	13 243	40	1 238	32

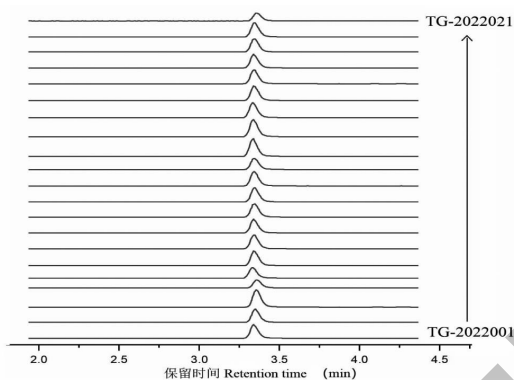


图 6 21 批土鳖虫提取物提取流图 ( $m/z = 415.72$ )  
Fig. 6 Extracted ion chromatogram ( $m/z = 415.72$ )  
of 21 batches of Eupolyphaga Steleophaga extract

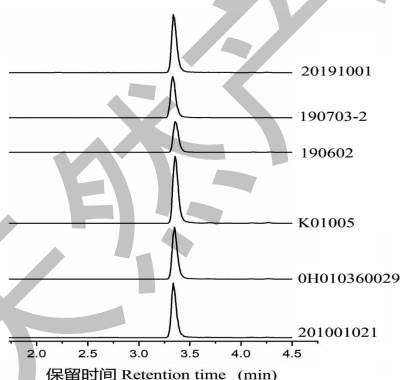


图 7 含土鳖虫成方制剂提取流图 ( $m/z = 415.72$ )  
Fig. 7 Extracted ion chromatogram ( $m/z = 415.72$ )  
of formula containing Eupolyphaga Steleophaga extract

### 3 讨论与结论

土鳖虫已被证实具有治疗各种疾病的功效<sup>[19]</sup>,例如癌症<sup>[20]</sup>、抑制血栓形成<sup>[21]</sup>、增强免疫<sup>[22]</sup>和治疗股骨头缺血性坏死<sup>[23]</sup>等。最近,报道发现土鳖虫与

水蛭和蜈蚣一起在子宫内膜炎方面显示出了明显的临床疗效<sup>[24]</sup>。然而,正确识别土鳖虫及含有土鳖虫的方剂是困难的。目前,关于动物药的质量检测多集中在性状、显微、薄层等检测手段,且大多数动物药含有的氨基酸、核苷类成分组成较为类似,也造成了目前动物药品种鉴定和品质分析的模糊性。因此,开发建立一系列具有专属性的动物药识别鉴定的分析方法对动物药质量控制和评价是至关重要的<sup>[25]</sup>。近年来,基于特征肽定性/定量分析的动物类中药质量控制模式已逐步推广应用,2020年版《中国药典》中收录了阿胶、鹿角胶、龟甲胶的专属肽鉴别方法,但尚无土鳖虫中特征离子鉴别的方法。

本研究建立的特征离子通过蛋白质酶切技术,以1%碳酸氢铵溶液作为提取溶剂,以胰蛋白酶对样品进行酶解后检测;并对样品分别进行提取方式、提取酶用量及提取时间等因素考察,确定最佳提取考察项分别为加热回流(提取方式)、50  $\mu\text{L}$ (提取酶用量)和30 min(提取时间)。

由于《中华人民共和国药典》收录土鳖虫质量控制方法较为单一,导致在土鳖虫市场上制假售假、以次充好的现象屡见不鲜。目前市场上土鳖虫的价格持续上涨,不法分子为了经济利益,在土鳖虫药材中掺杂白矾和食盐等成分增重获利,甚至用伪品替代正品<sup>[1]</sup>。此外,金边土鳖<sup>[26]</sup>亦收录至广东省中药材标准中,作为地方习用品一直沿用,但研究显示金边土鳖与地鳖、冀地鳖的成分确有差异<sup>[27]</sup>;同时不同动物药标准汤剂已失去饮片形态、难以鉴别,因此本研究建立了一种基于质谱的特征离子鉴别技术,发现  $m/z$  415.72(双电荷)→406.72、415.72(双电荷)→667.34 能作为土鳖虫鉴别的特征离子。通过



对 24 批不同来源的土鳖虫药材、21 批土鳖虫提取物、6 批含土鳖虫成方制剂、6 种不同动物药及 3 种土鳖虫混伪品进行应用检测,该检测方法可适用于 2 种不同基原土鳖虫,证实了该特征离子的专属性,即使是对已失去原本药材性状的含土鳖虫的中间体及制剂也有明显区分。

同时,该方法简单易用、重现性高,且无复杂的前处理流程,大大降低了该方法的实施门槛。虽然,大量研究表明以特征肽鉴别动物类中药的方法是合理可行的,但相关质量评价方法尚需要进一步丰富与完善,这也是未来中药质量控制研究的重要方向。综上所述,本研究建立的方法将有效的补充土鳖虫药材及其饮片检验标准上的不足,解决了土鳖虫长期以来仅能通过传统经验来鉴别真伪的问题,提高其质量控制水平,为土鳖虫相关药品临床用药的安全性和有效性提供参考依据。

#### 参考文献

- Zhang Y. Identification of the *Eupolyphaga sinensis* Walker and its counterfeits[J]. Chin J Clin Res(中国临床研究), 2011,24:529-539.
- National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2020:19-20.
- Wu FL,Zhou BS,Dong QH, et al. The pharmacological and pharmacological study of *Eupolyphaga Steleophaga* and its clinical research progress[J]. Sp Wild Econ Anim Plant Res(特产研究),2018,40:67-74.
- Wan D. Study on the quality standards of traditional Chinese medicine powder of *Eupolyphaga* [D]. Changsha:Hunan University of Chinese Medicine(湖南中医药大学),2023.
- Ju K,Zhang XY,Hu YF, et al. Study on the identification of the microcharacters of the *Eupolyphaga Steleophaga* and its adulterants[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019,31:1608-1616.
- Shui CH,Cao H. Improvement of quality standard of terrapin [J]. Guide Chin Med(中国医药指南),2014,12:69-70.
- Jing J,Cao H. Determination of auranofin and uracil in *Eupolyphaga seu Steleophaga* by HPLC[J]. J Pharm Pract(药学实践杂志),2010,28:134-136.
- Wan D,Cai P,Zhang SH. Determination of uraci and hypoxanthine contents in ultramicro power of *Eupolyphaga*[J]. J Hunan Univ Chin Med(湖南中医药大学学报),2011,31:36-37.
- Chen WT,Chen Z,Luo WH. Study on identification between

*Eupolyphaga sinensis* Walker and *Opisthoptalia orientalis* Burm. by chromatography and molecular biology[J]. Pharm Today(今日药),2017,27:5.

- Lu Y,Jiang PF. Protein electrophoresis identification of animal drugs(I)-*Eupolyphaga Steleophaga* [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报),1997,20:45-46.
- Qian M,Liu YW,Liu XH, et al. Authenticity identification of 10 kinds of *Testudinis Carapax et Plastrum* and *Trionycis Carapax* based on UPLC-QTOF-MS[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2022,37:3434-3440.
- 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.
- Wang YT,Shi F,Hang BJ. Determination of antelope horn peptide in antelope horn by UPLC-MS/MS[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2020,35:3698-3701.
- Cheng XL,Chen J,Li MH, et al. Identification study of glue medicines[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志),2015,50:104-108.
- Wang F,Li GH,Yi X, et al. HPLC-QQQ MS identification of donkey-hide gelatin, glue of tortoise shell and deerhorn glue in Yixuesheng capsules[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志),2020,40:1882-1886.
- Xue F,Yu YM,Guo DX, et al. Discovery and specificity verification of characteristic peptide for *Cervi Cornus Colla*[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志),2022,57:1998-2003.
- Li YC,Hu LJ,Zhang Q, et al. Analysis of three peptide components in centipede by UFLC-MS/MS and its application in identification of centipede [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报),2022,38:945-952.
- Yang HJ,Liu R,Chen SJ, et al. Detection of deer horn specific peptides using ultrasonic assisted digestion combined with tandem mass spectrometry [J]. Chin J Modern Appl Pharm(中国现代应用药理学),2022,39:2543-2548.
- Kim BS,Jin SH,Park JY, et al. Scoping review of the medicinal effects of *Eupolyphaga sinensis* Walker and the underlying mechanisms[J]. J Ethnopharmacol,2022,296:115454.
- Zhan Y,Zhang H,Liu R, et al. *Eupolyphaga sinensis* Walker ethanol extract suppresses cell growth and invasion in human breast cancer cells [J]. Integr Cancer Ther,2016,15:102-112.
- Xie F,Li X,Sun K, et al. An experimental study on drugs for improving blood circulation and removing blood stasis in treating mild chronic hepatic damage [J]. J Tradit Chin Med,2001,21:225-231.