

不同来源市售醋鳖甲水提取物的氨基酸含量分析

廖彭莹^{1*}, 刘华宇¹, 孙雪芹¹, 刘舒凌², 张淼³

[1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学, 教学实验实训中心, 南宁 530200;
3. 广西中医药大学, 广西壮瑶药重点实验室(壮瑶药协同创新中心), 南宁 530200]

摘要: 目的 对不同来源市售醋鳖甲水提取物的水解氨基酸进行综合分析评价。**方法** 采用水煎煮法得到醋鳖甲水提取物, 将提取物冻干后经酸水解法处理, 采用氨基酸自动分析仪测定各提取物水解氨基酸组成和含量, 评价各提取物必需氨基酸的营养价值, 计算呈味氨基酸和药用氨基酸占总氨基酸的质量分数, 采用主成分分析、聚类分析和正交偏最小二乘法分析对氨基酸品质进行评价。**结果** 除 1 号样品外, 从醋鳖甲水提取物中均检出 16 种氨基酸, 必需氨基酸/非必需氨基酸(essential amino acids/non-essential amino acids, E/N)比例和必需氨基酸/氨基酸总量(essential amino acids/total amino acids, E/T)比例均低于理想蛋白质要求。通过主成分分析, 对醋鳖甲水提取物的综合品质进行评分, 排序为 7 号>5 号>1 号>4 号>6 号>11 号>2 号>9 号>10 号>8 号>3 号。聚类分析和正交偏最小二乘法分析表明, 醋鳖甲水提取物可分为两大类。**结论** 醋鳖甲水提取物不符合理想蛋白质的要求, 营养价值低, 但有良好口感, 富含药用氨基酸是醋鳖甲水提取物具备药用价值的重要物质基础。主成分分析、聚类分析和正交偏最小二乘法的分析结果基本一致, 均可用于分析不同来源醋鳖甲水提取物的氨基酸组成差异。

关键词: 醋鳖甲; 水提取物; 氨基酸; 综合评价

Analysis of amino acids content of the aqueous extracts of *Carapax trionycis* from different sources

LIAO Peng-Ying^{1*}, LIU Hua-Yu¹, SUN Xue-Qin¹, LIU Shu-Ling², ZHANG Miao³

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Teaching Experiment and Training Centre, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Collaborative Innovation Center of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

ABSTRACT: Objective To comprehensively evaluate the hydrolyzed amino acids of the aqueous extracts of *Carapax trionycis* from different sources. **Methods** The aqueous extracts of *Carapax trionycis* were prepared by the

基金项目: 国家自然科学基金项目(81960698)、2022 年自治区中药学研究生联合培养基地开放项目(桂学位〔2021〕6 号)、中药学一流学科项目(桂教科研[2018]12 号)、2017 年广西中医药大学青年基金项目(2017QN011)、广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划项目(桂教师范[2019]81 号)、广西壮瑶药重点实验室科研任务项目(GXZYKF2022-10)、广西中医药大学‘桂派中医传承创新团队’资助项目(2022A005)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (81960698), the 2022 Open Project of Joint Training Base for Postgraduates in Chinese Medicine in the Autonomous Region (Gui Degree [2021] No.6), the First-class Discipline of Chinese Medicine (Gui [2018] No.12), the 2017 Youth Fund Project of Guangxi University of Chinese Medicine (2017QN011), the Guangxi Higher Education Thousands of Young and Middle-aged Backbone Teachers Cultivation Program (Gui Teachers [2019] No.81), the Guangxi Zhuang and Yao Medicine Key Laboratory Scientific Research Task (GXZYKF2022-10), and the Guangxi University of Chinese medicine ‘Guipai Chinese Medicine Inheritance and Innovation Team’ Funded Project (2022A005)

*通信作者: 廖彭莹, 博士, 教授, 主要研究方向为药食同源动植物中活性成分的研究开发。E-mail: gxlpy@163.com

*Corresponding author: LIAO Peng-Ying, Ph.D, Professor, College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, No.13 Wuhe Avenue, Qingxiu District, Nanning 530200, China. E-mail: gxlpy@163.com

water decoction method, and the extracts were freeze-dried and treated by acid hydrolysis. The composition and content of hydrolyzed amino acids in each extract were determined by amino acid automatic analyzer. The nutritional value of essential amino acids in each extract was evaluated. The quality of amino acids was evaluated by principal component analysis, cluster analysis and orthogonal partial least square analysis. **Results** Except for sample No.1, the 16 kinds of amino acids were detected in the aqueous extracts of *Carapax trionycis*. The essential amino acids/non-essential amino acids (E/N) ratio and essential amino acids/total amino acids (E/T) ratio were lower than the ideal protein requirements. The overall quality of the aqueous extracts of *Carapax trionycis* were evaluated by principal component analysis and ranked as No.7>No.5>No.1>No.4>No.6>No.11>No.2>No.9>No.10>No.8>No.3. The extracts could be divided into 2 categories by clustering analysis and orthogonal partial least square method. **Conclusion** The aqueous extracts of *Carapax trionycis* do not meet the requirements of ideal protein, and possess low nutritional value. The extracts may possess good taste, and the rich medicinal amino acids may be the important material basis for the aqueous extracts of *Carapax trionycis* to possess medicinal value. The results of principal component analysis, cluster analysis and orthogonal partial least squares are basically consistent, all of which can be used to analyze the differences of amino acids compositions between the aqueous extracts of *Carapax trionycis* from different sources.

KEY WORDS: *Carapax trionycis*; aqueous extracts; amino acids; comprehensive evaluation

0 引言

鳖(*Pelodiscus sinensis* Wiegmann)是一种兼具食用价值和药用价值的水产品,近年来产值规模不断扩大^[1]。《中华本草》^[2]收录了鳖的各部位功效,鳖甲是其背甲部位^[2-3],国家卫生部于2002年将鳖甲归于“可用于保健食品的物品名单”,2020版中国药典也收录鳖甲。鳖甲含有多种营养成分,可以增强人体免疫功能,常被加工成保健食品,如升麻鳖甲汤^[1],临床多以醋鳖甲(*Carapax trionycis*)入药^[1,4-8]。

鳖含有丰富的蛋白质、活性肽及氨基酸类成分^[9-11],而鳖甲富含胶原蛋白^[12],研究表明,胶原蛋白经前期处理后所生成的分子量较小的肽类成分具有生物活性。如研究人员从鳖甲抗肝纤维化活性较强组分中鉴定出了活性肽段^[13-18],对鳖甲提取物酶解同样释放了部分活性肽^[12,19-20]等。

研究表明,醋鳖甲抗肝纤维化有效部位的主要成分为肽类物质^[21]。而丰富的氨基酸是构成活性肽的基础,鳖甲氨基酸种类齐全、含量丰富,已有研究采用氨基酸自动分析仪从醋鳖甲中测得了17种游离氨基酸^[22],因此探究鳖甲的氨基酸组成及含量具有重要价值。廖彭莹等^[23]曾采用柱前衍生化-高效液相色谱法分析鳖甲氨基酸含量,发现不同来源醋鳖甲在氨基酸总量方面有一定差异。这说明市场流通的醋鳖甲的氨基酸组成及含量需要进一步比较分析。

关于鳖甲的质量标准目前仅有水分和浸出物的规定^[3]。有研究表明以蒸馏水为溶剂提取醋鳖甲与传统鳖甲用药以水煎煮相符,浸出物含量都能达到要求^[24-25]。但是,目前对于醋鳖甲浸出物的氨基酸组成没有明确的标准参考。为了进一步优化鳖甲的质量控制方法,本研究对不同来源醋鳖甲水提取物进行了氨基酸组成和含量测定,应用主成分

分析法、聚类分析及偏最小二乘法进行分析,旨在客观评价市售醋鳖甲氨基酸组分的差异,以期为醋鳖甲质量评价方法的进一步优化及建立提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

醋鳖甲样品均随机购买于广西南宁市不同药店,具体信息如表1所示。

表1 醋鳖甲样品来源
Table 1 Sources of *Carapax trionycis* samples

编号	厂家	药店	批号
1	a	A	20191008
2	b	B	20200117
3	c	C	20190601
4	d	D	20190525
5	e	E	自制散装
6	f	F	20120130
7	g	G	20190305
8	h	H	20191110
9	i	I	20180515
10	h	J	20191110
11	c	K	20170814

氨基酸混合标准溶液(H型, Lot.ESP6332, 日本Wako公司); 盐酸等试剂(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

Hitachi L-8900 氨基酸自动分析仪(株式会社日立制作所); Infinite M200 PRO 酶标仪(帝肯贸易有限公司); EL204 万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); HW-200TG 微孔板恒温振荡器(上海沪析实业有限公司);

Labconco FreeZone 冷冻干燥机(美国 Labconco 公司)。

1.3 方法

1.3.1 水提取物制备

将样品粉碎后过 20 目筛, 精密称取 50 g, 加 10 倍量去离子水, 煎煮 2 h, 煎煮过程中补足挥发损失的水, 煎煮结束后进行过滤, 将滤液浓缩冻干。

1.3.2 氨基酸分析

精密称取水提取物一定质量, 参照 GB/T 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》进行水解氨基酸的测定。样品均送至江苏盐城市某检测技术服务公司检测, 含量结果为检测报告所给出的检测值。

1.4 数据处理

采用 Excel 2019 软件对实验数据进行处理, 采用 SPSS 23.0 和 SIMCA 13.0 软件对实验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 水提取物氨基酸组成和含量分析

由表 2 可知, 从 1 号样品中检出 15 种氨基酸, 从 2~11

号样品中均检出 16 种氨基酸, 所有样品均未检出 Cys 和 Trp, 这是由于 Cys 难溶于水, 在水提取物中难以检出; 在酸性条件下 Trp 会被破坏, 亦无法检出。含量较高的氨基酸为 Gly、Ala、Pro、Glu 和 Arg, 这与相关研究一致^[21], 高浓度的 Ala、Pro 和 Gly 是鳖甲氨基酸的特征。1 号样品的氨基酸总量最高, 最低的是 9 号样品, 但最高含量与最低含量相差 1.3 倍, 说明本研究中不同来源醋鳖甲水提取物总氨基酸含量相差不大。各样品中 Asp、Glu、Ala 和 Val 含量差异较小, 氨基酸含量相差较大的是 Thr、Ser、Lys 和 Arg。从 1 号样品检出 6 种必需氨基酸, 从 2~11 号样品中均检出 7 种必需氨基酸。必需氨基酸总量最高的为 1 号样品, 最低的为 8 号样品, 同样相差 1.3 倍。11 个样品的必需氨基酸/非必需氨基酸(essential amino acids/non-essential amino acids, E/N)比例和必需氨基酸/氨基酸总量(essential amino acids/total amino acids, E/T)均远低于联合国粮农组织/世界卫生组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, FAO/WHO)提出的理想蛋白质要求^[26], 说明醋鳖甲水提取物营养价值低。

表 2 不同来源醋鳖甲水提取物的氨基酸组成分析(g/100 g)
Table 2 Analysis of amino acids compositions of aqueous extracts of *Carapax Trionycis* from different sources (g/100 g)

氨基酸种类	氨基酸含量										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Asp	3.77	4.01	3.17	4.04	4.07	4.29	4.12	3.36	3.87	3.61	4.04
Thr	1.50	1.24	0.69	1.40	1.63	1.59	1.79	1.18	1.75	1.29	1.58
Ser	2.20	2.15	1.00	2.17	2.34	2.42	2.67	1.72	2.68	1.85	2.22
Glu	7.22	6.99	6.29	7.16	7.55	7.85	7.65	6.04	6.85	6.43	6.87
Gly	22.78	21.97	19.39	20.42	21.87	21.96	20.08	19.21	16.55	20.29	20.58
Ala	11.47	11.18	10.32	10.73	11.37	11.77	10.90	10.73	8.77	10.92	11.47
Val	1.37	1.33	1.22	1.08	1.22	1.26	1.19	1.20	0.94	1.14	1.19
Met	-	0.20	0.35	0.38	0.33	0.09	0.18	0.10	0.35	0.23	0.31
Ile	1.66	1.38	1.07	1.41	1.18	1.36	1.22	1.16	0.94	1.25	1.19
Leu	2.74	2.28	2.25	2.45	2.44	2.45	2.21	2.05	1.63	2.07	2.27
Tyr	0.57	0.84	0.41	0.76	0.57	0.34	0.57	0.44	0.50	0.65	0.49
Phe	1.89	2.06	2.01	1.85	1.86	1.54	1.46	1.33	1.21	1.48	1.29
Lys	1.99	1.70	1.07	1.76	1.94	1.95	2.12	1.50	1.91	1.56	1.95
His	0.23	0.21	0.18	0.24	0.25	0.16	0.24	0.20	0.27	0.18	0.22
Arg	5.78	5.40	3.12	4.84	5.27	5.74	5.16	4.27	4.68	5.17	6.53
Pro	12.82	9.89	9.55	9.20	9.74	9.92	8.69	8.22	7.75	9.86	10.64
T 总量	77.99	72.63	61.74	69.51	73.30	74.60	70.07	62.61	60.30	67.75	72.53
E 总量	11.15	10.19	8.66	10.33	10.60	10.24	10.17	8.52	8.73	9.02	9.78
N 总量	66.84	62.64	53.43	59.56	63.03	64.45	60.08	54.19	51.92	58.96	63.06
E/N/%	16.68	16.27	16.21	17.34	16.82	15.89	16.93	15.72	16.81	15.30	15.51
E/T/%	14.30	13.99	13.95	14.78	14.40	13.71	14.48	13.59	14.39	13.27	13.43

注: -代表在该样品中未检出此氨基酸。

2.2 水提取物特殊功效氨基酸含量及评价

2.2.1 必需氨基酸营养价值评价

参照杨旭昆等^[27]的方法对水提取物必需氨基酸的营养价值进行分析评价。由表3可知,所有必需氨基酸指数(essential amino acid index, EAA)值均低于FAO/WHO模式谱,进一步说明醋鳖甲水提取物不符合理想蛋白质要求。由表4的氨基酸比值(ratio of amino acid, RAA)和氨基酸比值系数(ratio coefficient, RC)看出,水提取物的限制性氨基酸均为Met。1号、4号、5号、6号、7号、9号、10号和11号的Val含量均相对不足,Leu的含量均相对过剩。除了5号、7号、9号、11号样品中Ile的含量较为接近模式谱,其余样品的含量均相对过剩。除了3号样品,其余样品Lys的含量相对过剩。Phe+Tyr的含量则有差异,

2号、3号样品的含量相对过剩,但6号、7号、9号、11号样品的含量相对不足。Thr的含量同样有一定差异,3号样品的含量相对不足,其余样品的含量均相对过剩。水提取物的比值系数分(score of ratio coefficient, SRC)排序为3号>10号>2号>5号>4号>11号>8号>9号>7号>6号>1号。这提示3号样品的营养价值相对较高,但Thr的含量相对不足。1号样品的氨基酸总量最高,但未检出Met,造成RC值波动较大,因而SRC值最低^[27]。SRC值越接近100,提示蛋白质营养价值越高,不同来源醋鳖甲水提取物的SRC值之间有差别,但均小于80,进一步说明其本身不是理想的食用蛋白质,但可以考虑搭配蛋白质含量较高,特别是Met含量较高的食物,如食用菌类^[28]、肉类^[9],以提升其食用价值。

表3 不同来源醋鳖甲水提取物的EAA值
Table 3 EAA values of aqueous extracts of *Carapax trionycis* from different sources

种类	Ile	Leu	Lys	Met+Cys	Phe+Tyr	Thr	Val
WHO/FAO 模式谱	4	7	5.5	3.5	6	4	5
1	2.13	3.51	2.55	0	2.42	1.92	1.76
2	1.89	3.13	2.33	0.27	2.83	1.70	1.83
3	1.72	3.62	1.72	0.56	3.24	1.11	1.96
4	2.02	3.51	2.52	0.54	2.65	2.00	1.55
5	1.60	3.31	2.63	0.45	2.53	2.21	1.66
6	1.82	3.28	2.61	0.12	2.06	2.13	1.69
7	1.74	3.15	3.02	0.26	2.08	2.55	1.69
8	1.85	3.27	2.39	0.16	2.12	1.88	1.91
9	1.55	2.69	3.15	0.58	2.00	2.89	1.55
10	1.84	3.05	2.29	0.34	2.18	1.90	1.68
11	1.63	3.12	2.68	0.43	1.77	2.17	1.63

表4 不同来源醋鳖甲水提取物的RAA、RC和SRC值
Table 4 RAA, RC and SRC values of aqueous extracts of *Carapax trionycis* from different sources

种类	Ile		Leu		Lys		Met+Cys		Phe+Tyr		Thr		Val		SRC
	RAA	RC	RAA	RC	RAA	RC	RAA	RC	RAA	RC	RAA	RC	RAA	RC	
1	0.53	1.36	0.50	1.43	0.46	1.19	0	0	0.40	1.03	0.48	1.23	0.35	0.90	52.46
2	0.47	1.23	0.45	1.22	0.42	1.11	0.08	0.20	0.47	1.23	0.43	1.11	0.37	0.95	63.44
3	0.43	1.15	0.52	1.32	0.31	0.83	0.16	0.43	0.54	1.43	0.28	0.74	0.39	1.04	64.70
4	0.50	1.23	0.50	1.62	0.46	1.12	0.16	0.38	0.44	1.08	0.50	1.22	0.31	0.75	62.75
5	0.40	1.01	0.47	1.43	0.48	1.20	0.13	0.32	0.42	1.06	0.55	1.39	0.33	0.83	63.38
6	0.46	1.20	0.47	1.39	0.47	1.26	0.03	0.09	0.34	0.91	0.53	1.41	0.34	0.89	55.00
7	0.43	1.07	0.45	1.33	0.55	1.36	0.07	0.18	0.35	0.86	0.64	1.58	0.34	0.84	55.12
8	0.46	1.24	0.47	1.22	0.43	1.16	0.05	0.12	0.35	0.95	0.47	1.26	0.38	1.02	59.57
9	0.39	0.94	0.38	1.24	0.57	1.40	0.16	0.40	0.33	0.81	0.72	1.76	0.31	0.76	56.58
10	0.46	1.25	0.44	1.30	0.42	1.13	0.10	0.26	0.36	0.98	0.47	1.29	0.34	0.91	64.10
11	0.41	1.09	0.45	1.36	0.49	1.30	0.12	0.32	0.30	0.79	0.54	1.45	0.33	0.87	61.37

2.2.2 呈味氨基酸营养价值评价

呈味氨基酸主要包含酸味氨基酸(sour amino acids, SOAA) (2 种)、甜味氨基酸(sweet amino acids, SWAA) (5 种)和苦味氨基酸(bitter amino acids, BIAA) (8 种)^[28]。由表 5 可知, 醋鳖甲水提取物的 SOAA 含量最高为 6 号样品, 最低为 8 号样品, 含量差距为 1.29 倍; SWAA 和 BIAA 含量最高均为 1 号样品, 最低均为 9 号样品, 含量差距分别为 1.35 和 1.36 倍。SWAA 含量为 SOAA 含量的 3.1~5.4 倍, SWAA 含量为 BIAA 含量的 2.7~5.1 倍以上, 这提示鳖甲水提取物可能具备良好口感, 具有很大的开发潜力。

表 5 不同来源醋鳖甲水提取物的呈味氨基酸含量(%)
Table 5 Flavor amino acids content of aqueous extracts of *Carapax trionycis* from different sources (%)

种类	SOAA	SWAA	BIAA	SO/T	SW/T	BI/T
1	10.99	50.77	13.67	14.09	65.10	17.53
2	11.00	46.43	12.86	15.10	63.75	17.66
3	9.46	40.95	10.20	15.24	65.95	16.43
4	11.20	43.92	12.25	16.03	62.84	17.53
5	11.62	46.95	12.55	15.78	63.76	17.04
6	12.14	47.66	12.60	16.25	63.81	16.87
7	11.77	44.13	11.66	16.75	62.82	16.60
8	9.40	41.06	10.31	14.99	65.48	16.44
9	10.72	37.50	10.02	17.68	61.83	16.52
10	10.04	44.21	11.52	14.77	65.03	16.95
11	10.91	46.49	13.00	14.98	63.82	17.85

注: SO/T: SOAA/T, SW/T: SWAA/T; BI/T: BIAA/T。

2.2.3 药用氨基酸营养价值评价

从表 6 可知, 鳖甲水提取物的药用氨基酸(medicinal

amino acids, MAA)含量最高的为 1 号样品, 含量最低的为 9 号样品。MAA 是维持机体氮平衡所必需, 并具备一定临床功效^[28]。鳖甲水提取物中丰富的 MAA 可能是其具备药用价值的重要物质基础, 如血管紧张素转化酶(angiotensin I-converting enzyme, ACE)抑制活性。ACE 是人体肾素-血管紧张素(renin-angiotensin system, RAS)系统的关键酶, 抑制 ACE 活性, 能够减少血管紧张素 II 的生成, 达到降血压作用^[29]。研究人员^[29]分析氨基酸组成与 ACE 抑制活性的相互关系, 发现疏水性氨基酸(hydrophobic amino acid, HBAA)、支链氨基酸(branched chain amino acids, BCAA)和芳香族氨基酸(aromatic amino acids, AAA)的含量一般与 ACE 抑制活性呈正比。LIAO 等^[20]从鳖甲酶解物中分离鉴定了 ACE 抑制肽。HBAA、BCAA 和 AAA 的含量最高的分别为 1 号、1 号和 2 号样品, 含量最低的分别为 9 号、9 号和 9 号样品。在肝病治疗中, 富含 BCAA 并搭配低含量的 AAA 构成的制剂具有临床意义, 正常人体及其他哺乳动物的支/芳值(branched amino acids/aromatic amino acids, BC/A)为 3.0~3.5, 而当肝受伤时则降为 1.0~1.5^[28]。鳖甲水提取物的 BC/A 值最高为 6 号样品, 最低为 2 号样品, 其比值均高于肝受伤时, 这可能与具备抗肝纤维化功效密切相关。

2.3 多元统计分析

2.3.1 主成分分析

由表 7、8 可知, 前 3 个成分的对特征值均大于 1, 累计方差贡献率为 83.128%, 故选取前 3 个主成分代表 16 种氨基酸的综合信息。第 1 主成分的特征值为 6.591, 方差贡献率为 41.192%, 主要反映了 Gly、Ile、Ala、Leu、Arg、Pro、Glu、Val、Asp 和 Lys 的信息, Gly、Ala、Pro、Glu 和 Arg 均为水提取物中含量较高的氨基酸, 其中 Gly 的贡

表 6 不同来源醋鳖甲水提取物的特殊功效氨基酸含量(%)
Table 6 Specific efficient amino acids content of aqueous extract of *Carapax trionycis* from different sources (%)

种类	MAA	HBAA	BCAA	AAA	M/T	HB/T	BC/A	BC/T	AA/T
1	46.17	54.73	5.77	2.46	59.20	70.18	235	7.40	3.15
2	44.61	50.29	4.99	2.90	61.25	69.05	172	6.85	3.98
3	37.65	46.16	4.54	2.42	60.64	74.34	188	7.31	3.90
4	42.90	47.52	4.94	2.61	61.38	67.99	189	7.07	3.73
5	45.33	50.01	4.84	2.43	61.56	67.92	199	6.57	3.30
6	45.87	50.35	5.07	1.88	61.41	67.41	270	6.79	2.52
7	42.98	45.93	4.62	2.03	61.18	65.38	228	6.58	2.89
8	37.86	44.00	4.41	1.77	60.37	70.16	249	7.03	2.82
9	37.05	38.14	3.51	1.71	61.09	62.89	205	5.79	2.82
10	40.84	47.24	4.46	2.13	60.08	69.49	209	6.56	3.13
11	43.84	48.94	4.65	1.78	60.19	67.19	261	6.38	2.44

注: MAA 包括 Asp、Glu、Gly、Met、Leu、Phe、Tyr、Lys 和 Arg; HBAA 包括 Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Gly 和 Val; BCAA 包括 Ile、Leu 和 Val; AAA 包括 Phe、Tyr 和 Trp; M/T: MAA/T; HB/T: HBAA/T; BC/T: BCAA/T; BC/A: BCAA/AAA; AA/T: AAA/T。

表 7 不同来源醋鳖甲水提取物主成分特征值和贡献率

Table 7 Eigenvalues and contribution of principal components of aqueous extracts of *Carapax trionycis* from different sources

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	6.591	41.192	41.192
2	4.947	30.922	72.113
3	1.762	11.014	83.128
4	0.883	5.516	88.644
5	0.680	4.248	92.892
6	0.575	3.595	96.487
7	0.286	1.790	98.277
8	0.200	1.251	99.528
9	0.052	0.323	99.851
10	0.024	0.149	100.000

表 8 不同来源醋鳖甲水提取物主成分的因子载荷矩阵

Table 8 Factor loading matrix of principal components of aqueous extracts of *Carapax trionycis* from different sources

种类	主成分		
	1	2	3
Asp	0.649	0.653	0.099
Thr	0.414	0.893	-0.112
Ser	0.426	0.887	0
Glu	0.716	0.470	0.079
Gly	0.903	-0.378	0.070
Ala	0.822	-0.349	-0.192
Val	0.689	-0.612	-0.120
Met	-0.536	0.232	0.562
Ile	0.835	-0.305	0.126
Leu	0.818	-0.426	0.138
Tyr	0.229	0.030	0.797
Phe	0.327	-0.617	0.634
Lys	0.633	0.758	-0.075
His	-0.036	0.676	0.504
Arg	0.762	0.409	-0.172
Pro	0.736	-0.409	-0.011

献最大, 载荷量为 0.903, 其含量最高, 说明 Gly 是影响氨基酸品质的最主要因素, 是醋鳖甲水提取物的主要特征氨基酸。第 2 主成分的特征值为 4.947, 方差贡献率为 30.922%, 主要反映了 Thr、Ser、Lys、His 和 Asp 的信息, 其中 Thr 的贡献最大, 载荷量为 0.893, 不同来源的醋鳖甲水提取物中 Thr 的含量差异较大, 其对水提取物的氨基酸品质也有较大影响。第 3 主成分的特征值为 1.762, 方差贡献率为 11.014%, 主要反映了 Tyr、Phe、Met 和 His 的信息, 其中 Tyr 的贡献最大, 载荷量为 0.797。结合主成分贡献率, 构建主成分分析函数为: $F=0.49552F_1+0.37198F_2+0.13249F_3$, 据此可计算醋鳖甲各水提取物的综合评价得分,

分值越高, 说明该提取物的氨基酸品质越好(表 9)。

由表 9 可知, 醋鳖甲水提取物的综合品质从高到低的排序为 7 号>5 号>1 号>4 号>6 号>11 号>2 号>9 号>10 号>8 号>3 号。从氨基酸综合品质来看, 7 号水提取物的品质最高, 3 号水提取物的品质最低。7 号样品氨基酸总量及必需氨基酸总量均不为最高, 但其 Thr 含量最高, 而 3 号样品的 Thr 含量最低, 说明在本研究中, Thr 的含量对氨基酸综合评价得分影响较大。F 值范围是-1.38070~0.53340, 表明醋鳖甲水提取物的氨基酸综合品质差异不是特别明显, 这与刘宇文等^[24]的研究结果一致。

表 9 不同来源醋鳖甲水提取物氨基酸主成分综合得分及排名

Table 9 Comprehensive scores and rankings of amino acids principal components of aqueous extracts of *Carapax trionycis* from different sources

种类	F_1	F_2	F_3	F	排名
1	1.56882	-0.68800	-0.10360	0.50774	3
2	0.58446	-0.53650	1.23409	0.25356	7
3	-1.43730	-1.88470	0.24592	-1.38070	11
4	0.05270	0.20623	1.72146	0.33090	4
5	0.53311	0.39554	0.80483	0.51793	2
6	1.02362	0.10004	-1.62720	0.32885	5
7	0.31730	1.06838	-0.16030	0.53340	1
8	-1.00050	-0.60087	-1.25800	-0.88600	10
9	-1.55950	1.88243	0.09199	-0.06030	8
10	-0.41950	-0.43582	-0.27640	-0.40660	9
11	0.33673	0.49318	-0.67280	0.26118	6

2.3.2 聚类分析和正交偏最小二乘法分析

对表 2 中的氨基酸组成和含量数据进行聚类分析, 结果如图 1 所示。醋鳖甲水提取物可以分为两大类, 第一大类为 9 号、3 号、8 号和 10 号样品, 这一类样品的氨基酸总量偏低; 第二大类为 1 号、2 号、6 号、7 号、4 号、5 号和 11 号样品, 这一类样品的氨基酸总量普遍高于第一大类。该聚类结果与主成分分析的排名结果一致, 第一大类的排名靠后, 第二大类的排名靠前。综合氨基酸总量、必需氨基酸含量、呈味氨基酸和药用氨基酸总量, 对不同来源醋鳖甲水提取物进行聚类分析, 结果如图 2 所示。同样可以分为两大类, 与前述分类结果一致。第一大类的氨基酸、必需氨基酸、呈味氨基酸和药用氨基酸的总量相对较低。第二大类的各类氨基酸含量相对较高。聚类分析结果在一定程度上反映了醋鳖甲的差异性, 为客观分析市售醋鳖甲的品质提供了一定参考。

对表 2 中的氨基酸组成和含量数据进行正交偏最小二乘法分析, 结果如图 3 所示。鳖甲水提取物同样可以分成两组, 与聚类分析结果一致。各氨基酸的变量投影重要性(variable important for projection, VIP)结果如图 4 所示, 其中 Glu、Asp、Gly、Leu、Arg、Lys、Ala 和 Ile 的 VIP

值均大于 1, 提示这 8 个氨基酸应为主要差异氨基酸, 而在主成分分析中均属于第 1 主成分所反映的氨基酸信息, 其中 Gly、Ala、Glu 和 Arg 含量较高, 对综合品质影响较大, 考虑其为特征氨基酸。

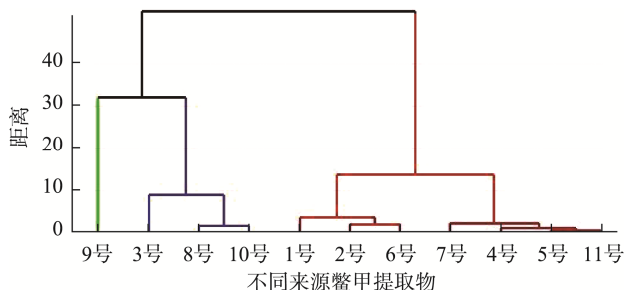


图 1 聚类分析图 1
Fig.1 Cluster analysis chart 1

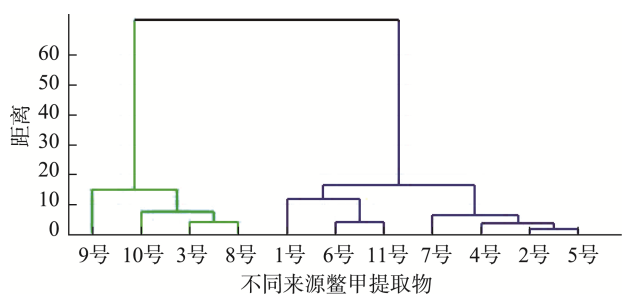


图 2 聚类分析图 2
Fig.2 Cluster analysis chart 2

不同来源醋鳖甲炮制加工时在原料选择和炮制方法上有差异, 造成市售产品品质的差异。研究人员曾对比分析不同产地醋鳖甲与抗肝纤维化作用的谱效关系, 结果表明不同产地醋鳖甲的指纹图谱和活性均有差异^[30]。本研究中醋鳖甲水提取物的氨基酸种类基本一致, 但组成含量有差异, 这与醋鳖甲的来源、炮制处理方法有关, 醋鳖甲均随机购买于南宁市, 其中 3 号与 11 号样品来自同一厂家, 8 号与 10 号样品来自同一厂家。主成分分析中 8 号与 10 号样品的综合品质接近, 聚类分析也归于一类, 而 3 号与 11 号样品的综合品质有差异, 聚类分析也归于不同类别。这提示同一厂家同一批次醋鳖甲品质的一致性, 而同一厂家不同批次醋鳖甲的品质差异较大, 可能是因为 11 号样品存放时间较久。

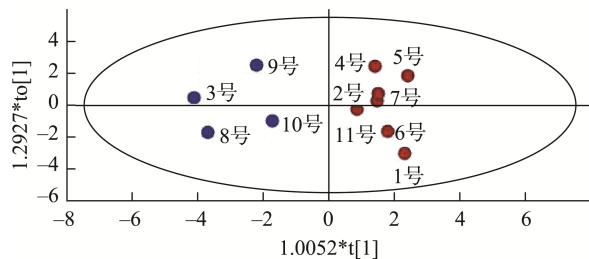


图 3 正交偏最小二乘法分析图
Fig.3 Orthogonal partial least squares analysis diagram

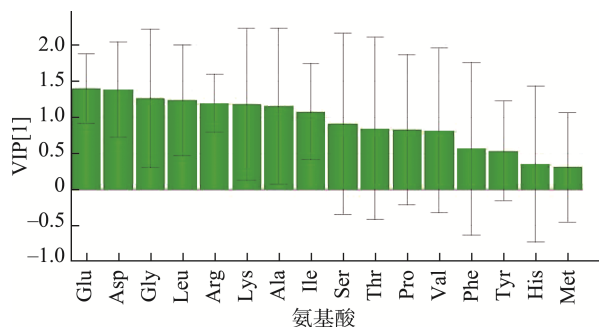


图 4 各氨基酸的 VIP 值
Fig.4 VIP values of each amino acid

3 讨论与结论

有研究对鳖甲抗肝纤维化活性组分进行高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)分析^[31], 从中获得 800 多个肽段信息, 可见鳖甲活性肽段组成的复杂性。活性肽的活性与氨基酸残基的数量、种类、排列及空间构象等直接相关。肽类成分是醋鳖甲发挥功效的主要活性成分, 而氨基酸是构成肽类成分的基本单元。生鳖甲、醋鳖甲的氨基酸组成分析已有相关研究, 但未见对其水提取物的氨基酸组成进行分析。本研究首次对市售醋鳖甲水提取物的水解氨基酸组成进行分析, 除了 Cys 和 Trp 未检出外, 醋鳖甲水提取物氨基酸种类丰富, 但其含量不符合理想蛋白质的要求, 营养价值低, 不适于作为营养物质用于蛋白质补充。对其功能氨基酸的含量进行分析, 表明其具有良好口感, 富含药用氨基酸, 因此可以考虑进行功能食品保健食品的开发研究。

本研究采用主成分分析、聚类分析和正交偏最小二乘法 3 种分析方法比较不同来源市售醋鳖甲的氨基酸组成, 三者的分析结果基本一致, 大致可将本研究中的醋鳖甲分为两大类, 一类氨基酸品质相对较高, 另一类氨基酸品质相对较低, 这为从氨基酸分析角度客观评价市售鳖甲的整体质量情况差异提供了借鉴, 可以考虑从提取物氨基酸分析的角度, 优化建立鳖甲等常用动物药的质量控制方法。

整体而言, 本研究中市售醋鳖甲水提取物的营养价值、口感、主要功效氨基酸、氨基酸综合品质等的差异不是特别大, 在一定程度上也证明市售醋鳖甲的质量整体均衡, 这可能是因为鳖的大量养殖, 因而保证了来源充足。

本研究表明, Gly、Ala、Glu 和 Arg 为醋鳖甲的主要特征氨基酸, 对醋鳖甲的氨基酸综合品质影响较大, 且含量较高, 可考虑将其作为醋鳖甲的特征性氨基酸, 用于更加客观高效地评价不同来源市售醋鳖甲的质量差异, 提升醋鳖甲的质量控制标准。

参考文献

- [1] 刘钟, 孙海鑫, 闫保国, 等. 鳖的加工和综合利用技术研究进展[J]. 河北渔业, 2021, 336(12): 39–46.
LIU Z, SUN HX, YAN BG, *et al.* Research progress of processing and comprehensive utilization technology of turtle [J]. Hebei Fish Ind, 2021, 336(12): 39–46.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
Editorial Committee of *Chinese Materia Medica*, State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese materia medica [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1999.
- [3] 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, 2020.
National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Part I [M]. Beijing: Chinese Medical Science Press, 2020.
- [4] 袁强, 何岚, 陈芝芸, 等. 复方鳖甲软肝片对肝纤维化大鼠肝脏血管紧张素 II 及其受体 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(2): 158–161.
YUAN Q, HE L, CHEN ZY, *et al.* Effects of compound Biejia Ruangan tablets on the expression of liver angiotensin II and its receptor in rats with hepatic fibrosis [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2008, 23(2): 158–161.
- [5] RONG GH, CHEN YP, YU ZJ, *et al.* Synergistic effect of Biejia-Ruangan on fibrosis regression in patients with chronic hepatitis B treated with entecavir: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. J Infect Dis, 2022, 225(6): 1091–1099.
- [6] XU YH, XUE C. Compound Biejia-Ruangan tablet as an adjunctive therapy to entecavir for chronic hepatitis B complicated with hepatic fibrosis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Medicine (Baltimore), 2022, 101(32): e30020.
- [7] CHENG X, LI BP, HAN ZX, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of the major components in Qinghao Biejia decoction by UPLC-orbitrap fusion-MS/MS and UPLC-QQQ-MS/MS and evaluation of their antibacterial activities [J]. Phytochem Anal, 2022, 33(5): 809–825.
- [8] DAI H, MA B, DAI X, *et al.* Shengma Biejia decoction inhibits cell growth in multiple myeloma by inducing autophagy-mediated apoptosis through the ERK/mTOR pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 585286.
- [9] KOU H, HU J, WANG AL, *et al.* Effects of dietary protein on water quality, growth performance, RNA/DNA ratio and haemato-immunological indices of soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2022, 123: 127–135.
- [10] LI C, SONG W, WU J, *et al.* Thermal stable characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from the carapace tissue of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. Tissue Cell, 2020, 67: 101424.
- [11] QIU LY, DENG ZY, ZHAO CD, *et al.* Nutritional composition and proteomic analysis of soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) egg and identification of oligopeptides with alpha-glucosidase inhibitory activity [J]. Food Res Int, 2021, 145: 1110414.
- [12] 卢梦楠, 李兰芳, 景玉蕾, 等. 鳖甲胶原蛋白酶解物的分离纯化及体外抗氧化性研究[J]. 核农学报, 2020, 34(5): 1047–1053.
LU MN, LI LF, JING YL, *et al.* Isolation, purification and antioxidant of collagen enzymatic hydrolysate from the carapace of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. J Nucl Agric Sci, 2020, 34(5): 1047–1053.
- [13] 熊莎. 鳖甲抗肝纤维化活性肽的分离鉴定及其作用机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
XIONG S. Studies on the isolation and identification of active peptides of *Carapax trionycis* and its anti hepatic fibrosis active mechanism [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2018.
- [14] 陈进文. 鳖甲抗肝纤维化活性物质及其指纹图谱研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2009.
CHEN JW. Study on the active anti-hepatic fibrosis principles and fingerprints of *Carapax trionycis* [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2009.
- [15] TANG YP, HU CL, LIU YW. Effect of bioactive peptide of *Carapax trionycis* on TGF- β_1 -induced intracellular events in hepatic stellate cells [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148: 69–73.
- [16] 邢延一. 鳖甲中寡肽类化学成分及炮制原理的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2006.
XING YY. Studies on the oligopeptides and processing principle of *Carapax trionycis* [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2006.
- [17] 李燕燕. 基于 CAM 模型醋鳖甲中寡肽类活性成分研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.
LI YY. Studies on the active oligopeptides of *Carapax trionycis* based on CAM model [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2008.
- [18] WANG PL, ZHANG YZ, AN YW, *et al.* Protection of a new heptapeptide from *Carapax trionycis* against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. Chem Pharm Bull, 2013, 61(11): 1130–1135.
- [19] HU CL, PENG XZ, TANG YP, *et al.* Purification, characterization, *in vitro* anti-hepatic fibrosis activity of bioactive peptides derived from *Carapax trionycis* hydrolysates [J]. J Chin Pharm Sci, 2017, 26(8): 605–610.
- [20] LIAO PY, LAN XD, LIAO DK, *et al.* Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from the enzymatic hydrolysate of *Carapax trionycis* (the shell of the turtle *Pelodiscus sinensis*) [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(27): 7015–7022.
- [21] 唐尹萍, 陈进文, 刘焱文, 等. 鳖甲与醋鳖甲抗肝纤维化活性部位的化学成分比较[J]. 医药导报, 2010, 29(9): 1127–1129.
TANG YP, CHEN JW, LIU YW, *et al.* Comparison of anti-hepatic fibrosis principle between fresh slices and vinegar processed slices of *Carapax trionycis* [J]. Herald Med, 2010, 29(9): 1127–1129.
- [22] WANG SS, CHEN GJ, CHEN KW, *et al.* Bioavailability and prebiotic potential of *Carapax trionycis*, a waste from soft-shelled turtle processing [J]. J Sci Food Agric, 2020, 100(6): 2554–2567.
- [23] 廖彭莹, 周利琴, 廖丹葵, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定中药鳖

- 甲生、制品中氨基酸的含量[J]. 中药材, 2016, 39(4): 802–805.
- LIAO PY, ZHOU LQ, LIAO DK, *et al.* Determination of the amino acids in the raw and processed products of turtle shell by HPLC combining pre-column derivatization [J]. *J Chin Med Mater*, 2016, 39(4): 802–805.
- [24] 刘宇文, 伍勋, 湛宇, 等. SPE-UPLC-MS/MS 法鉴别含龟鳖甲的中成药[J]. 中成药, 2022, 44(2): 660–663.
- LIU YW, WU X, CHEN Y, *et al.* Identification of Chinese patent medicines containing turtle shell by SPE-UPLC-MS/MS [J]. *Res Pract Chin Med*, 2022, 44(2): 660–663.
- [25] 徐士勋, 邢延一, 林锦旋, 等. 醋炙鳖甲总氨基酸提取工艺优选[J]. 中医药学报, 2014, 42(2): 67–70.
- XU SX, XING YY, LIN JX, *et al.* Optimizing the extracting technology of total amino acids in the *Carapax trionycis* processed with vinegar [J]. *Acta Chin Med Pharm*, 2014, 42(2): 67–70.
- [26] 刘芳, 任启飞, 李占彬, 等. 贵州玫瑰花茶的氨基酸组成及其品质综合评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(14): 4706–4714.
- LIU F, REN QF, LI ZB, *et al.* Amino acid composition and comprehensive quality evaluation of Guizhou rose tea [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(14): 4706–4714.
- [27] 杨旭昆, 汪禄祥, 叶艳萍, 等. 7 种云南产核桃中 17 种氨基酸含量测定与必需氨基酸模式分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(6): 1889–1894.
- YANG XK, WANG LX, YE YP, *et al.* Quantitative determination of 17 kinds of amino acids and pattern analysis of essential amino acids in 7 local walnut varieties in Yunnan Province [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(6): 1889–1894.
- [28] 颜孙安, 林香信, 李巍, 等. 闽产食用菌的氨基酸组成特征及其营养评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(19): 7723–7731.
- YAN SAN, LIN XX, LI W, *et al.* Amino acid composition characteristics and nutritional evaluation of edible fungi produced in Fujian [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(19): 7723–7731.
- [29] ZHENG SL, LUO QB, SUO SK, *et al.* Preparation, identification, molecular docking study and protective function on HUVECs of novel ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of *Skipjack tuna* muscle [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(176): 1–21.
- [30] 肖云芝, 于超, 刘朝勇, 等. 鳖甲药材指纹图谱与其抗肝纤维化作用的谱效关系研究[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2506–2510.
- XIAO YZ, YU C, LIU CY, *et al.* Spectrum-activity relationship on anti-hepatic fibrosis efficacy of *Trionycis carapax* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2014, 45(17): 2506–2510.
- [31] 李厚刚. 鳖甲抗肝纤维化的物质基础研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- LI HG. Research of the therapeutic material basis of *Carapax trionycis* on anti-hepatic fibrosis [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2020.

(责任编辑: 于梦娇 黄周梅)

作者简介

廖彭莹, 博士, 教授, 主要研究方向为药食同源动植物中活性成分的研究开发。
E-mail: gxlpy@163.com