

[文章编号] 1007-7405(2016)04-0255-06

# 利用陶瓷膜和超滤膜组合技术分离纯化天然牛磺酸

章 骞<sup>1</sup>, 崔 璨<sup>2</sup>, 邱 娟<sup>2</sup>, 雷桂英<sup>2</sup>, 张凌晶<sup>1,2</sup>, 曹敏杰<sup>1,2</sup>

(1. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021;

2. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 运用陶瓷膜和超滤膜组合技术对杂色蛤(*Ruditapes philippinarum*) 蒸煮汤汁中的牛磺酸进行分离纯化, 再经浓缩、醇沉、结晶、重结晶等步骤获得高纯度天然牛磺酸。利用高效液相色谱法测定牛磺酸纯度, 并对其进行扫描电镜分析和急性毒性试验。结果显示, 截留孔径为 0.2  $\mu\text{m}$  的陶瓷膜在平均压力 0.24 MPa、平均温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、自然 pH 值下运行 120 min 后, 平均膜通量为 32.86  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ , 牛磺酸损失率为 4.99%; 截留分子质量为 100 ku 的超滤膜在平均压力 0.84 MPa、平均温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、自然 pH 值下运行 210 min 后, 平均膜通量为 19.97  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ , 牛磺酸损失率为 5.51%。再经浓缩、醇沉、结晶处理后, 可从 10 L 杂色蛤蒸煮汤汁中获得纯度为 84% 的天然牛磺酸 18.87 g, 重结晶后得纯度为 98.7% 的天然牛磺酸。扫描电子显微镜观测结果显示, 天然牛磺酸晶体形态为长针状。急性毒性试验结果显示, 天然牛磺酸的  $\text{LD}_{50} > 10 \text{ g/kg}$ , 属于实际无毒或无毒物质。

**[关键词]** 牛磺酸; 膜分离; 纯化; 扫描电镜; 急性毒性

**[中图分类号]** TQ 028.8

## Separation and Purification of Natural Taurine Using Ceramic and Ultrafiltration Membrane Technology

ZHANG Qian<sup>1</sup>, CUI Can<sup>2</sup>, QIU Juan<sup>2</sup>, LEI Gui-ying<sup>2</sup>, ZHANG Ling-jing<sup>1,2</sup>, CAO Min-jie<sup>1,2</sup>

(1. National and Local Joint Engineering Research Center of Deep Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China; 2. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** High purity of natural taurine was isolated from cooking soup of *Ruditapes philippinarum* by combination of ceramic and ultrafiltration membranes, concentration, ethanol precipitation, crystallization and recrystallization. High performance liquid chromatography was used to determine the purity of taurine. Scanning electron microscopy and acute toxicity test were also performed in this study. The results showed that the membrane flux was 32.86  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$  and the loss ratio of taurine was 4.99% using 0.2  $\mu\text{m}$  ceramic membrane under the condition of 0.24 MPa, 30  $^{\circ}\text{C}$ , pH 7.0 for running 120 min. The ultrafiltration was performed using a 100 ku cut-off membrane with running 210 min for a cycle at 0.84 MPa, 30  $^{\circ}\text{C}$ , pH 7.0. The membrane flux and the loss ratio of taurine were 19.97  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$  and 5.51%, respectively. Natural taurine 18.87 g with 84% purity was finally obtained from 10 L cooking soup of *R. philippinarum* by the subsequent step of concentration, ethanol precipitation and crystallization. The purity of taurine could be im-

**[收稿日期]** 2015-11-28

**[修回日期]** 2016-03-03

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(31471640); 国家海洋局海洋公益性项目(201305015); 福建省海洋高新技术产业发展专项项目([2013] 22号)

**[作者简介]** 章骞(1991—), 男, 助理实验师, 硕士, 主要从事水产品深加工技术研究。通信作者: 曹敏杰(1964—), 男, 教授, 博士, 主要从事蛋白质化学及水产品深加工研究, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn。

proved to 98.7% after recrystallization. The crystal shape of natural taurine was acicular as observed by scanning electron microscopy. Acute toxicity test in vivo revealed that the  $LD_{50}$  value of taurine was higher than 10 g/kg, indicating its non-mammalian toxicity.

**Keywords:** taurine; membrane separation; purification; scanning electron microscopy; acute toxicity

## 0 引言

牛磺酸是一种含硫的非蛋白质氨基酸,最早是从牛胆汁中分离而得,在体内以游离状态存在,不参与体内蛋白质的生物合成,是一种主要依靠食物供给的条件必需氨基酸<sup>[1]</sup>。由于其对机体具有调节肾脏功能<sup>[2]</sup>、抗氧化<sup>[3]</sup>、促进大脑发育<sup>[4]</sup>及增强视力<sup>[5]</sup>等功效,因此,被广泛应用于医药、功能性食品、饲料等各个行业。目前,牛磺酸的制备以化学合成法、发酵法、生物提取法为主<sup>[6]</sup>。生物提取法因是从动物(主要是水产动物)中提取的天然牛磺酸,安全性更有保障,发展前景良好<sup>[7]</sup>。但是,现行的天然牛磺酸提取工艺一般需要通过离子交换树脂对其进行分离纯化,工艺较为复杂<sup>[8]</sup>。龚丽芬等<sup>[6]</sup>通过调整溶液的 pH 值去除酸性蛋白质和碱性蛋白质,再采用离子交换树脂纯化牛磺酸,从文蛤中获得高纯度的牛磺酸。Wang 等<sup>[9]</sup>和张凌晶等<sup>[10]</sup>利用膜分离法结合离子交换树脂对牛磺酸进行了分离纯化。但采用离子交换技术,设备投资大,操作复杂,成本高,而且树脂再生会产生大量的酸碱,生产过程中容易导致环境污染。因此,本文在现有技术的基础上进行改进,提出了不需要离子交换树脂即可实现天然牛磺酸制备的方法,旨在为天然牛磺酸产业化生产提供一套切实可行的生产工艺。此外,还对天然牛磺酸进行扫描电镜分析和急性毒性试验,以观察天然牛磺酸的晶体形态,并获得天然牛磺酸的安全性评价结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

杂色蛤蒸煮汤汁来自福建省某水产加工企业;牛磺酸标准品(Sigma,美国,纯度 $\geq 98.5\%$ ); Milli-Q 超纯水(Millipore,美国); HPLC 级甲醇(Fisher Scientific,美国);邻苯二甲醛(化学纯试剂,国药集团化学试剂有限公司);硼酸、氢氧化钠、2-巯基乙醇、三水合乙酸钠、冰乙酸、无水乙醇(分析纯试剂,国药集团化学试剂有限公司);SPF 级昆明种小鼠(上海斯莱克实验动物有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

SPPM-C-10 型陶瓷膜设备(Suntar,中国);SPPM-18S-1 型卷式超滤膜设备(Suntar,中国);高效液相色谱仪(Agilent Technologies,美国);色谱柱 Discovery C18 (Supelco,美国);TM3030 台式扫描电镜(日立,日本);恒温水浴锅(Memmert,德国);旋转蒸发仪(上海泉杰仪器有限公司);电子天平(上海精科天平);pH 计(Sartorius,德国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 高效液相色谱仪的色谱条件

色谱柱:Discovery C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ L);流动相:甲醇-0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液( $V$ (甲醇): $V$ (乙酸钠缓冲液)=50:50,pH=5.3);流速 1 mL/min;进样量 20  $\mu$ L;抽取速度 200  $\mu$ L/min,排出速度 200  $\mu$ L/min;检测波长 330 nm;柱温为室温;停止时间 10 min;后运行时间 2 min。

#### 1.3.2 牛磺酸标准曲线的绘制

参照文献[7],取牛磺酸标准品,将其配制成 50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>的标准溶液,并稀释至 2、5、10、20、50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>的牛磺酸标准溶液,经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后置于自动进样瓶,经 OPA 柱前衍生反应后注入 Agilent 1260 高效液相色谱仪测定。以牛磺酸标准浓度为横坐标( $X$ ),峰面积为纵坐标( $Y$ ),绘制标准曲线。

#### 1.3.3 牛磺酸分离纯化工艺流程

牛磺酸的制备工艺如下:杂色蛤蒸煮汤汁 $\rightarrow$ 陶瓷膜 $\rightarrow$ 超滤膜 $\rightarrow$ 浓缩 $\rightarrow$ 醇沉 $\rightarrow$ 结晶 $\rightarrow$ 牛磺酸。

1.3.4 陶瓷膜和超滤膜组合技术

1.3.4.1 膜分离参数 膜通量  $M$  是在恒温恒压下单位膜面积、单位时间膜透过液的流量,用于体现膜过滤物料的速度,计算公式为:  $M = Q/(St)$ 。式中:  $M$ —膜通量 ( $L/(m^2 \cdot h)$ );  $Q$ —透过液体积 ( $L$ );  $S$ —膜面积 ( $m^2$ );  $t$ —时间 ( $h$ )。

1.3.4.2 陶瓷膜微滤 将 10 L 杂色蛤蒸煮汤汁泵入截留孔径为 0.2  $\mu m$  的陶瓷膜过滤设备(有效膜面积 0.30  $m^2$ )中微滤,定时记录操作压力、流速、物料温度,全程冷凝水处理,平均温度保持在 30  $^{\circ}C$  左右。待罐内汤汁呈浆状时用适当水顶洗,收集陶瓷膜滤过液,精确测量体积,并用高效液相色谱仪检测其中的牛磺酸质量浓度,计算牛磺酸损失率。

1.3.4.3 超滤膜超滤 将 1.3.4.2 陶瓷膜滤过液泵入截留分子质量为 100 ku 的卷式超滤膜设备(有效膜面积 0.24  $m^2$ )中超滤,定时记录操作压力、流速、物料温度,全程冷凝水处理,平均温度保持在 30  $^{\circ}C$  左右,待浓缩液呈现浆状时用适量的水顶洗,收集超滤膜滤过液,精确测量体积,并用高效液相色谱仪检测其中的牛磺酸质量浓度,计算牛磺酸损失率。

1.3.4.4 牛磺酸损失率计算 取一定体积的待测液,稀释 100 倍后,利用 HPLC 法<sup>[7]</sup>测定待测液中牛磺酸的峰面积,并将峰面积值代入标准曲线的线性回归方程,计算得到待测液中牛磺酸质量浓度  $X(mg \cdot L^{-1})$ 。按公式  $T = AX/10000$  计算牛磺酸质量,式中:  $T$ —牛磺酸的质量 ( $g$ );  $X$ —由标准曲线计算得到的牛磺酸质量浓度 ( $mg \cdot L^{-1}$ );  $A$ —滤过液体积 ( $mL$ )。

再通过公式  $R = [(T_1 - T_2)/T_1] \times 100\%$  继续计算牛磺酸的损失率,式中:  $R$ —牛磺酸的损失率 (%);  $T_1$ —上一步骤中牛磺酸总质量 ( $g$ );  $T_2$ —此步骤中牛磺酸的质量 ( $g$ )。

1.3.5 牛磺酸的制备

利用旋转蒸发仪将收集得到的超滤膜滤过液浓缩至原体积的 1/40 ~ 1/30,将浓缩液与等体积的无水乙醇混合,快速抽滤,滤液置于 0 ~ 4  $^{\circ}C$  低温环境下,缓慢搅拌 12 h 以上,牛磺酸晶体析出,过滤得到牛磺酸粗品。往牛磺酸粗品中加入 70 ~ 80  $^{\circ}C$  热水,溶解后加入活性炭搅拌,抽滤除去活性炭,往得到的滤液中加入 3 倍体积无水乙醇后置于 4  $^{\circ}C$  静置结晶 24 h 以上,经抽滤后将固形物烘干即得牛磺酸粗晶体,重结晶后可得高纯度牛磺酸。

1.3.6 牛磺酸的纯度测定

参照文献 [7],将获得的牛磺酸样品溶解于一定体积的超纯水中,配制成质量浓度为 40  $mg \cdot L^{-1}$  的溶液,经 0.22  $\mu m$  滤膜处理后置于样品瓶中,经 OPA 柱前衍生后注入 Agilent 1260 高效液相色谱仪进行测定。记录峰面积,根据制得的标准曲线,采用峰面积归一化方法计算牛磺酸样品的纯度。

1.3.7 牛磺酸晶体的扫描电子显微镜分析

参见文献 [11],称取适量的高纯度天然牛磺酸晶体和牛磺酸标准品,经干燥后分别用导电胶粘在样品台上,喷金后观察并照相记录。

1.3.8 牛磺酸急性毒性试验

根据急性毒性试验国家标准<sup>[12]</sup>,对获得的高纯度天然牛磺酸进行急性毒性试验。健康昆明种小鼠(共 10 只)经口 24 h 内多次给予天然牛磺酸后,在短时间内观察动物所产生的毒性反应,并计算  $LD_{50}$  值。该实验委托厦门出入境检验检疫局完成。

2 结果

2.1 牛磺酸标准曲线

牛磺酸标准曲线如图 1 所示。由图 1 可知,牛磺酸质量浓度在 0 ~ 50  $mg \cdot L^{-1}$  的范围内,浓度与其峰面积呈良好的线性关系,且在此范围内的线性回归方程为:  $Y = 132.25 X + 21.929, R^2 = 0.9999$ 。

2.2 陶瓷膜和超滤膜组合技术

2.2.1 陶瓷膜微滤

图 2 为陶瓷膜膜通量和操作压力随时间变化趋势图，由图 2 可知，膜通量随着时间的延长呈现逐渐下降的趋势，而操作压力基本维持在 0.1 ~ 0.3 MPa。在 0 ~ 30 min，膜通量的下降幅度最大，原因是：在超滤膜微滤初期，膜表面逐渐有大分子物质出现，在膜表面形成凝胶层，使得膜表面污染程度加剧。在 60 ~ 210 min，陶瓷膜膜通量的下降幅度较为平缓，趋于稳定，在此阶段膜表面凝胶层厚度相对稳定，料液通透阻力增长趋势减缓<sup>[13]</sup>。80 min 时，因为管道内料液量过少且粘稠，操作压力低至 0.15 MPa，此时需加适量水进行顶洗，压力立即恢复至 0.2 MPa。加适量水顶洗也便于牛磺酸的充分滤出，减少损失率。总之，截留孔径为 0.2 μm 的陶瓷膜在平均压力 0.24 MPa、平均温度 30 ℃、自然 pH 值下运行 120 min，平均膜通量为 32.86 L/(m<sup>2</sup>·h)。

2.2.2 超滤膜超滤

图 3 为超滤膜膜通量和操作压力随时间变化趋势图，由图 3 可知，超滤膜膜通量随着时间的延长总体呈现不断下降的趋势，在 0 ~ 30 min，超滤膜的膜通量从 62.5 L/(m<sup>2</sup>·h) 降至 25 L/(m<sup>2</sup>·h)，原因是：料液中的大分子蛋白质及多糖在膜表面形成滤饼层，进一步截留了大分子杂质<sup>[14]</sup>。在 60 ~ 210 min，膜通量的变化程度不大，基本维持在 10 ~ 20 L/(m<sup>2</sup>·h)。150 min 时操作压力出现最低值 0.5 MPa，此时加水进行顶洗，压力明显增加但膜通量继续下降。因此，用截留分子质量为 100 ku 的超滤膜在平均压力 0.84 MPa、平均温度 30 ℃、自然 pH 值下运行 210 min，平均膜通量为 19.97 L/(m<sup>2</sup>·h)。

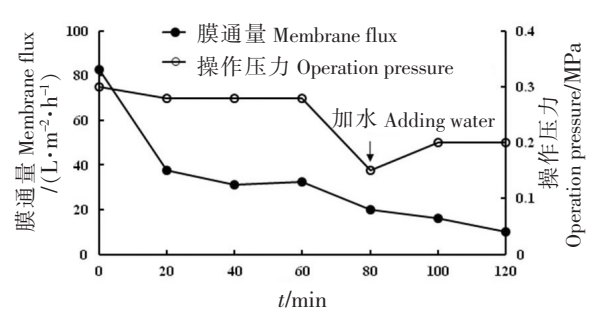


图 2 陶瓷膜膜通量和操作压力随时间变化趋势图  
Fig.2 The trends of the membrane flux and operation pressure varying with operation time of ceramic membrane

2.2.3 牛磺酸损失率计算

表 1 为陶瓷膜和超滤膜组合技术中牛磺酸的损失率。10 L 杂色蛤蒸煮汤汁中牛磺酸初始质量为 36.88 g，经陶瓷膜微滤后剩余 35.04 g，损失率为 4.99%，经超滤膜超滤后剩余 33.11 g，损失率为

表 1 牛磺酸的损失率

Tab.1 Loss ratio of taurine

项目 Item	牛磺酸质量 Quality of taurine/g	牛磺酸损失率 Loss ratio of taurine/%
杂色蛤蒸煮汤汁 Cooking soup of <i>Ruditapes philippinarum</i>	36.88	0
陶瓷膜滤过液 Filtration liquid of ceramic membrane	35.04	4.99
超滤膜滤过液 Filtration liquid of ultrafiltration membrane	33.11	5.51
总计 Total	—	10.22

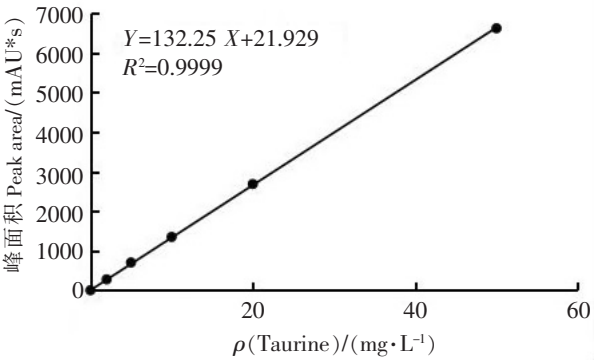


图 1 牛磺酸标准曲线  
Fig.1 Standard curve of taurine

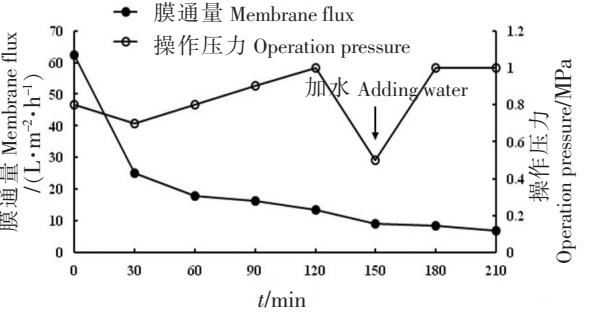


图 3 超滤膜膜通量和操作压力随时间变化趋势图  
Fig.3 The trends of the membrane flux and operation pressure vary with operation time of ultrafiltration membrane



5.51%, 合计损失 10.22%。由此可见, 采用陶瓷膜和超滤膜组合技术, 牛磺酸损失率较低, 适合于大规模的牛磺酸生产。

2.3 牛磺酸的制备与纯度测定

用 10 L 杂色蛤蒸煮汤汁, 经陶瓷膜和超滤膜组合技术进行分离纯化, 再经浓缩、醇沉、结晶处理后得到纯度为 84% 的天然牛磺酸 18.87 g, 进一步重结晶后可得纯度为 98.7% 的天然牛磺酸。图 4a 为牛磺酸标准品的色谱图, 保留时间为 6.174 min; 图 4b 为杂色蛤蒸煮汤汁中提取的纯度为 98.7% 的天然牛磺酸色谱图, 保留时间为 6.091 min, 与标准品出峰时间基本一致。

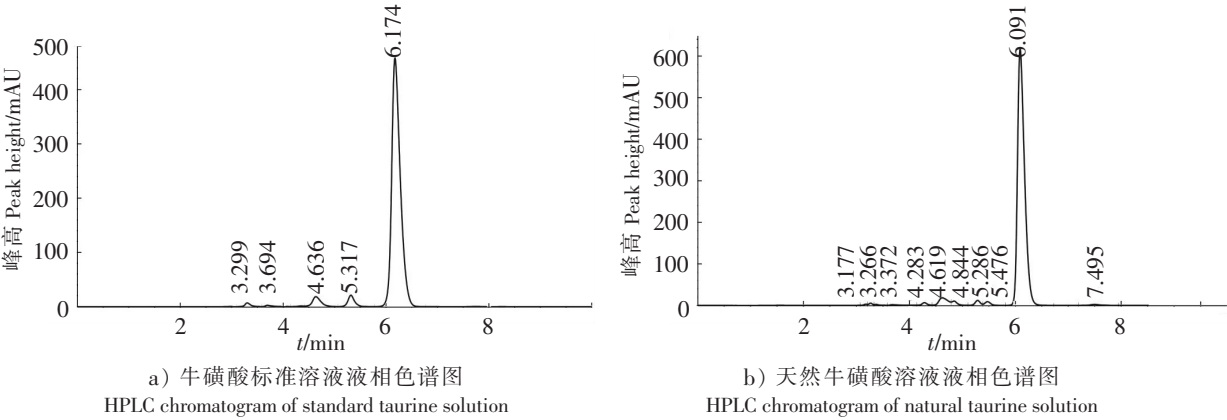


图 4 牛磺酸溶液液相色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of taurine solution

2.4 牛磺酸晶体的扫描电子显微镜分析

对牛磺酸标准品和获得的高纯度天然牛磺酸样品分别进行扫描电镜观察分析, 图 5 中的 a 图、b 图分别表示放大倍数为 200 倍的天然牛磺酸样品和牛磺酸标准品的扫描电镜图。从图 5a 可以看出, 天然牛磺酸晶体粒度较小, 形态呈长针状; 从图 5b 中观察到牛磺酸标准品晶体粒度较大, 形态呈现柱状。牛磺酸标准品晶体形态呈现柱状的原因可能是结晶方式的不同而改变了晶体的形态, 使得标准品晶体粒度大, 不易断裂, 不易结块, 流动性好, 易于过滤和干燥<sup>[15]</sup>。

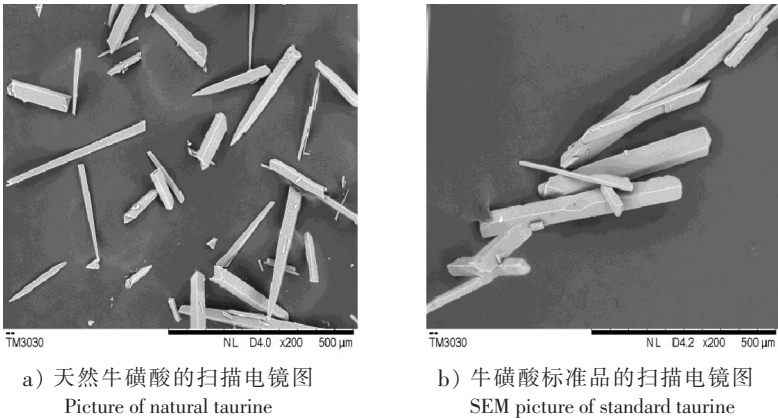


图 5 牛磺酸的扫描电镜图(×200)

Fig.5 SEM pictures of taurine(×200)

2.5 牛磺酸急性毒性试验

根据 GB 15193.3—2003 方法<sup>[12]</sup>对获得的高纯度牛磺酸进行急性毒性试验, 结果显示, 牛磺酸的 LD<sub>50</sub> > 10 g/kg, 表明牛磺酸属于实际无毒或无毒物质。因此, 从杂色蛤蒸煮汤汁中获得的牛磺酸, 其安全性具有一定的保障。

3 讨论

目前, 国内大多采用离子交换法制备天然牛磺酸, 其工艺流程大致为: 预处理→水萃取→除蛋白质(调酸碱、添加沉降剂、膜分离等措施)→离子交换分离→浓缩→结晶→重结晶。如: 张凌晶等<sup>[10]</sup>公开了一种将水产品下脚料通过超滤膜除杂、强酸性离子交换、反渗透浓缩、脱色、结晶等步骤获得高纯

度天然牛磺酸的制备方法;廖妙飞等<sup>[16]</sup>公开了一种通过匀浆、超声波破碎、提取、磺基水杨酸和超滤膜二次分离、强酸性离子交换纯化、浓缩、结晶干燥等步骤从贻贝中提取牛磺酸的方法。采用离子交换法除杂,操作复杂,设备昂贵,且离子交换树脂再生需要大量的酸和碱,对环境的污染大。

本研究采用陶瓷膜和超滤膜组合技术对杂色蛤蒸煮汤汁中的牛磺酸进行分离纯化,膜处理工序总损失率为10.22%,说明该技术适合于大规模的牛磺酸生产。膜处理工序后再经浓缩、醇沉、结晶、重结晶等步骤可从10 L杂色蛤蒸煮汤汁中获得纯度为84%的天然牛磺酸18.87 g,重结晶后纯度可达98.7%。本研究的牛磺酸制备方法与传统采用离子交换法制备牛磺酸方法相比,省去离子交换树脂除杂的步骤,工艺更简单,成本更低,对环境污染小,更具产业化前景。

本研究还对纯化的牛磺酸进行扫描电镜分析和急性毒性评价。扫描电子显微镜观测结果显示,天然牛磺酸晶体粒度较小,形态呈现长针状;牛磺酸标准品晶体粒度较大,形态呈柱状,两者晶体形态不一样可能是结晶方式不同导致的。天然牛磺酸 $LD_{50} > 10$  g/kg,属于实际无毒或无毒物质,说明从杂色蛤蒸煮汤汁中获得的牛磺酸,其安全性具有保障。

## [参考文献]

- [1] SINHA M, MANNA P, SIL P C. Taurine, a conditionally essential amino acid, ameliorates arsenic-induced cytotoxicity in murine hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 2007, 21(8): 1419-1428. DOI:10.1016/j.tiv.2007.05.010.
- [2] LATCHOUMYCANDE C, NAGY L E, MCINTYRE T M. Chronic ethanol ingestion induces oxidative kidney injury through taurine-inhibitable inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 69(7): 403-416. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.001.
- [3] SOCHOR J, NEJDL L, RUTTKAY-NEDECKY B, et al. Investigating the influence of taurine on thiol antioxidant status in Wistar rats with a multi-analytical approach. *Journal of Applied Biomedicine*, 2014, 12(2): 97-110. DOI:10.1016/j.jab.2013.01.002.
- [4] GU Y, ZHAO Y, QIAN K, et al. Taurine attenuates hippocampal and corpus callosum damage, and enhances neurological recovery after closed head injury in rats. *Neuroscience*, 2015, 291: 331-340. DOI:10.1016/j.neuroscience.2014.09.073.
- [5] RASMUSSEN A D, TRUCHOT N, PICKERSGILL N, et al. The effects of taurine on vigabatrin, high light intensity and mydriasis induced retinal toxicity in the pigmented rat. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2015, 67: 13-20. DOI:10.1016/j.etp.2014.09.004.
- [6] 龚丽芬,陈碧娥,郑志福.从文蛤提取牛磺酸的工艺. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2003, 24(3): 300-304.
- [7] 章骞,郑福来,翁凌,等.鲍鱼内脏中天然牛磺酸的提取与检测. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(1): 70-76.
- [8] 陈秋虹,莫建光,黄艳,等.天然牛磺酸的提取与应用. *氨基酸和生物资源*, 2011, 33(2): 43-45.
- [9] WANG F, GUO X Y, ZHANG D N, et al. Ultrasound-assisted extraction and purification of taurine from the red algae *Porphyra yezoensis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2015, 24: 36-42. DOI:10.1016/j.ultsonch.2014.12.009.
- [10] 张凌晶,翁凌,曹敏杰,等.膜分离法纯化天然牛磺酸的研究. *集美大学学报(自然科学版)*, 2009, 14(2): 141-144.
- [11] WANG X M, WU S G, DONG W B, et al. In situ monitoring of the solvent-mediated transformation of cefadroxil DMF solvate into monohydrate. *Organic Process Research and Development*, 2013, 17(9): 1110-1116. DOI:10.1021/op400165c.
- [12] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会.急性毒性试验:GB 15193.3—2003.北京:中国标准出版社,2003:19-22.
- [13] 王芸芸,刘利军.超滤膜技术用于甘草总黄酮的分离纯化. *化学研究与应用*, 2012, 24(4): 646-649.
- [14] 李诚.超滤膜集成工艺处理滦河水的中试研究.西安:西安建筑科技大学,2013:14.
- [15] 陈巍,方静,侯宝红,等.采用有机羧酸或有机羧酸盐添加剂改变牛磺酸晶体形态的方法:201410105165.5. 2014-03-20.
- [16] 廖妙飞,付万冬,郑斌,等.一种从贻贝中提取牛磺酸的方法:201210199181.6. 2012-06-18.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)