

# 超高压法提取牡蛎中牛磺酸的工艺研究

徐成, 卢虹玉\*, 章超桦, 金飞

(广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室,  
广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 国家贝类加工技术研发分中心(湛江),  
南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广东湛江 524088)

**摘要:** 本文对超高压技术提取牡蛎中牛磺酸的工艺技术进行了研究, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定牛磺酸的提取量, 并与传统的热热水抽提法进行比较。单因素实验结果表明: 压力、保压时间、温度以及料液比均对牛磺酸的提取量有较大影响。在此基础上通过正交实验得到最佳提取工艺条件为: 压力 300 MPa、保压时间 25 min、温度 45 °C、料液比为 1:5, 最高提取量 22.96 mg/g, 高于热水抽提法的牛磺酸提取量(17.07 mg/g)。本研究为发展高新技术应用于牡蛎中牛磺酸的提取提供理论依据。

**关键词:** 牡蛎, 牛磺酸, 超高压, HPLC

## Process research of taurine extraction from oyster (*Crassostrea hongkongensis*) by high hydrostatic pressure

XU Cheng, LU Hong-yu\*, ZHANG Chao-hua, JIN Fei

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Province Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang), South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** In this study, High Hydrostatic Pressure (HHP) was used to extract taurine from oyster, then the taurine content were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), and the results of HHP and Hot Water Extraction (HWE) were compared. Results of the single factor experiments showed that pressure, pressure-holding time, temperature and solid-liquid ratio had significant influence on the extraction of taurine. Orthogonal test based on the results of the single factor experiments showed that the optimum conditions were pressure of 300 MPa, pressure-holding time of 25 min, temperature of 45 °C, Solid-liquid ratio of 1:5; and the content of taurine was 22.96 mg/g under the optimum conditions which was higher than the HWE extraction (17.07 mg/g).

**Key words:** oyster; taurine; high hydrostatic pressure; HPLC

中图分类号: TS254.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2016)19-0192-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.19.029

超高压技术作为一种新型的非热加工技术, 已经逐渐应用于食品领域。超高压技术的主要优点不仅是其能够在低温条件下操作, 减少食品中热敏成分的损失, 而且还能在达到良好的灭菌等效果的同时保持食品的性状和风味。目前, 超高压技术除了广泛的用于食品的灭菌和蛋白质或酶变性等方面, 其提取活性成分的能力也逐渐受到人们的关注。利用超高压技术从一些植物中提取黄酮类<sup>[1]</sup>、多酚<sup>[2]</sup>、花色苷<sup>[3]</sup>、毛柳甙<sup>[4]</sup>等活性物质都已有相关报道。但采用超高压技术提取天然牛磺酸的研究还鲜有报道。

天然牛磺酸是最重要的氨基酸之一, 具有许多重要的生物学功能, 普遍存在于海产品和许多哺乳动物组织中, 其中海洋贝类是牛磺酸含量最为丰富的天然来源之一, 尤其是牡蛎<sup>[6]</sup>、马氏珠母贝、翡翠贻贝和企鹅珍珠贝中的牛磺酸含量远高于其他贝类。根据本研究的前期预实验结果, 采用超高压技术提取牡蛎中的牛磺酸具有一定的可行性, 可能具有增加提取效率、减少污染、节省成本等优点。因此, 利用超高压技术提取牡蛎中的天然牛磺酸具有广阔的应用前景。

本研究拟采用超高压技术对牡蛎中的牛磺酸进

收稿日期: 2016-04-21

作者简介: 徐成(1989-), 男, 硕士, 研究方向: 水产品高值化加工与利用, E-mail: paulxuxu@hotmail.com。

\* 通讯作者: 卢虹玉(1976-), 女, 博士, 研究方向: 海洋活性物质研究与开发, E-mail: 41751678@qq.com。

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-48-07B)。

行提取,通过高效液相色谱法(HPLC)测定牛磺酸含量,从而确定超高压最佳提取工艺,并与传统热水抽提法进行比较。本研究将为新型技术在贝类牛磺酸提取中的应用提供前期数据和基础研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

香港牡蛎 广东省湛江市东风市场,新鲜剥壳后沥干水分,-70℃冷藏;牛磺酸标准品 上海一基生物试剂有限公司(纯度>97%);邻苯二甲醛 特冠基化工贸易有限公司; $\beta$ -巯基乙醇 北京索莱宝科技有限公司;甲醇 广州市俱辉化工有限公司;乙腈 天津益仁达化工有限公司。

超高压设备 HPP.L2-600/0.6 天津市华泰森森生物工程技术有限公司;高效液相色谱仪岛津 LC-20AD 型 日本岛津公司;高速冷冻离心机 CR22G II 上海玉研科学仪器有限公司;pH计 雷磁 PHS-3C 上海仪电科学仪器股份有限公司;超低温冷冻柜 MDF-U53V 亚速旺(上海)商贸有限公司。

硼酸钠缓冲溶液(0.4 mol/L):准确称取 2.48 g 硼酸和 1.41 g 氢氧化钠,用水溶解后定容至 100 mL。衍生剂:准确称取 0.1 g 邻苯二甲醛,用 10 mL 甲醇溶解后,再加入 0.1 mL 的 $\beta$ -巯基乙醇,最后用 0.4 mol/L 的硼酸钠缓冲溶液定容至 100 mL。牛磺酸标准溶液的配制(1.000 mg/mL):精密称取 0.2500 g 的牛磺酸标准品,用水溶解后,移入 250 mL 的容量瓶中,并用水稀释至刻度,摇匀。牛磺酸标准使用液的配制(0.01 mg/mL):吸取牛磺酸标准溶液 1.00 mL 于 100 mL 的容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。

### 1.2 超高压提取

精密称取牡蛎匀浆液并用超高压袋分装(每袋 5.000 g),再按一定料液比向超高压袋中加入蒸馏水,封口并摇匀(注意超高压袋内的空气要排干净),接着对牡蛎匀浆液进行超高压处理,取出经超高压处理后的牡蛎匀浆液,在 8000 r/min,4℃的条件下离心,取上清液待测。

### 1.3 单因素实验

超高压法提取牛磺酸可能与压强、保压时间、温度以及料液比等因素相关,分别取这些因素的不同水平考察其对牛磺酸提取的影响。具体选取水平值如下:

压强的选择:让牡蛎匀浆液分别在 50、100、150、200、250、300 MPa 的压强下进行处理,且此时保证温度为 20℃,保压时间为 20 min,料液比为 1:4。

保压时间的选择:让牡蛎匀浆液分别在 5、10、15、20、25、30 min 的条件下进行超高压处理,且此时保证温度为 20℃,压强为 200 MPa,料液比为 1:4。

温度的选择:让牡蛎匀浆液分别在 20、25、30、35、40、45℃的条件下进行超高压处理,且此时保证压强为 200 MPa,时间为 20 min,料液比为 1:4。

料液比的选择:在牡蛎匀浆液中按 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 的比例加入蒸馏水进行超高压处理,且此时保证压强为 200 MPa、温度为 20℃、保压时间为 20 min。

### 1.4 正交实验

根据单因素实验的结果,通过各个因素对于牛磺酸提取率的影响,选择最佳的单因素范围,设计正交表,进行正交实验,各因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 The experimental factors and level

水平	因素			
	A 温度(℃)	B 料液比	C 保压时间(min)	D 压强(MPa)
1	35	1:4	20	200
2	40	1:5	25	250
3	45	1:6	30	300

### 1.5 水煮法提取

水煮法提取牡蛎中的牛磺酸参考王丹等<sup>[5]</sup>的方法,并稍作修改。准确称取 5.000 g 的牡蛎匀浆液于 50 mL 的烧杯中,加入 20 mL 的蒸馏水。将烧杯置于 60℃的水浴中蒸煮 2 h。在蒸煮的过程中要不断的用玻璃棒搅拌。之后待提取液冷却后,在 8000 r/min,4℃的条件下离心,取上清液备用。

### 1.6 牛磺酸含量检测

本实验采用高效液相色谱法测定牛磺酸的含量<sup>[6]</sup>。

1.6.1 高效液相色谱条件 进样量:20  $\mu$ L;流速:0.3 mL/min;柱温:40℃;最高限压:20 MPa 检测器波长: $\lambda$ EX:338 nm  $\lambda$ EM:425 nm;流动相组成:甲醇:乙腈:水=1:1:8。

1.6.2 牛磺酸标准曲线的制作 分别移取质量浓度为 0.01 mg/mL 的牛磺酸标准使用液 0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.20 mL 于 2.0 mL 的离心管中,用超纯水稀释至刻度,摇匀,得到了 7 个系列浓度的牛磺酸标准品溶液,再分别吸取 1.0 mL 的上述已经稀释的牛磺酸溶液于另外一个 2.0 mL 的离心管中,再准确加入事先配制好的邻苯二甲醛溶液 1.0 mL,混匀,衍生 3 min 后,经 0.45  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤在 2 mL 的进样瓶中<sup>[7]</sup>,放入自动进样器中,用高效液相色谱仪进行测定。以牛磺酸标准品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,制作标准曲线。

1.6.3 牛磺酸检测 分别取经超高压处理、水煮法处理的牡蛎上清液以及牡蛎样品稀释液 0.5 mL 到 50 mL 的比色管中,用蒸馏水定容至刻度并摇匀。取稀释了 10000 倍的样品液 1 mL 于 2 mL 的离心管中,再准确加入 1 mL 的衍生剂,混匀,衍生 3 min 后经 0.45  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤在 2 mL 的进样瓶中,放入自动进样器中,用高效液相色谱仪进行测定,记录峰面积。

1.6.4 精密度实验 取 400  $\mu$ L 已知质量浓度为 0.001 mg/mL 的牛磺酸标准品溶液于 2 mL 离心管中,用超纯水定容至刻度,再取 1.0 mL 上述已稀释的牛磺酸标准品溶液于 2.0 mL 的离心管中,加入 1 mL 的邻苯二甲醛经衍生 3 min,通过 0.45  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤到 2 mL 的进样瓶中进行测定。重复测定 6 次,记录每一次的峰面积,通过计算牛磺酸的浓度,

以相对标准偏差来度量仪器的精密度。

1.6.5 回收率测定 精密称取 5.000 g 牡蛎样品 6 份,分别在 6 份样品中加入 10.00、20.00、30.00、40.00、50.00、60.00 mg 的牛磺酸标准品,通过之前的单因素实验已知在压强 300 MPa,温度 45 °C,料液比 1:5,保压时间 25 min 条件下处理牡蛎得到其牛磺酸含量为 17.84 mg/g,故在此条件下处理牡蛎加标样提取牛磺酸,用高效液相色谱检测牛磺酸,计算牛磺酸的回收率。

#### 1.6.6 牛磺酸含量计算

$$X = \frac{c \times V_2}{V_1 \times 10000}$$

式中: $X$ —试样中牛磺酸的含量,单位为毫克每克(mg/g); $c$ —经查图和计算得进样液中牛磺酸的含量,单位为毫克每毫升(mg/mL); $V_2$ —试样总的稀释体积,单位为毫升(mL); $V_1$ —试样的体积,单位为毫升(mL)。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

超高压的原理就是利用超高压使细胞的细胞膜破碎,从而使得细胞内的物质与溶剂结合,以达到提高目标产物提取率的效果,因此压强是超高压提取过程中一个重要的影响因素。从图 1 可知牛磺酸的提取率,随着压强的增大而增大,当压强达到 250 MPa 之后,牛磺酸的提取量趋于平稳。这是因为随着压强的增加,有效成分的传质速率不断增加,细胞壁和细胞膜的破碎增加,从而使得牛磺酸的提取量随着压强的增加而增加,而当压强超过 250 MPa 时,细胞的细胞膜和细胞壁已经完全破碎,所以随着压强的增加牛磺酸的提取量没有太大的变化。

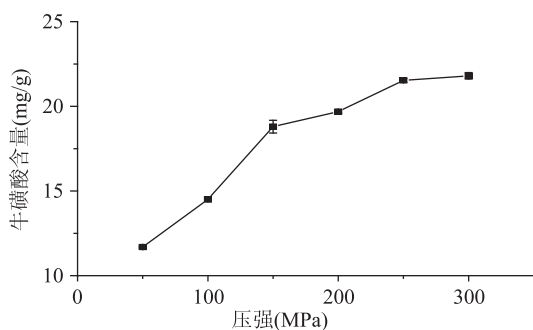


图 1 压强对牛磺酸提取量的影响

Fig.1 Effect of pressure on extraction of taurine

保压时间长短与牛磺酸提取量的关系,见图 2。保压时间对有效成分的提取也十分重要,随着保压时间的增加,细胞内溶物会不断增加,但在一定压强条件下,随着时间的增加细胞内溶物与周围溶剂会逐渐达到平衡<sup>[8]</sup>。超高压时间在 10 min 以内,对于牛磺酸提取量的影响很小,这可能是由于保压时间过短,细胞膜还没有被完全的破坏。从第 10 min 时开始牛磺酸提取量逐渐上升,保压时间在 25 min 之后其提取量则趋于平稳。

温度与牛磺酸提取量的大小关系,见图 3。由图

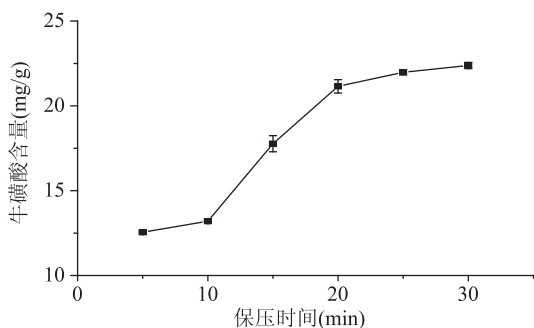


图 2 保压时间对牛磺酸提取量的影响

Fig.2 Effect of pressure-holding time on extraction of taurine

可知,随着温度的升高,牛磺酸的提取量不断地升高,当温度到达 40 °C 后,牛磺酸的提取量趋于平稳。温度对牛磺酸的提取量也产生了很大的影响,可能是由于牛磺酸是一种游离氨基酸,能够溶于水,温度的增加会使得牛磺酸的提取量增加。在孙利芹等人提取扇贝中牛磺酸的实验中发现<sup>[9]</sup>,温度对牛磺酸的提取有着显著的影响:在一定温度范围内,随着温度的升高,牛磺酸的提取量不断增加。

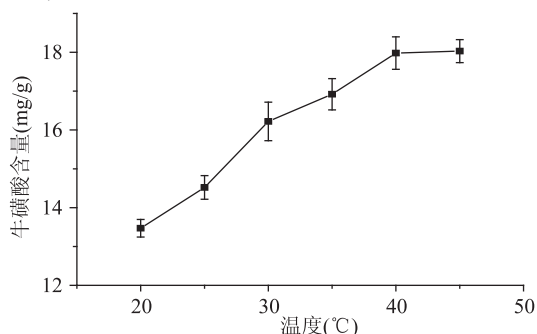


图 3 温度对牛磺酸提取量的影响

Fig.3 Effect of the temperatures on extraction of taurine

陈瑞占等<sup>[10]</sup>提取西洋参皂苷的研究中发现在提取的过程中,西洋参的溶质浓度逐渐降低,而溶剂中的溶质浓度逐渐增加,可见料液比在利用超高压提取有效成分时起着重要作用。由图 4 可知,随着料液比的增加,牛磺酸的提取量随之增加,当料液比为 1:4 时牛磺酸提取量最高。

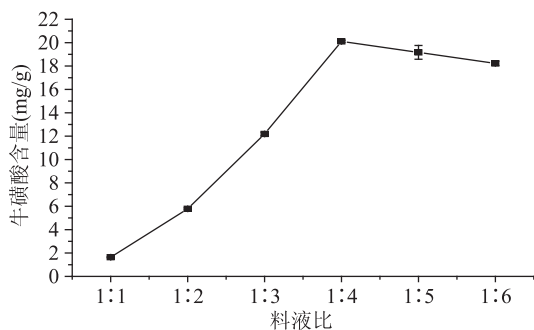


图 4 料液比对牛磺酸提取量的影响

Fig.4 Effect of material/liquid ration on extraction of taurine

### 2.2 超高压提取牛磺酸工艺的优化

根据正交实验极差分析结果表明(表 2),在已选定的温度、液料比、保压时间、压强范围内,影响牡蛎

表3 正交实验的方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis of orthogonal test

差异源	偏差平方和	自由度	均方	F	p 值
温度(℃)	4.517	2	2.258	31.990	<0.0001
料液比	0.258	2	0.129	1.826	0.216
保压时间(min)	0.970	2	0.485	6.873	0.015
压强(MPa)	200.865	2	100.432	1422.666	<0.0001
误差	0.635				

表4 精密度及稳定性实验结果(n=6)

Table 4 Results of instrument accuracy and stability analysis(n=6)

实验号	1	2	3	4	5	6	平均值	相对标准偏差 RSD(%)
牛磺酸含量(mg)	0.0039	0.0037	0.0039	0.0038	0.0036	0.0037	0.0038	2.95

中牛磺酸提取得率的主次因素是压强 > 温度 > 料液比 > 保压时间,各因素的最佳水平组合是 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即压强为 300 MPa,温度 45 ℃,料液比为 1:5,保压时间为 25 min。由于最佳参数组合不在 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验的组合内,故以最佳条件进行了验证实验,其得率为 22.96 mg/g,说明该条件为超高压提取牛磺酸的最优条件。为了进一步检验正交实验的有效性,对正交实验数据进行方差分析,结果显示与极差分析结果一致(表3),即压强对牛磺酸的得率影响最显著,其次为温度,而料液比和保压时间对牛磺酸的得率影响不显著。

表2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验结果和极差分析

Table 2 Results of range analysis and orthogonal test L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)

实验号	A	B	C	D	得率(mg/g)
1	1	1	1	1	18.39
2	1	2	2	2	18.82
3	1	3	3	3	22.18
4	2	1	2	3	21.76
5	2	2	3	1	18.51
6	2	3	1	2	17.69
7	3	1	3	2	19.07
8	3	2	1	3	22.89
9	3	3	2	1	19.32
K <sub>1</sub>	19.80	19.74	19.66	18.74	
K <sub>2</sub>	19.32	20.07	19.97	18.53	
K <sub>3</sub>	20.43	19.73	19.92	22.28	
R	1.11	0.34	0.31	3.75	

### 2.3 牛磺酸含量测定结果

2.3.1 牛磺酸标准曲线的绘制 以牛磺酸标准品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得到牛磺酸标准曲线,如图5所示。当牛磺酸浓度在 0.0005~0.006 mg/mL 范围内,进样浓度与峰面积呈良好的线性关系,回归方程  $y = 3109x + 978380$ ,相关系数  $R^2 = 0.9927$ 。

在牛磺酸标准曲线制作过程中,发现牛磺酸标准品进样会产生 3 个明显的色谱峰,为了确定牛磺酸对应的保留时间,对所有标准液进样后产生的三个色谱峰的峰面积进行了积分和分析,仅保留时间为 12.8 min 的色谱峰峰面积与浓度成线性关系,同时对比了单纯衍生试剂的色谱峰,确认保留时间为

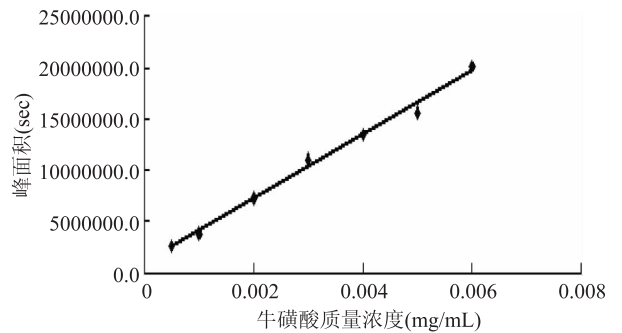


图5 牛磺酸标准曲线图

Fig.5 Standard curve of taurine

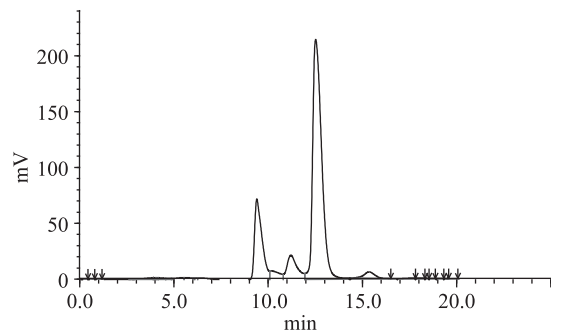


图6 牛磺酸标准品高效液相色谱图

Fig.6 Chromatograms of taurine standard

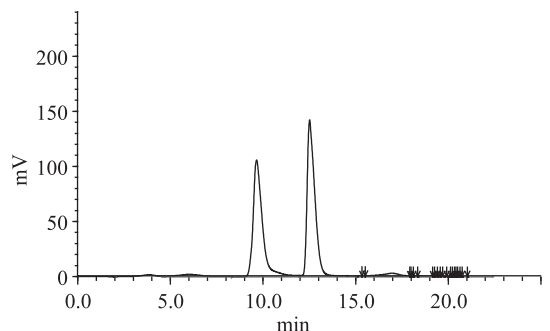


图7 牡蛎牛磺酸溶液高效液相色谱图

Fig.7 Chromatograms of oyster taurine sample

12.8 min 的色谱峰为牛磺酸,而杂峰是由于过量衍生剂未充分反应及杂质所产生的。

2.3.2 精密度测定 如表4所示,相对标准偏差 RSD = 2.95%,说明采用高效液相色谱法检测牛磺酸具有

良好的精密密度。

2.3.3 回收率结果 由表 5 可知 6 种加标回收率分别为 90.98% ~ 97.38%，平均回收率达到 94.55% (RSD = 2.66%)，说明用超高压法处理牡蛎回收率较好。

表 5 方法加标回收率实验结果  
Table 5 Spike recoveries of the methods

序号	1	2	3	4	5	6
本底值(mg/g)	17.84	17.84	17.84	17.84	17.84	17.84
加标量(mg/g)	2.00	4.00	6.00	8.00	10.00	12.00
理论值(mg/g)	19.84	21.84	23.84	25.84	27.84	29.84
回收率(%)	94.91	91.99	96.02	90.98	97.38	96.01
平均回收率(%)	94.55					
相对标准偏差 RSD(%)	2.66					

## 2.4 与水煮提取法比较结果

经检测,传统的水煮提取法提取得到的牛磺酸为 17.07 mg/g。由此可知,超高压提取法效率要高于传统的热热水提取法。

## 3 结论与讨论

牛磺酸是哺乳动物中一种重要的游离氨基酸,在中枢神经以及肌肉中都起着重要的作用,而在我国具有高产量的牡蛎含有丰富的牛磺酸。目前,提取牡蛎中的牛磺酸的方法主要是热水抽提法;此外有机溶剂抽提法,如乙醇抽提法,还常常利用超声波等辅助手段来提高牡蛎中牛磺酸的提取量。但上述传统的提取方法常常具有提取时间长,效率低下等缺点。Hyun-Sun Lee<sup>[11]</sup>等人同时采用超高压技术和传统的热提取法来从人参中提取人参皂苷,结果表明超高压能提高人参皂苷的提取量以及缩短提取时间。本实验通过从料液比、温度、压强、保压时间四个水平进行单因素实验结合随后的正交实验得出超高压法提取牡蛎的最佳工艺条件为压强 300 MPa,温度 45 ℃,液料比 1:5,保压时间 25 min,此时的牛磺酸提取量为 22.96 mg/g,高于热水抽提法得到的牛磺酸量(17.07 mg/g)。

目前,检测牛磺酸的方法相对比较成熟,包括高效液相色谱法、紫外分光光度法、荧光法以及氨基酸自动分析法;其中高效液相色谱法的样品预处理简

单,方法准确度、精确度及灵敏度较高,在测定食品和生物组织中牛磺酸含量的应用中日益广泛<sup>[7]</sup>。本实验采用的高效液相色谱法的精密密度及稳定性和回收率的 RSD 均在 5% 以内,证明实验中采用的高效液相色谱法具有良好的稳定性、精密密度和回收率,能较准确的测定牛磺酸的含量。综上所述,相对传统的热热水抽提法来说,超高压法能有效的从牡蛎中提取牛磺酸,可作为一种提取牛磺酸的新方法。

## 参考文献

- [1] Shouqin Z, Jun X, Changzheng W. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005, 80(1): 50-54.
- [2] Xi J, Shen D, Zhao S, et al. Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 382(1): 139-143.
- [3] Corrales M, García A F, Butz P, et al. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure [J]. Journal of Food Engineering, 2009, 90(4): 415-421.
- [4] Bihumin, Zhang S Qin, Liu C J, et al. High hydrostatic pressure extraction of salidroside from Rhodiola Sachalinensis [J]. Journal of Food Process Engineering, 2009, 32(1): 53-63.
- [5] 王丹, 赵元晖, 曾名湧, 等. 牡蛎营养成分的测定及水提工艺的研究 [J]. 食品科技, 2011, 36(3): 209-212.
- [6] 卫生部. GB/T 5009.169-2003 食品中牛磺酸的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [7] 张亮, 刘文, 郑平安, 等. 高效液相色谱法快速测定紫贻贝中的牛磺酸 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(4): 53-56.
- [8] 凌庆枝, 李晓, 魏兆军, 等. 桑叶多糖超高压提取工艺研究 [J]. 食品与机械, 2008(2): 50-52.
- [9] 孙利芹, 姜爱莉, 郭尽力. 从扇贝边中提取牛磺酸工艺的研究 [J]. 食品工业科技, 2004, 25(1): 106-107.
- [10] 陈瑞战, 张守勤, 王长征, 等. 超高压提取西洋参皂苷的工艺研究 [J]. 农业工程学报, 2005, 21(5): 150-154.
- [11] Lee H S, Lee H J, Yu H J, et al. A comparison between high hydrostatic pressure extraction and heat extraction of ginsenosides from ginseng (Panax ginseng CA Meyer) [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(8): 1466-1473.

全国中文核心期刊  
轻工行业优秀期刊