

## 超滤浓缩技术分离鹿茸中胰岛素样生长因子-1

周冉<sup>1,2\*</sup>, 王飞<sup>1</sup>, 郝洁<sup>2</sup>, 李淑芬<sup>2</sup>

1. 石家庄学院化工学院, 河北 石家庄 050035

2. 天津大学化工学院 绿色合成与转化教育部重点实验室, 天津 300072

**摘要:** **目的** 建立鹿茸中胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 的超滤浓缩工艺。**方法** 以鹿茸冻干粉为原料, 采用超滤技术对 IGF-1 的超滤浓缩工艺进行考察。以聚醚砜 (PES) 膜和改性 PES 膜进行对比研究, 考察截留相对分子质量、压力、pH 值等因素对鹿茸冻干粉超声提取液超滤浓缩过程的影响, 并对超滤膜的清洗方法进行考察, 得出适宜的工艺条件。**结果** 最优工艺条件为截留相对分子质量: PES 膜 4 000, 改性 PES 膜 5 000; 压力为 0.3 MPa, pH 值为 12。在此条件下, PES 膜 IGF-1 回收率达到 68.32%, 蛋白质回收率达到 69.20%; 改性 PES 膜 IGF-1 回收率达到 57.17%, 蛋白质回收率达到 87.43%。采用 4 种不同的方法对超滤膜进行清洗, 结果表明, 超滤膜在 0.4% NaOH-0.1% NaClO 溶液中浸泡 24 h, PES 膜膜通量恢复率达到 98.65%, 改性 PES 膜膜通量恢复率达到 93.75%, 膜通量接近完全恢复。**结论** 采用优化的超滤浓缩技术能够达到浓缩分离 IGF-1 的目的。该工艺操作简单、稳定, 超滤膜易于清洗, 回收率高, 具有工业化生产应用价值。

**关键词:** 鹿茸; 胰岛素样生长因子-1; 超滤; 分离; 膜通量

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)10-1257-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.009

## Ultrafiltration and concentration used for separating insulin-like growth factor-1 from *Cervi Cornu Pantotrichum*

ZHOU Ran<sup>1,2</sup>, WANG Fei<sup>1</sup>, HAO Jie<sup>2</sup>, LI Shu-fen<sup>2</sup>

1. School of Chemical Engineering, Shijiazhuang University, Shijiazhuang 050035, China

2. Key Laboratory for Green Chemical Technologies, Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

**Abstract: Objective** To establish the ultrafiltration process of concentrating insulin-like growth factor-1 (IGF-1) from *Cervi Cornu Pantotrichum* (CCP). **Methods** The ultrafiltration technique was utilized to concentrate the IGF-1 with CCP freeze-dried powder as raw material. The polyethersulfone (PES) membrane and modified PES membrane were compared and studied. The effects of relative molecular weight cutoff (RMWCO), pressure, and pH value on IGF-1 ultrafiltration process were investigated. Furthermore, the cleaning methods were investigated, and the optimal conditions were obtained. **Results** The optimal conditions were as follows: The RMWCO of PES membrane was 4 000, the RMWCO of modified PES membrane was 5 000, the pressure was 0.3 MPa, and the pH value was 12. The recovery rate of IGF-1 and protein reached 68.32% and 69.20%, respectively by the PES membrane, while the recovery rate of IGF-1 and protein reached 57.17% and 87.43% respectively by the modified PES membrane. Four different methods were employed to clean the membrane. The results showed that the membrane immersed in 0.4% NaOH-0.1% NaClO solution for 24 h was the appropriate cleaning method, by which the PES membrane permeation flux recovery rate could reach 98.65% and the modified PES membrane permeation flux recovery rate could reach 93.75%. **Conclusion** The IGF-1 could be easily concentrated and separated using the ultrafilter condensing technique. The process is easy and stable, and the membrane is easy to be cleaned and has high recovery rate, which has the high potential of industrial production and application.

**Key words:** *Cervi Cornu Pantotrichum*; insulin-like growth factor-1; ultrafiltration; separation; membrane permeation flux

收稿日期: 2012-11-04

基金项目: 国家“十一五”重大新药创制科技重大专项综合性新药研究开发技术大平台项目 (2009ZX09301-008)

作者简介: 周冉 (1981—), 女, 讲师, 研究方向为天然产物提取分离及其新剂型开发。

Tel/Fax: (0311)66617320 13582025825 E-mail: helly30072004@163.com

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.2016.019.html>

鹿茸 *Cervi Cornu Pantotrichum* (CCP) 为鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *C. elaphus* Linnaeus 的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角<sup>[1]</sup>, 是一味传统名贵中药, 具有温肾壮阳、益精补血、强健筋骨等功效。鹿茸中含有脂类、多糖、多胺、蛋白质及多肽、激素样物质、生物碱等多种具有重要生理活性的物质<sup>[2-7]</sup>。其中的胰岛素样生长因子-1 (IGF-1), 由于具有促进生长发育, 防治糖尿病、骨质疏松等功效, 近年来日益受到人们的关注<sup>[8-11]</sup>。

本课题组前期以挥发性的缓冲液氨-醋酸铵为提取溶剂, 采用超声波强化提取技术, 建立了适合鹿茸冻干粉中 IGF-1 提取的工艺条件<sup>[12]</sup>。但在对提取液进行超滤浓缩时发现, 超滤浓缩阶段中 IGF-1 和蛋白质富集于膜表面, 收集起来困难。然而目前, 国内外尚无对鹿茸提取物 IGF-1 超滤浓缩工艺的报道。因此, 本实验以鹿茸冻干粉为原料, 通过考察截留相对分子质量 (cut off relative molecular weight, CORMW)、压力、pH 值、膜种类、清洗方法等因素对鹿茸中 IGF-1 的超滤浓缩过程的影响<sup>[13]</sup>, 对 IGF-1 的超滤浓缩工艺进行系统性研究, 从而得到优化的 IGF-1 的超滤分离工艺。本实验结果可为鹿茸资源的合理开发利用及超滤浓缩技术在医药领域和保健品行业中的开发应用提供理论依据。

## 1 仪器与材料

TGL—16M 高速台式冷冻离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司), KG—200DF 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), SCM—250 超滤杯系统 (上海应用物理研究所), UV—1600 紫外可见分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司), GC—911 激素  $\gamma$  放射免疫计数器 (中国科技大学开发研究院中国同位素公司)。

鲜鹿茸由吉林修正药业有限公司提供, 为头茬茸, 均经吉林修正药业有限公司刘崑松高级工程师鉴定为梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角。聚醚砜 (PES) 超滤膜 (中国科学院上海应用物理研究所膜分离技术研究发展中心, 单张膜面积 28.7 cm<sup>2</sup>); 改性 PES 超滤膜 (美国 Pall 公司, 单张膜面积 28.7 cm<sup>2</sup>); 牛血清白蛋白 (中国科学院上海生化研究所); IGF-1 放射免疫分析药盒 (天津九鼎医学生物工程有限公司); 考马斯亮蓝 G-250 (进口分装, 天津厚普生物有限公司); 所有缓冲溶液均用超纯水配制, 使用前经 0.2  $\mu$ m 的醋酸纤维膜过滤并真空脱气。

## 2 方法与结果

### 2.1 原料的预处理

将新鲜鹿茸用切片机切成厚度 2~3 mm 的薄片, 在 -60 °C 条件下真空冷冻干燥 24~30 h 直至鹿茸中含水量 < 3%。为了保持鹿茸中有效成分的活性, 将经冷冻干燥后的鹿茸片通过超低温微粉碎机粉碎成 160~180 目的颗粒待用。

### 2.2 超声提取液的制备

准确称取 1 g 左右的鹿茸冻干粉, 置 40 mL 试剂瓶中, 再加入 18 mL 6.0 mol/L pH 10.0 氨-醋酸铵缓冲液, 搅匀。然后将试剂瓶固定在超声波清洗器中, 在超声功率 200 W, 提取温度 20~35 °C, 提取时间为 15 min 的条件下进行超声提取。超声结束后, 低速 (1 200~1 800 r/min) 离心 5 min; 收集上清液, 放入相应的干净玻璃小瓶中。以上实验重复 4 次, 合并滤液作为粗提液。

### 2.3 IGF-1 和蛋白质的分析

采用放射免疫法 (RIA)<sup>[14]</sup> 测定鹿茸超滤浓缩液中的 IGF-1。

采用 Bradford 法测定鹿茸超滤浓缩液中的蛋白质<sup>[15]</sup>。以牛血清白蛋白作为对照品, 在 595 nm 处测定溶液的吸光度 ( $A$ ) 值。以吸光度值 ( $Y$ ) 对牛血清白蛋白质量浓度 ( $X$ ) 进行线性回归, 得回归方程为  $Y=0.0011X+0.0369$ ,  $R^2=0.9979$ 。

### 2.4 IGF-1 的超滤浓缩分离工艺条件的优化

采用 SCM 杯式超滤系统, 利用 PES 膜和改性 PES 膜, 考察截留相对分子质量、压力、pH 值、膜种类、清洗方法等因素对膜通量、IGF-1 与蛋白质回收率和透过率的影响。取 50 mL 超声提取液加入超滤装置, 记录一定时间内透过液的体积, 计算膜通量和 IGF-1、蛋白质回收率和透过率。

$$\text{膜通量} = \text{透过液体积} / (\text{膜有效面积} \times \text{超滤时间})$$

$$\text{IGF-1、蛋白质回收率} = \text{膜上液中 IGF-1 或蛋白质的量} / \text{样品溶液中 IGF-1 或蛋白质的量}$$

$$\text{IGF-1、蛋白质透过率} = \text{膜下液中 IGF-1 或蛋白质的量} / \text{样品溶液中 IGF-1 或蛋白质的量}$$

**2.4.1 截留相对分子质量对超滤浓缩的影响** 截留相对分子质量不仅影响超滤的处理效果 (膜通量和截留率), 还能影响膜污染, 因此适宜的截留相对分子质量的选择对超滤工艺来说, 是非常重要的。本实验在溶液 pH 值为 10, 超滤压力 0.3 MPa, 浓缩 5 倍条件下, 选用不同截留相对分子质量的超滤膜进行超滤。其中, PES 膜截留相对分子质量 4 000、

10 000, 改性 PES 膜截留相对分子质量 5 000、10 000。考察其对膜通量、IGF-1 和蛋白质回收率及透过率的影响, 结果见图 1 和表 1。

从图 1 可以看出, 随着超滤时间的延长, 膜通量逐渐下降, 当膜表面形成凝胶层时, 膜通量趋于定值。截留相对分子质量增大, 膜通量增大, 超滤时间缩短。从表 1 可以看出, 截留相对分子质量从 4 000 增大到 10 000, PES 膜 IGF-1 回收率从 31.24% 下降到 27.94%; 蛋白质回收率从 61.03% 下降到 55.32%。截留相对分子质量从 5 000 增大到 10 000,

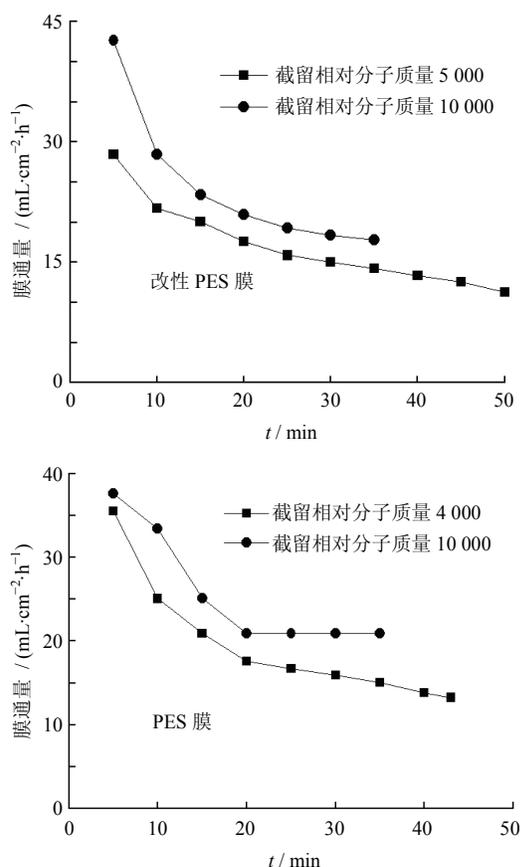


图 1 截留相对分子质量对膜通量的影响

Fig. 1 Effect of CORMW on membrane permeation flux

表 1 截留相对分子质量对超滤浓缩液中 IGF-1、蛋白质回收率及透过率的影响

Table 1 Effect of CORMW on recovery rate and transmission rate of IGF-1 and protein

膜种类及其截留 相对分子质量	回收率 / %		透过率 / %	
	IGF-1	蛋白质	IGF-1	蛋白质
PES 膜	4 000	31.24	61.03	0
	10 000	27.94	55.32	8.32
改性 PES 膜	5 000	32.38	96.56	0
	10 000	26.89	88.09	5.43

改性 PES 膜 IGF-1 回收率从 32.38% 下降到 26.89%; 蛋白质回收率从 96.56% 下降到 88.09%。截留相对分子质量增大到 10 000, 2 种膜 IGF-1 和蛋白质回收率都减小, 且都有部分 IGF-1 和蛋白质随透过液流出。

因此, 为获得较高的 IGF-1 和蛋白质回收率, 选择 PES 膜 4 000 和改性 PES 膜 5 000 作为适宜的截留相对分子质量。

2.4.2 压力对超滤浓缩的影响 在溶液 pH 值为 10, PES 膜截留相对分子质量 4 000, 改性 PES 膜截留相对分子质量 5 000, 浓缩 5 倍的条件考察超滤压力在 0.1、0.2、0.3 MPa 时对膜通量、IGF-1 和蛋白质回收率和透过率的影响, 结果见图 2 和表 2。

压力是膜分离的推动力, 对膜通量的大小起到决定性作用, 从图 2 可以看出, 随着超滤时间的延长, 膜通量逐渐下降, 当膜表面形成凝胶层时, 膜通量趋于定值。超滤压力从 0.1 MPa 增大到 0.3 MPa, 膜通量增大, 超滤时间缩短, 但膜通量的衰减也加快。从表 2 可以看出压力从 0.1 MPa 增大到 0.3 MPa, PES 膜 IGF-1 回收率在 30.67%~32.48%

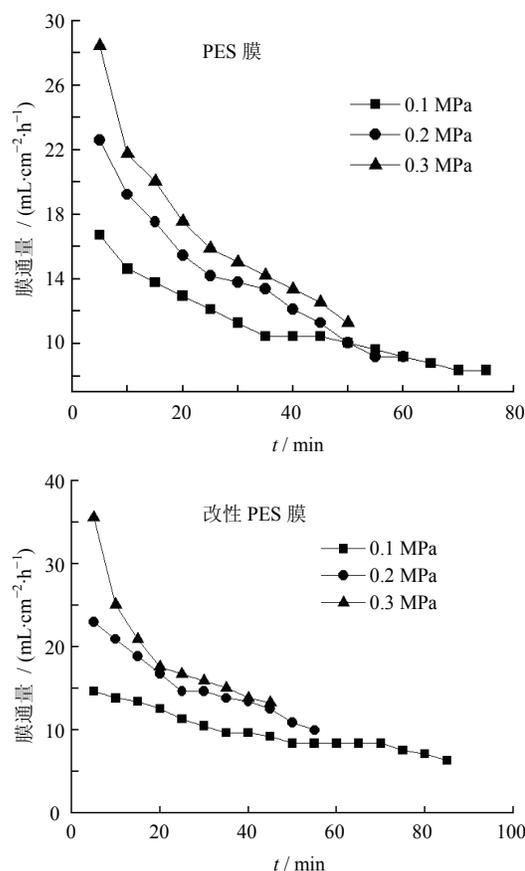


图 2 压力对膜通量的影响

Fig. 2 Effect of pressure on membrane permeation flux

表2 压力对超滤浓缩液中 IGF-1、蛋白质回收率和透过率的影响

**Table 2 Effect of pressure on recovery rate and transmission rate of IGF-1 and protein in ultrafiltration concentrated solution**

膜种类	压力 / MPa	回收率 / %		透过率 / %	
		IGF-1	蛋白质	IGF-1	蛋白质
PES 膜	0.1	30.67	68.54	0	0
	0.2	32.48	60.03	0	0
	0.3	31.24	61.03	0	0
改性 PES 膜	0.1	36.26	96.13	0	0
	0.2	34.68	94.74	0	0
	0.3	32.38	96.56	0	0

波动, 蛋白质回收率从 68.54% 下降到 61.03%, 影响不是很大。压力从 0.1 MPa 增大到 0.3 MPa, 改性 PES 膜 IGF-1 回收率从 36.26% 下降到 32.38%, 蛋白质回收率在 94.74%~96.56% 波动, 影响不明显。在 3 个压力等级下, 透过液中均未检测出 IGF-1 和蛋白质。

综合考虑膜通量及 IGF-1 和蛋白质回收率及透过率, 选择 0.3 MPa 作为适宜的操作压力。

**2.4.3 pH 值对超滤浓缩的影响** 在 PES 膜截留相对分子质量 4 000, 改性 PES 膜截留相对分子质量 5 000, 压力 0.3 MPa, 浓缩 5 倍的条件考察 pH 值 4、6、8、12 对膜通量、IGF-1 和蛋白质回收率及透过率的影响, 结果见图 3 和表 3。

pH 值能影响蛋白质的相互作用, 改变蛋白质的构型和分散性, 显著影响膜通量。从图 3 可以看出, 随着超滤时间的延长, 膜通量下降, 当膜表面形成凝胶层时, 膜通量趋于定值。加酸调节 pH 值依次为 8~4, 膜通量显著下降, 且加酸后溶液量增大, 浓缩到原倍数时超滤时间延长。加碱调节 pH 值至 12, 膜通量显著增大, 但加碱后溶液量增大, 浓缩到原倍数时超滤时间也延长。

加酸调节 pH 值至 8, PES 膜和改性 PES 膜 IGF-1 回收率都达到最低值, 这主要是由于 IGF-1 的等电点为 8.2, 处于等电点时, IGF-1 易沉淀析出。继续加酸调节 pH 值至 4, IGF-1 回收率增大, 其中 PES 膜 IGF-1 回收率增大到 37.21%, 改性 PES 膜 IGF-1 回收率增大到 39.05%; 加碱调节 pH 至 12, IGF-1 回收率明显增大, 其中 PES 膜 IGF-1 回收率增大到 68.32%, 改性 PES 膜 IGF-1 回收率增大到 57.17%。

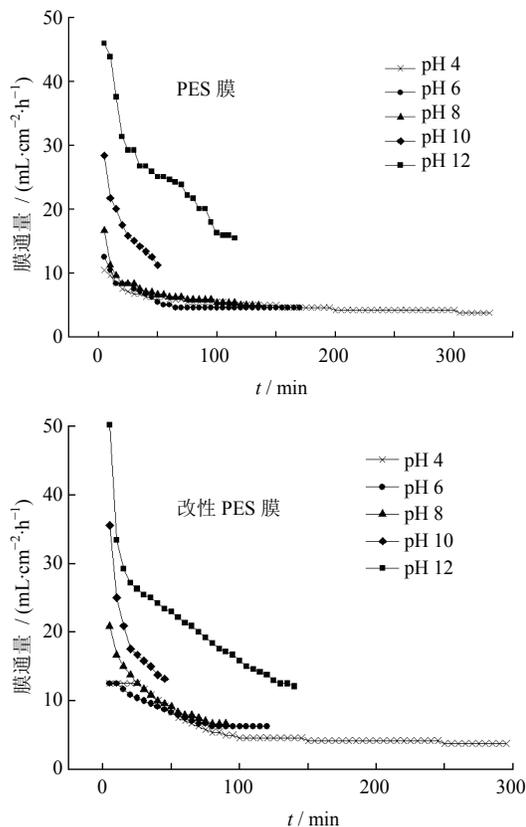


图3 pH 值对膜通量的影响

Fig. 3 Effect of pH value on membrane permeation flux

表3 pH 值对超滤浓缩液中 IGF-1 和蛋白质回收率和透过率的影响

**Table 3 Effect of pH value on recovery rate and transmission rate of IGF-1 and protein in ultrafiltration concentrated solution**

膜种类	pH	回收率 / %		透过率 / %	
		IGF-1	蛋白质	IGF-1	蛋白质
PES 膜	4	37.21	18.89	0	0
	6	29.91	50.10	0	0
	8	16.08	50.51	0	0
	10	31.23	61.03	0	0
	12	68.32	69.20	8.67	6.28
改性 PES 膜	4	39.05	26.42	0	0
	6	27.25	43.88	0	0
	8	21.82	52.73	0	0
	10	32.38	96.56	0	0
	12	57.17	87.43	5.25	3.33

酸性越强, 蛋白质回收率越低, 加酸调节 pH 值至 4, PES 膜蛋白质回收率减小到 18.89%, 改性 PES 膜蛋白质回收率减小到 26.42%。加碱调节 pH 至 12, 2 种膜蛋白质回收率的变化不尽相同, PES 膜蛋白

质回收率增大到 69.20%，改性 PES 膜蛋白质回收率减小到 87.43%，2 种膜都有少量 IGF-1 和蛋白质随透过液流出。

pH 值为 12 时，膜通量最高，膜吸附最低，这主要是由于碱性条件下蛋白质呈负电性，采用负电荷的膜过滤蛋白质，膜与蛋白质的静电排斥作用最强，因此膜受蛋白质污染最小，通量最高。

综合考虑膜通量及 IGF-1 和蛋白质回收率和透过率，pH 值 12 为适宜的 pH 值。

综上，利用超滤技术浓缩 IGF-1 的最优工艺条件为截留相对分子质量 PES 膜为 4 000，改性 PES

膜为 5 000；压力为 0.3 MPa；pH 值为 12。在此条件下，PES 膜 IGF-1 回收率达到 68.32%，蛋白质回收率达到 69.20%；改性 PES 膜 IGF-1 回收率达到 57.17%，蛋白质回收率达到 87.43%。

**2.4.4 最佳工艺条件验证** 通过单因素试验结果选择出的最优条件下，进行了最佳工艺的验证试验，结果见表 4。可知，在最优条件下，PES 膜 IGF-1 和蛋白质的平均回收率分别为 68.35%和 69.55%，RSD 分别为 0.97%和 0.84%。改性 PES 膜 IGF-1 和蛋白质的平均回收率分别为 57.49%和 87.70%，RSD 分别为 1.08%和 0.39%。

表 4 超滤浓缩分离 IGF-1 最佳条件的验证试验

Table 4 Verification of ultrafiltration process for separating IGF-1 under optimum conditions

膜种类	截留相对分子质量	pH 值	压力 /MPa	平均回收率 / %		RSD / %	
				IGF-1	蛋白质	IGF-1	蛋白质
PES 膜	4 000	12	0.3	68.35	69.55	0.97	0.84
改性 PES 膜	5 000	12	0.3	57.49	87.70	1.08	0.39

**2.4.5 PES 膜和改性 PES 膜的比较** 由上述 2 种膜的对比实验可知，以 IGF-1 为考察指标，一般情况下，改性 PES 膜与 PES 膜的回收率相当；以蛋白质为考察指标，改性 PES 膜的回收率明显高于 PES 膜。因此，若仅为获得较高的 IGF-1 回收率，选择价格较低 PES 膜即可；若目标产物是总蛋白，需选择价格较高的改性 PES 膜。

**2.4.6 超滤膜的清洗方法考察** 分别考察超滤膜在 0.4% NaOH 溶液中于超滤杯中冲洗 1 h，在 0.4% NaOH-0.1% NaClO 溶液中于超滤杯中冲洗 1 h，在 0.4% NaOH 溶液中浸泡 24 h，在 0.4% NaOH-0.1% NaClO 溶液中浸泡 24 h 的清洗情况，结果见表 5。超滤膜在 0.4% NaOH-0.1% NaClO 溶液中浸泡 24 h，PES 膜水通量恢复率达到 98.65%，改性 PES 膜水通量恢复率达到 93.75%，膜通量接近完全恢复。因此，选择超滤膜在 0.4% NaOH-0.1% NaClO 溶液

中浸泡 24 h 作为适宜的清洗条件。

### 3 结论

采用超滤浓缩技术，选择截留相对分子质量 PES 膜 4 000，改性 PES 膜 5 000，压力 0.3 MPa，pH 值 12 能够有效地达到浓缩分离 IGF-1 的目的，为鹿茸资源的合理开发利用提供理论依据。该工艺简单、稳定，得到的 IGF-1 和蛋白质回收率较高，超滤膜易于清洗，具有工业化生产应用价值。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Kang S K, Kim K S, Kim S I, et al. Immunosuppressive activity of deer antler extracts of *Cervus korean Temminck var. manchuricus* Swinhoe, on type II collagen-induced arthritis [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2006, 42(3/4): 100-107.
- [3] Zhang Z Q, Zhang Y, Wang B X, et al. Purification and partial characterization of anti-inflammatory peptide from pilose antler of *Cervus nippon* Temminck [J]. *Acta Pharm Sin*, 1992, 27(5): 321-324.
- [4] Wang B X, Zhao X H, Qi S B, et al. Effects of repeated administration of deer antler extract on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(7): 2587-2592.
- [5] 钟英杰, 曲晓波. 梅花鹿茸的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *长春中医学院学报*, 2005(3): 61-63.
- [6] 柯李晶, 聂毅磊, 叶秀云, 等. 梅花鹿鹿茸中促 PC12

表 5 超滤膜的清洗方法考察

Table 5 Cleaning methods of ultrafiltration membrane

清洗方法	水通量恢复率 / %	
	PES 膜	改性 PES 膜
0.4% NaOH 冲洗 1 h	57.50	56.25
0.4% NaOH-0.1% NaClO 冲洗 1 h	71.35	86.46
0.4% NaOH 浸泡 24 h	90.00	83.33
0.4% NaOH-0.1% NaClO 浸泡 24 h	98.65	93.75

- 细胞增殖蛋白的分离和活性研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 715-718.
- [7] 杨璐璐, 池程, 秦非, 等. 鹿茸的化学成分及药理作用 [J]. 云南中医学院学报, 1995, 18(4): 19-23.
- [8] 周海滨, 郑祖根, 董启榕. 人胰岛素样生长因子-1 的真核表达及其生物学功能研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(1): 27-29.
- [9] Acerini C L, Patton C M, Savage M O, *et al.* Randomised placebo-controlled trial of human recombinant insulin-like growth factor I plus intensive insulin therapy in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus [J]. *Lancet*, 1997, 350(9086): 1199-1204.
- [10] 马艳芬, 彭绵, 陈澍. IGF-1 和胰岛素对成骨细胞功能影响的研究进展 [J]. 现代临床医学生物工程学杂志, 2003, 9(6): 528-531.
- [11] Rosen C J, Rackoff P J. Emerging anabolic treatments for osteoporosis [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2001, 27(1): 215-233.
- [12] 张大成. 鹿茸中胰岛素样生长因子-1 的提取及纯化研究 [D]. 天津: 天津大学, 2008.
- [13] 沈洁, 韩志峰, 郭立玮, 等. 超滤膜富集干姜挥发油的工艺优化研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1526-1530.
- [14] Dyer A R, Upton Z, Stone D, *et al.* Development and validation of a radioimmunoassay for fish insulin-like growth factor I (IGF-I) and the effect of aquaculture related stressors on circulating IGF-I levels [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2004, 135(3): 268-275.
- [15] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.