

# 甘油磷脂酰胆碱的分离纯化研究

周丽, 王兴国, 张康逸, 刘元法\*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 甘油磷脂酰胆碱(GPC)是磷脂酰胆碱(PC)分子上的两个脂肪酰基完全被水解掉的产物。为得到较纯的甘油磷酸胆碱,作者通过粉末磷脂水解获得 GPC 混合物,然后从 3 种离子交换树脂中筛选出 D113 树脂作为分离甘油磷酸胆碱的主要树脂,研究了其对甘油磷酸胆碱的吸附作用与解吸过程,解吸液通过特定的阴离子交换树脂的进一步纯化,所得产品经过 HPLC 分析, GPC 的干基质量分数为 97.11%。

**关键词:** 甘油磷酸胆碱;离子交换;分离

中图分类号:Q 545 文献标识码:A 文章编号:1673-1689(2012)01-067-04

## Separation and Purification of Glycerophosphocholine (GPC)

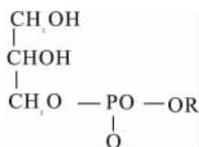
ZHOU Li, WANG Xing-guo, ZHANG Kang-yi, LIU Yuan-fa\*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu)

**Abstract:** Glycerophosphocholine (GPC) is obtained by completely deacylated from phosphocholine (PC). In order to obtain the more pure product, a process for separating glycerophosphocholine (GPC) from raw deacylated mixtures of crude soy lecithin is was developed in this manuscript. . Then three resins were selected and compared, of them, D113 is selected to more detailed study its adsorption and desorption process. The elution was then eluted on a strong basic resin in OH form. After concentration, the purity of GPC product is up to 97.11% on dry basis by HPLC analysis.

**Key words:** glycerophosphocholine (GPC), ion exchange, separation

甘油磷酸胆碱(GPC)是磷脂酰胆碱(PC)分子上的两个脂肪酰基完全被水解掉的产物,是一种重要的神经递质和磷脂前体,可用于医药行业,以改善老年人的认知能力和提高青少年的记忆力,其结构式如下:



其中,R 的结构式为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 。由于磷脂组成复杂,其水解产物的组成也十分的复杂,因而导致甘油磷酸胆碱(GPC)的分离比较困难。

20 世纪早期,国外出现了关于 GPC 的报道,但都不够详细,而国内则鲜有报道。目前所采用的方法主要有:冷却结晶法、有机溶剂萃取法、硅胶柱层析法、离子交换树脂法等。Christopher 等人<sup>[1,2]</sup>将含 GPC 的溶液去除水分后加入乙醇或其他适当的

收稿日期:2011-02-24

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划重点项目(2011BAD02B04)。

\*通信作者:刘元法(1974-),男,山东淄博人,工学博士,教授,主要从事油脂深加工研究。Email: yuanfa.liu@gmail.com

溶剂使其溶解,冷却使 GPC 结晶,脱溶后得产品。此结晶法对原料纯度要求较高,对实际生产没有太大意义。Brockerhoff 等人<sup>[3]</sup>以蛋黄卵磷脂为原料,溶解于乙醚中,四丁基氢氧化铵甲醇溶液作为催化剂,反应液用甲醇和乙醚依次洗涤。孙清瑞<sup>[4]</sup>等以大豆磷脂为原料,采用同样的方法制备出 GPC,该法产率虽高,但所得产品纯度较低。Reichling 等人<sup>[5]</sup>将粗磷脂的反应液通过硅胶柱,采用甲苯和甲醇混合溶剂作为洗脱剂,但所得产品中混有硅胶,且硅胶柱层析法成本较高,回收率较低,不利于大规模的生产。Song 等<sup>[6,7]</sup>先将 GPC 转化为锌盐从混合物中沉淀,去除锌盐后通过树脂纯化得到产品,然而该法回收率较低,且产生大量的废水。Tronconi 等人<sup>[8]</sup>采用离子交换树脂法从粗磷脂的水解产物中成功分离出 GPC,该方法所得产品纯度较高,并可以同时分离出副产品。几种方法进行比较,可以看出离子交换树脂法工艺简单,成本较低,可以应用于工艺生产,且副产品可以提高产品价值。作者以离子交换树脂为分离介质,采用柱层析法,有效的从大豆粉末磷脂分解产物中分离出高纯 GPC。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

层析柱 ( $D$  30 mm $\times$ 500 mm,  $D$  25 mm $\times$ 300 mm,  $D$  15 mm $\times$ 300 mm), HL-2 恒流泵:上海沪西分析仪器厂有限公司产品, RE-52 型旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂产品, Waters1525 高效液相色谱仪, 蒸发光检测器 (ELSD), 大豆粉末磷脂:天津市博帅工贸有限公司产品, 离子交换树脂 D001、D113、D318、001 $\times$ 4; 江苏苏青集团产品, 液相色谱用甲醇(色谱纯), 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 树脂的处理** 根据各树脂型号的不同, 先进行适当的处理, 抽滤去水后用无水甲醇浸泡。

**1.2.2 样品制备与处理** 称取大豆粉末磷脂 50 g 于 250 mL 的三颈烧瓶中, 加入 200 mL 甲醇, 于 55 $^{\circ}$ C 水浴中加热搅拌 1.5 h, 室温下过滤, 将滤液置于冰箱中冷冻静置过夜, 过滤出上清液。加入一定量的甲醇钠作为催化剂, 于 35 $^{\circ}$ C 无水条件下搅拌 1.5 h, 静置沉淀, 所得滤液作为过柱原液。

**1.2.3 静态吸附率和解吸率的测定** 准确称取经

预处理的树脂 2 g 于 150 mL 具塞三角瓶中, 加入 1.2.2 中的反应液 50 mL, 静态吸附 24 h 后, 测定溶液中 GPC 的含量。按下式计算树脂的吸附率<sup>[9]</sup>:

$$X = \frac{(c_0 - c_e)}{c_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $X$  为吸附率;  $c_0$  为吸附原液中 GPC 的质量浓度, mg/mL;  $c_e$  为吸附后溶液中 GPC 的质量浓度, mg/mL。

吸附率、解吸率和选择性是离子交换树脂分离时需要考虑的重要参数, 它不仅要求吸附树脂具有较高的吸附率, 同时还应该具有较高的解吸率和选择性。因此, 解吸率的测定是树脂试验的重要环节。取上述吸附后的树脂, 加入稀盐酸 50 mL 在恒温水浴中震荡 24 h, 过滤, 取滤液定容, 测定其中 GPC 的含量, 按下式计算解吸率:

$$B = \frac{c_1 \times V_1}{(c_0 - c_e) \times V} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $B$  为解吸率;  $c_1$  为解吸液中 GPC 的质量浓度, mg/mL;  $V_1$  为解析液的体积, mL;  $V$  为吸附液的体积, mL。

**1.2.4 装柱上样、洗脱和处理** 装柱过程: 离子交换树脂采用湿法装柱, 将 1.5 L 无水甲醇溶剂浸泡的离子交换树脂 D113 边搅拌边缓缓加入层析柱中, 待树脂沉积后, 用活塞密封柱子, 控制出口流速, 以同种溶剂冲洗柱子。上样过程: 将上面所得滤液以泵打入, 收集流出液, 取样分析, 即得吸附曲线。洗脱过程: 先用甲醇洗脱, 直至杂质完全去除; 然后用稀酸洗脱, 再依次从 D318、001 $\times$ 4 上洗脱下来。处理过程: 所得水溶液适量浓缩, 加入少量活性炭, 加热搅拌, 滤液减压蒸馏, 真空干燥, 采用高效液相色谱 (HPLC) 分析得其质量分数。

**1.2.5 分析方法** 高效液相色谱 (HPLC) 法。色谱条件为: 色谱柱 lichrospher ( $D$ 4.6 mm $\times$ 250 mm); 流动相, A: 甲醇, B:  $V$ (甲醇):  $V$ (水)=8:1; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 流量: 1 mL/min; 进样量: 5  $\mu$ L。

## 2 结果与分析

### 2.1 树脂筛选

根据文献<sup>[10]</sup>可知, GPC 无法与醇溶液中羧基型的弱酸阳离子交换树脂形成稳定的结合, 在洗脱过程中很容易与杂质一起洗脱下来, 无法达到分离的目的。而醇溶液中部分大孔型阳离子交换树脂

可以与 GPC 形成稳定的复合物。故从强酸型阳离子交换树脂、大孔型的强酸型及弱酸型阳离子交换树脂这 3 种类型的树脂中进行筛选。3 种常用的离子交换树脂对 GPC 的静态吸附情况见表 1。

表 1 3 种离子交换树脂对 GPC 的吸附率

Tab. 1 Adsorption effect of GPC by three kinds of resin

树脂种类	$c_0$ / (mg/mL)	$c_e$ / (mg/mL)	X/%
001×4	1.08	0.0108	98.98
D113	1.08	0.151	86.02
D001	1.08	0.313	71.02

用稀盐酸进行解吸,结果见表 2。

表 2 3 种树脂对 GPC 的解吸率

Tab. 2 Desorption rate of GPC in three kinds of resin

树脂种类	解吸率/%
001×4	31.0
D113	80.9
D001	66.2

由表 1 可知,3 种树脂的吸附率都很高,说明 3 种树脂均能与 GPC 醇溶液形成稳定的结合。但由表 3 可知,001×4 的解吸率较低,可能是磺酸基型的强阳离子交换树脂在长时间的吸附解吸过程引起了 GPC 中 P—O 键的断裂,GPC 发生了解离,导致 GPC 的产量下降。而 D001 和 D113 这两种大孔型阳离子交换树脂在吸附与解吸的过程中的作用均优于 001×4。综合考虑吸附率和解吸率,选择吸附率与解吸率均较高的 D113 树脂进行吸附研究。

## 2.2 D113 树脂吸附曲线

将甲醇钠反应液加入到装有 D113 树脂的层析柱中( $D$  30 mm×500 mm),在流量为 2~3 mL/min 条件下上柱,以 200 mL 为单位收集流出液,检测其中 GPC 的质量分数,绘制吸附曲线,如图 1 所示。

从图 1 中可以看出,随着流出液量的增加,流出液中 GPC 的含量也逐渐增加,在流出液达 1 600 mL 之前,流出液中均无 GPC,这说明 1 600 mL 反应液中的 GPC 完全被吸附,计算出 1.5 L 树脂能处理 1 600 mL 的反应液,即 500 g 大豆粉末磷脂。

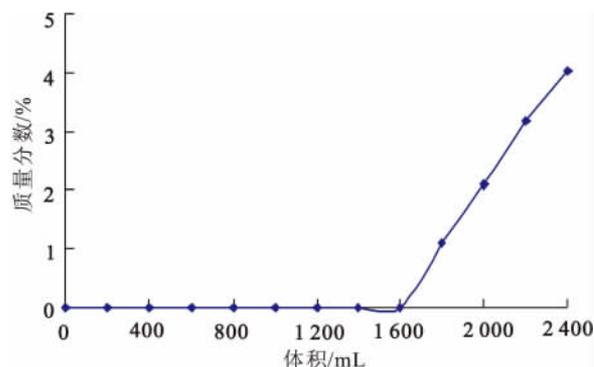


图 1 D113 树脂对 GPC 的吸附曲线

Fig. 1 The adsorption curve of GPC in D113 resin

## 2.3 洗脱、解吸及后续纯化过程的控制

无水甲醇做为洗脱剂的过程中,杂质含量逐渐减少,采用薄层层析色谱法进行快速检测是否完全去除。在流量为 2~3 mL/min 条件下上柱,以 200 mL 为单位收集流出液,检测其中 GPC 和杂质的含量,绘制出曲线,如图 2 所示。

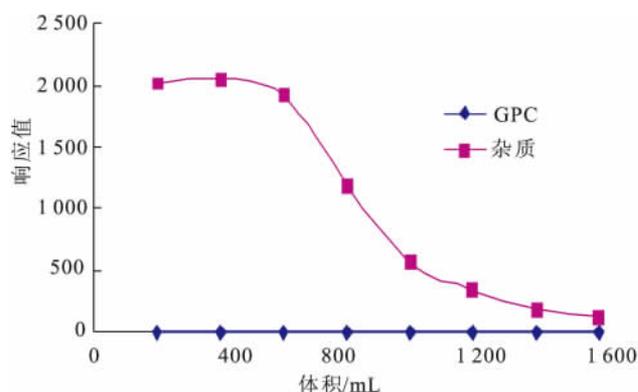


图 2 甲醇洗脱过程中 GPC 和杂质的响应值变化

Fig. 2 Response value of GPC and impurities during methanol washing progress

从图 2 中可以看出,GPC 在甲醇洗脱过程中仍然吸附在树脂上,而随着洗脱剂量的增加,流出液中杂质的含量逐渐减少,当甲醇洗脱剂的量达到 1 600 mL 时,杂质的含量已经很低,通过薄层层析色谱法检验,无明显斑点,即甲醇洗脱完全。

采用进行解吸,收集所有解吸溶液。稀酸可以将 GPC 完全解吸下来,但同时一些结合较强的阴离子(如胆碱、乙醇胺离子)也被解吸下来,导致解吸液中产品纯度的降低,后期仍然需要对解析液进行选择<sup>[11]</sup>。

将上述解吸液继续经过 D318 树脂的层析柱( $D$  25 mm×300 mm),其中阴离子(胆碱、乙醇胺、GPE

等)吸附在柱中,而 GPC 得到纯化,最后从  $001 \times 4$  树脂的层析柱( $D 15 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$ )中洗脱下来。所得水溶液适量浓缩,滤液减压浓缩,真空干燥,得高粘度无色透明的产品。

#### 2.4 GPC 的检测

对产品的各项指标进行检测,并与标准进行比较,如表 3 所示。

表 3 产品各项指标检测

Tab.3 Determined index of the production

检测项目	干基质量分数/%	水分/%	旋光度 [ $\alpha$ ] <sub>D<sup>20</sup></sub>	pH
标准要求	$\geq 96.09$	13.0~ 20.0	-2.0°~ -3.5°	4.0~6.5
检测结果	97.11	14.5	-2.8°	5.8

### 3 结语

以大豆粉末磷脂为原料,首先经甲醇钠催化脱酰反应,得到含有 GPC 的反应液,再经离子交换树脂法逐步纯化,可制备出干基质量分数为 97.11% 的产品。作者制备的产品已基本符合产品标准要求,可以为 GPC 的纯化工艺研究和工业化生产提供重要的参数。

### 参考文献(References):

- [1] Christopher T. Crystallization process for preparing glycerophosphocholine[P]. United States Patent; US5523450 (A), 1996-06-04.
- [2] Jaswinder Singh Chadha. Preparation of crystalline L- $\alpha$ -glycerophosphoryl-choline-cadmium chloride adduct from commercial egg lecithin[J]. **Chemistry and Physics of Lipids**, 1970, 1(1):104-108.
- [3] Brockerhoff, H. et al. Simplified Preparation of L- $\alpha$ -Glycerol Phosphorylcholine [J]. **Biochemistry and Cell Biology**, 1965, 43 (10):1777.
- [4] 孙清瑞,鹿保鑫. 化学催化法制备甘油磷酸胆碱的研究[J]. **油脂工程**, 2009, 11:56-58.  
SUN Qing-ru, LU Bao-xin. Preparation of Glycerophosphocholine (GPC) by Chemical Catalysis[J]. **Cereals and Oils Processing**, 2009, 11:56-58. (in Chinese)
- [5] Paul Reichling Dipl-Chemdr. Verfahren zur gewinnung von reinen natuerlichen cholinphosphorsaeurediglyceridestern[P]. Deutsches Patentamt; DE1543722 (A1), 1979-04-04.
- [6] Song, Yoon Seok, Song, Eun Seob. A Process for preparation of L-alpha-glycerophosphoryl choline [P]. World Intellectual Property Organization Patent; WO2007145476 (A1), 2007-12-21.
- [7] Tronconi Giovanni. Process for the Preparation of L-alpha-glycerolphosphorylcholine, L-alpha-glycerolphosphorylethanolamine from crude and/or deoleated lecithins[P]. European Patent; EP0217765 (A2), 1987-04-08.
- [8] Tronconi Giovanni. Process for separating the main components of a mixture of raw deacylated phospholipids [P]. World Intellectual Property Organization Patent; WO9115494 (A1), 1991-10-17.
- [9] 刘元法,汪燕,王兴国. 离子交换树脂分离磷脂酰胆碱的研究[J]. **中国油脂**, 2009, 33(5):58-60.  
LIU Yuan-fa, WANG Yan, WANG Xing-guo. Separation of soya phosphatidylcholine by ion exchange resin [J]. **China Oils and Fats**, 2009, 33 (5):58-60. (in Chinese)
- [10] Tronconi Giovanni. Process for the preparation of L-alpha-glycerolphosphoryl-choline and of L-alpha-glycerolphosphorylethanolamine [P]. United States Patent; US5250719 (A), 1993-10-05.
- [11] 曹栋,裘爱泳,王兴国. 乙醇对柱层析分离大豆磷脂中磷脂酰胆碱的影响[J]. **无锡轻工大学学报**, 2002, 21(3):302-304.  
CAO Dong, QIU Ai-yong, WAN Xin-guo. The effect of different concentration of ethanol on the isolation of phosphatidylcholine from soybean phospholipid by column chromatography[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2002, 21 (3):302-304. (in Chinese)