

DOI: 10.16085/j.issn.1000-6613.2020-2260

甘油磷酸胆碱的分析、制备及纯化研究进展

邹俊康^{1,2}, 鲍宗必^{1,2}, 杨启炜^{1,2}, 张治国^{1,2}, 任其龙^{1,2}, 杨亦文^{1,2}⁽¹⁾ 浙江大学化学工程与生物工程学院, 生物质化工教育部重点实验室, 浙江 杭州 310027;⁽²⁾ 浙江大学衢州研究院, 浙江 衢州 324000)

摘要: 甘油磷酸胆碱 (GPC) 作为重要神经递质乙酰胆碱的生物合成前体, 能够促进乙酰胆碱在脑部的合成, 增强人体的记忆力和认知能力, 预防老年痴呆类疾病, 已引起医药界的高度关注。为进一步促进 GPC 相关产品的研究与应用, 本文重点介绍了近几年 GPC 的分析、制备及纯化技术的研究进展, 并比较了不同方法的优缺点。指出高效液相色谱法 (HPLC) 是分析 GPC 的主流方法, 但没有一种检测器能检测到所有关键的杂质, 需要多种检测器联用才可判断 GPC 的质量是否达到要求。全化学合成和水解卵磷脂 (PC) 是制备 GPC 的主要方法。文中指出全化学合成法具有收率高、产品纯度高和制备工艺完善的优点, 但起始原料昂贵, 全化学合成的 GPC 中会残留基因毒性杂质, 严重影响产品品质。水解 PC 法能够制备出食品级 GPC, 所得产品无毒无害, 但水解法收率低, 产品纯度低, 纯化难度大, 难以规模化生产。结晶法和柱色谱法是纯化 GPC 粗品的主要方法。结晶法得到的产品纯度高, 但收率低, 生产成本低。柱色谱法能除去大量杂质, 除杂效果好, 但生产过程中会产生大量“三废”, 纯化周期长。文中分析表明, HPLC 和多种检测器联用是定量分析 GPC 及其相关杂质的最有效方法, 水解 PC 以制备食品级 GPC 是如今的研究热点, 开发出高效的纯化技术是工业化生产 GPC 的关键和难点。

关键词: 甘油磷酸胆碱; 化学分析; 合成; 制备; 纯化

中图分类号: TQ645.9

文献标志码: A

文章编号: 1000-6613 (2021) 11-6295-10

Advances in analysis, preparation and purification of glycerophosphocholine

ZOU Junkang^{1,2}, BAO Zongbi^{1,2}, YANG Qiwei^{1,2}, ZHANG Zhiguo^{1,2}, REN Qilong^{1,2},
YANG Yiwen^{1,2}

⁽¹⁾ Key Laboratory of Biomass Chemical Engineering of Ministry of Education, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China; ⁽²⁾ Institute of Zhejiang University—Quzhou, Quzhou 324000, Zhejiang, China)

Abstract: Glycerophosphocholine (GPC), as the biosynthetic precursor of the important neurotransmitter acetylcholine, can promote the synthesis of acetylcholine in the brain, enhance the human memory and cognitive ability, and prevent Alzheimer's disease. In order to further promote the research and application of GPC-related products, this article focuses on the research progress of its analysis, preparation and purification technology in recent years. The advantages and disadvantages of different methods were compared. High performance liquid chromatography (HPLC) is the mainstream method for

收稿日期: 2020-11-11; 修改稿日期: 2021-01-19。

基金项目: 国家自然科学基金 (21722609, 21776240, 218900764); 浙江大学衢州研究院科研基金 (IZQ2019-KJ-001)。

第一作者: 邹俊康 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药物的合成与纯化。E-mail: 21828084@zju.edu.cn。

通信作者: 杨亦文, 教授, 博士生导师, 研究方向为天然产物提取分离与分子结构修饰。E-mail: ceywyang@zju.edu.cn。

引用本文: 邹俊康, 鲍宗必, 杨启炜, 等. 甘油磷酸胆碱的分析、制备及纯化研究进展[J]. 化工进展, 2021, 40(11): 6295-6304.

Citation: ZOU Junkang, BAO Zongbi, YANG Qiwei, et al. Advances in analysis, preparation and purification of glycerophosphocholine[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2021, 40(11): 6295-6304.

analyzing GPC, but no detector can detect all key impurities alone. It requires a combination of multiple detectors to determine whether the quality of GPC meets the requirements. Full chemical synthesis and hydrolysis of lecithin (PC) are the main methods for preparing GPC. Full chemical synthesis has the advantages of high yield, high product purity and perfect preparation technology, but the starting materials are expensive, and even worse, some impurities in the fully chemically synthesized GPC are genotoxic and seriously affect quality. Hydrolysis of PC can prepare food-grade GPC, and the product is non-toxic and harmless, but the hydrolysis method has a low yield, low product purity, high purification difficulty, and difficulty in large-scale production. Crystallization and column chromatography are the main methods for purifying crude GPC products. The product obtained by crystallization has high purity, but low recovery and high production costs. Column chromatography can remove a large amount of impurities and has a good impurity removal effect, but a large amount of wastes will be produced during the process, and the purification cycle will be long. Analysis shows that the combination of HPLC and multiple detectors is the most effective method for the quantitative analysis of GPC and its related impurities. Hydrolysis of PC to prepare food-grade GPC is now a research hotspot. The development of efficient purification technology is the key point in industrial production of GPC.

Keywords: glycerophosphocholine; chemical analysis; synthesis; preparation; purification

甘油磷酰胆碱的全名为L- α -甘油磷酰胆碱(L- α -glycerylphosphorylcholine, GPC), 是人体内卵磷脂分子上的两条脂肪酸链水解后的产物^[1]。早在1945年Schmidt等^[2]便从牛的胰脏中提取出了GPC粗品, 第一次确认了GPC的结构。由于其结构特性, GPC有助于细胞膜磷脂的合成, 从而增强细胞膜的流动性, 同时还会对脂质代谢产生积极影响^[3]。

GPC能够穿过血脑屏障, 为神经递质乙酰胆碱的合成提供原料, 从而提高海马体中乙酰胆碱的水平, 有效地改善人体胆碱状态^[4], 并且通过增加神经细胞的形成、减少神经元的死亡来支持大脑和神经系统的功能^[5-6], 提升大脑认知能力^[7]。此外, GPC能提高基因的表达水平, 预防由衰老造成的认知功能下降^[8], 这也使得GPC在治疗阿尔兹海默症^[9-10]、健忘症^[11]、脑缺血型中风^[12]等精神性疾病上有明显的效果。Strifler等^[13]证实GPC是一种靶向线粒体的化合物, 能够减少啮齿动物体内自由基含量, 减轻缺血再灌注引起的损伤和炎症反应^[13,14], 具有改善心血管疾病的作用^[15]。Szabó等^[16]发现GPC能降低辐射诱导的形态学损伤和致死性, 显示出防辐射的作用。Izu等^[17]发现GPC与S-腺苷蛋氨酸同时使用能够降低糖尿病模型小鼠的血糖, 显示出治愈糖尿病的可能性。

GPC被认为是无毒且安全的化合物^[18], 不仅具备治愈各种疾病的潜力, 还被广泛应用于食品、保健品和化妆品等行业, 展现出良好的市场前景^[19]。

但是, 国内高纯度药用GPC几乎全部依赖进口。为进一步促进GPC相关产品的研究, 本文综述了最近几年来GPC的研究现状, 重点介绍了GPC的分析、制备和纯化技术的研究进展。

1 GPC的分析方法

早在1990年, 意大利就有GPC上市, 波兰、阿根廷、韩国、俄罗斯等国家也陆续上市了该药品。但在国内, GPC作为一种三类新药, 还没有上市。在研究GPC及其相关产品时, 建立全面的分析检测方法至关重要。赵艳艳^[20]采用核磁共振波谱(NMR)、质谱(MS)、红外光谱(IR)、紫外光谱(UV)等光谱学技术系统地测定了GPC的光谱学数据, 确定了GPC的结构及化学位移归属(图1)。这些传统方法能定性分析GPC的存在与否, 但无法准确检测出GPC的含量。分析检测得到GPC浓度和纯度对于探究其产品的质量更为重要, 因此, 下面将从薄层色谱法、核磁共振谱法、滴定法和液相色谱法来综述GPC的定量分析方法。

1.1 薄层色谱法

薄层色谱由于其操作简便、快速等特点, 通常

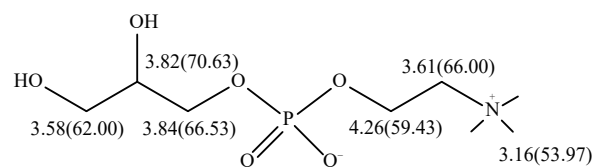


图1 GPC的化学结构及其化学位移归属^[20]

汞盐, 所得到的滴定突跃现象也更明显。滴定法测量精度高, 常用于提纯得到的 GPC 产品含量的测定, 但是其检测成本高、操作复杂, 样品中少量的酸性物质也会引起误差。

1.4 液相色谱法

在定量分析 GPC 含量时, 高效液相色谱法是最常用的一种方法。刘狄等^[29]采用高效液相色谱-蒸发光散射法 (HPLC-ELSD), 采用硅胶上键合 1,2-二羟基丙基官能团的 Diol 正相硅胶柱为分析柱, 甲醇-水为流动相, 检测了不同磷脂中 PC 和 GPC 的含量。但此方法的流动相中含有极性强的水, 长期使用会对 Diol 正相柱造成损害, 降低色谱柱的柱效, 对检测结果有影响。杜章斌等^[30]采用 Alltech Silica 色谱柱, 甲醇为流动相, 检测了 PC 水解液中的 GPC 含量, 此方法避免了极性强的水对色谱柱的伤害, 增强了实验结果的准确性。

Kielbowicz 等^[31]开发了一种高效液相色谱-电喷雾检测器 (HPLC-CAD) 的检测方法, 采用硅烷基配体官能化的球形硅胶作为固定相, 乙腈-甲醇-10mmol/L 乙酸铵溶液作为流动相, 此方法有效检测了 PC、LPC 和 GPC 的含量, 但 CAD 检测器的基线不平稳, 杂峰很多, 检测结果误差大。

为更准确检测 PC 水解产物中 GPC 及相关杂质的含量, 《美国药典 2019》^[26]采用液相-示差折光法 (LC-RID) 和 LC-ELSD 联用来检测提纯物中杂质的含量。LC-RID 是为了检测 GPC 提取物中甘油的含量, 色谱柱为 L14 柱 (10 μ m 硅胶化学键合强碱性季铵盐阴离子交换固定相), 流动相为乙腈-水, 测得甘油和 GPC 的相对保留时间分别为 0.6 和 1.0, 并且规定甘油含量小于 0.5% 为合格。LC-ELSD 法是为了检测 GPC 提取物中的其余有机杂质, 流动相按照以下方法配制, 并按照表 1 中的时间进行梯度洗脱, 可有效检测出 GPC 提取物中各有机杂质的含量。

为检测化学合成的 GPC 及相关杂质的含量, 傅超婷等^[32]采用二元梯度洗脱程序, 选取蒸发光散射检测器, 以甲酸铵的乙腈溶液作为流动相对 GPC 待测样品进行第一液相色谱检测, 用阳离子交换色谱柱, 检测出杂质甘油磷酸肌醇 (GPI)、氯化胆碱和甘油的含量; 以乙腈-水为流动相对 GPC 待测样品进行第二液相色谱检测, 用氨基键合硅胶色谱柱, 检测出杂质甘油磷酸乙醇胺 (GPE) 的含量。这种方法能全面有效地检测 GPC 样品中杂质的含量, 能够更好地控制 GPC 产品的质量。但此方法

表 1 流动相比例及其洗脱时间

时间/min	溶液 D 体积分数/%	溶液 E 体积分数/%
0	98	2
5	98	2
18	44	56
30	32	68
34	10	90
42	10	90
43	98	2
55	98	2

注: 溶液 A 为乙腈和甲醇的混合溶液, 乙腈、甲醇体积比 3 : 1; 溶液 B 为将 1.98g 乙酸铵溶于约 470mL 水中, 转移到 500mL 容量瓶中, 再用乙酸调节 pH 至 4.5, 最后用水稀释至容量瓶刻度; 溶液 C 为将 100mL 溶液 B 转移至 1000mL 容量瓶中, 并用水稀释至一定体积, 再测定溶液的 pH, 如果此时溶液 pH 不是 4.5, 则用稀氨水或稀乙酸调节溶液的 pH 为 4.5; 溶液 D 为 300mL 溶液 B 和 1700mL 溶液 A 混合; 溶液 E 为 700mL 溶液 C 和 1300mL 溶液 A 混合。

操作较为麻烦, 需要切换两次色谱柱和两次流动相。陈东英等^[33]利用极性硅胶柱作为色谱柱, 甲醇-乙腈-缓冲盐溶液为流动相, 采用示差折光检测器、蒸发光散射检测器或质谱检测器, 能很好地检测出磷脂、胆碱、氯化磷酸胆碱 (PC-Cl) 和 GPC 的含量, 并且各有关物质的分离度均大于 1.5, 峰形良好。液相色谱法是最常用的定量分析方法, 可测定反应液中 GPC 及其相关杂质的含量, 还可以测定提纯后得到的 GPC 产品的纯度。

目前国内没有 GPC 相关药物、保健品、食品和化妆品的生产, 只有生产 GPC 原料药的厂家, 所以国内没有对 GPC 的质量规定。国际市场上, 用于药品、食品和保健品中的 GPC 都是高纯度的 GPC, 其质量要求可参考美国药典。化妆品中添加的 GPC 暂时没有相关质量标准。

《美国药典》对 GPC 的质量要求如下: ①滴定法计算得到 GPC 质量分数在 98%~102% 之间; ②乙酸盐质量分数小于 0.1%, 氯化物质量分数小于 0.02%, 硫酸盐质量分数小于 0.02%, 磷酸盐质量分数小于 0.005%、甘油质量分数小于 0.5%。松醇、 β -GPC、蔗糖、丝氨酸、GPE 的质量分数都小于 0.1%; ③ 0.1g/mL 的 GPC 溶液的旋光度在 -2.4~-2.8 之间; ④细菌总数不超过 1000cfu/g, 霉菌和酵母菌的总数不超过 100cfu/g; ⑤ 8.5g/100mL 或 10g/100mL 的 GPC 溶液的 pH 在 5.0~7.0 之间; ⑥ GPC 固体水分含量小于 1.0%, GPC 水溶液的水

含量为14%~16%。

对各种分析方法的优缺点进行了比较分析，如表2所示。在反应过程中，可将薄层色谱法作为中控方法快速判断反应中是否有GPC生成；进行定量分析时，液相色谱法是最常用的方法，可测定反应液中GPC的浓度，从而计算反应收率。在分析提纯所得GPC产品的质量时，其含量可用高精度的滴定法来测定，其相关杂质的含量可用液相色谱法测定。但没有一种检测器能检测出GPC产品相关的全部杂质，对于缩水甘油、氯甘油这类有机杂质，需要RID检测器来检测；对于GPE、GPI这类杂质，需要ELSD检测器来检测。所以，多种检测器联用才能有效测定GPC中相关杂质的含量，进一步判断GPC的质量是否符合要求。

2 GPC的制备方法

GPC天然存在于生物物质中，所以早期是通过分离纯化技术从生物物质中提取GPC的。1945年Schmidt等^[2]便从牛的胰脏中萃取、纯化得到了GPC，并确定其结构由胆碱和α-甘油磷酸组成的。但是生物物质中GPC含量极低，直接提取非常困难，产量很低。目前制备GPC主要有水解磷脂类化合物和全化学合成两种方法。

2.1 水解磷脂类化合物

工业上采用水解法制备GPC的原料为大豆磷脂粉末或蛋黄粉，两者的主要成分都是PC，PC的sn-1脂肪酸酰基被水解得到sn-2-溶血磷脂酰胆碱（sn-2-LPC），再经过酰基自动转移得到sn-1-溶血磷脂酰胆碱（sn-1-LPC），最后水解掉剩余的脂肪酸酰基可得到GPC，其反应如图3。

2.1.1 化学催化水解法

水解PC常用的化学催化剂有金属钠、醇钠^[35-36]，化学催化水解的制备工艺简单，容易规模化生产，但GPC的收率很低。PC在离子交换树

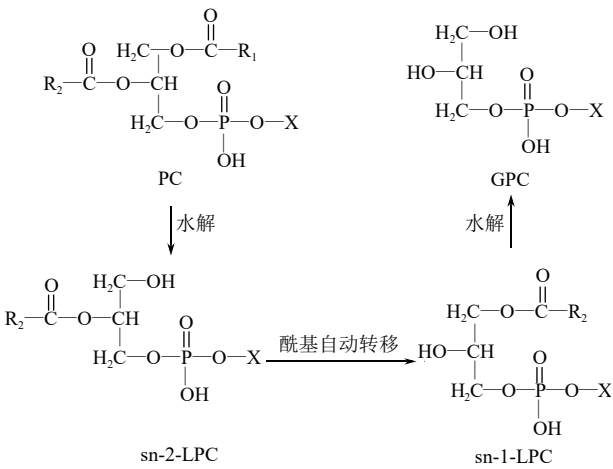


图3 PC水解的反应过程^[34]

脂^[37]的催化下醇解的效果较好，但离子交换树脂再生困难，并产生大量废水，不适合工业应用。为解决这些问题，Li等^[38]考察了12种低沸点胺类催化剂的催化效果，发现在叔丁胺的催化下，PC的转化率可达到98%以上，并且这类低沸点催化剂可以在旋蒸回收甲醇时被同步回收，可实现重复利用。

但是，这些化学催化剂毒性较大，最终得到的GPC产品中仍然会有少量残留，使得GPC产物的安全性存在问题。为了找到更好的催化剂，Li等^[39]采用400℃下煅烧的硅酸钠作为催化剂，在甲醇中催化PC的水解，PC最高转化率能达到99.5%。由于硅酸钠无毒，易于从人体排泄，所以可以作为生产GPC的良性催化剂。

2.1.2 生物酶水解法

与化学催化剂相比，生物酶的毒性更小，也更安全，具备用量少、催化效率高和易于回收等特点。此方法得到的GPC适合用于药物、食品和保健品等口服产品中，是PC水解反应中研究的热点。

Zhang等^[40]用磷脂酶A₁（PLA₁）作催化剂并加入辅助因子CaCl₂增强PLA₁的活性，GPC的产率能达到94.5%。为进一步提高产率，Zhang等^[41]继续

表2 不同分析方法的比较

分析方法	分析对象	优点	缺点	参考文献
薄层色谱法	水解PC	操作简便，分析速度快	软件对斑点面积的计算误差大，所测浓度不准	[21]
核磁共振谱法	水解PC	物质鉴定和含量分析同步完成，并可测对映体的光学纯度	核磁共振图谱峰形杂乱，所测定特征性质子峰的峰面积存在误差，变异系数大	[22-25]
滴定法	水解PC	结果准确	操作复杂，检测成本高	[26-28]
液相色谱法	水解PC和化学合成	结果准确，可分析多种杂质	操作复杂，需要多种检测器协同使用，检测器灵敏度有限	[26, 29-33]

用 Thermo4S-3 作为生物催化剂, 并用响应面优化得到最佳反应条件, 将 GPC 的最大产率提高到 96.8%。但是, 在水相体系中, PC 的溶解度非常有限, 导致 GPC 的生产效率很低, 难以在工业生产中应用。为解决上述问题, Lu 等^[34]使用 Tween 20 作为表面活性剂来改善 PC 在水相中的溶解度和分散性, 大大缩短了反应时间并提高了 GPC 的产量。

由于 PC 在双相介质中的溶解度比在水中大得多, Bang 等^[42]则考虑用双相介质来提高 PC 的溶解度, 以 PLA_1 为生物催化剂在水-己烷的双相介质中催化 PC 水解, 使得 GPC 的生产效率得到提高。但是, 此方法的反应时间为 30h, 反应进行过于缓慢, 不适用于工业生产。Kielbowicz 等^[31]研究发现, 碱性 pH 环境可以同时促进酰基迁移和水解过程, 为了进一步提高 PLA_1 的催化效率, Li 等^[43]成功开发一种简单的共沉淀方法将 PLA_1 封装在金属表面活性剂纳米复合材料 (MSNC) 中, 并利用碱性的 2-甲基咪唑 (2-Melm) 对这种材料进行改性, 得到催化活性增强的 2-Melm@ PLA_1 /MSNC 催化剂 (图 4)。这种复合材料具有碱性和两亲性, 能够使酰基转移和酶水解在水-己烷的双相体系中高效有序地进行, 并且具备良好的稳定性, 重复利用不会影响其活性。

为了使 GPC 的品质满足食品添加剂的要求, Kim 等^[44]将大豆卵磷脂置于食品级萃取溶剂正己烷-水的双相介质中, 选择 Novozym435 (诺维信脂

肪酶 435) 催化其水解, 过滤除去酶后所得滤液, 通过双相介质的简单相分离即可得到纯度为 98.6% 的食品级 GPC 水溶液。

2.2 全化学合成法

缩水甘油或氯甘油与磷酸胆碱的盐反应生成 GPC 的收率高 (达到 90% 以上), 反应工艺简单, 是目前工业上最主流的合成路线。Park 等^[19]以 *R*-缩水甘油为原料, 开发了两种合成 GPC 的反应路线。路线 1: *R*-缩水甘油先与苯甲醇进行开环反应, 后经乙酰化、氢化, 再与甲基苯磺酸胆碱和吡啶反应生成乙酰甘油磷酸胆碱, 最后脱去乙酰基即得 GPC。路线 2: *S*-缩水甘油与甲基苯磺酸胆碱直接磷酸化得 *S*-缩水甘油磷酸胆碱, 再经过开环反应即得 GPC。路线 2 是在路线 1 的基础上进行的改进, 反应路线更短, 操作更简单。

Song 等^[45]利用环氧开环的原理, 将 *R*-缩水甘油与 PC-Cl 在异丙胺的存在下进行亲核加成制备 GPC, 此方法制备工艺简单, 但反应收率偏低, 而且反应原料 *R*-缩水甘油极不稳定, 保存条件苛刻, 增加了生产成本。Lee 等^[46]在此基础上, 以 *R*-氯甘油为原料, 在低温条件下与 NaOH 的醇溶液反应生成 *R*-缩水甘油, 并立即将所制备的 *R*-缩水甘油与 PC-Cl 以 2:1 的物料比在 50~60℃ 下反应制备 GPC, 将反应收率提高到 70%~92%。Hwang 等^[47]利用此工艺路线, 将 450mmol PC-Cl 溶解于甲醇中, 依次加入 900mmol 的 KOH 和 900mmol 的 *R*-氯甘油, 用一

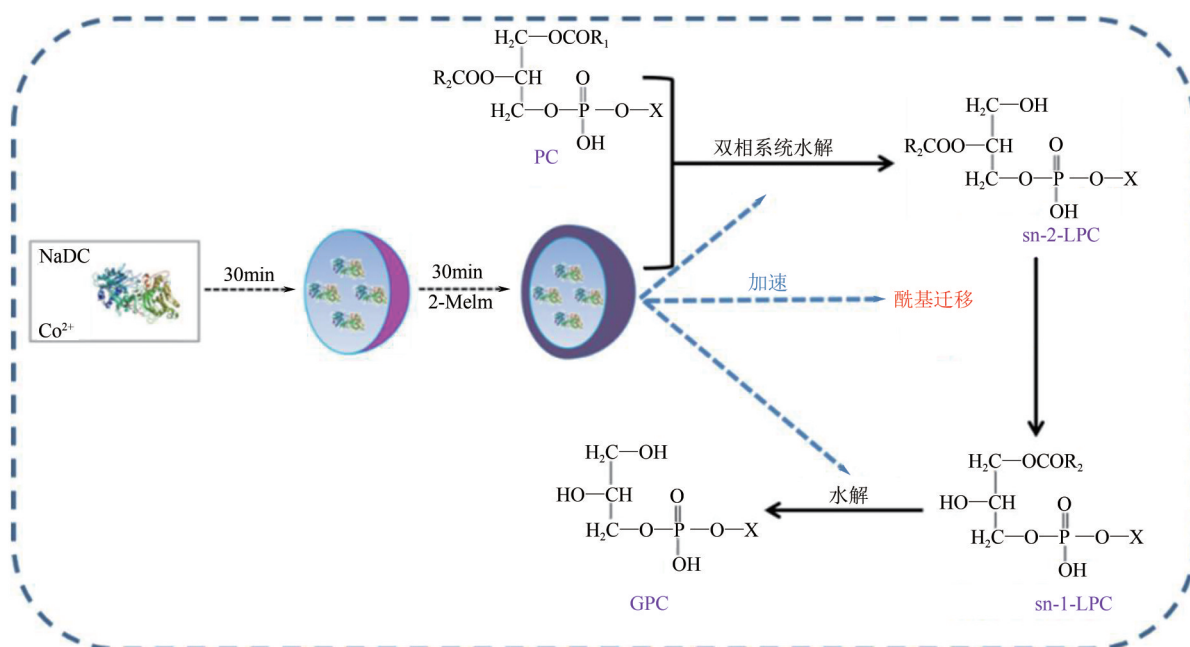


图 4 2-Melm@ PLA_1 /MSNCPC 的合成及催化过程^[42]

锅法制备出 GPC，反应最大收率达到 97%。此方法操作简单，中间产物少，适用于工业生产。PC-Cl 的价格较为昂贵，通常不作为工业生产的原料。刘振等^[48]则利用磷酸胆碱钙盐（PC-Ca）与碳酸钾水溶液反应制备磷酸胆碱钾盐（PC-K），将 PC-K 与 R-氯甘油反应制备 GPC 粗品，此方法也避免用到不稳定的 R-缩水甘油，原料的稳定性好且价格低，但是工艺操作比较复杂。尤家栋^[49]利用 R-氯甘油与 NaOH 在乙醇中低温制备 R-缩水甘油，过滤掉析出的盐后加入 PC-Cl 高温回流反应制备 GPC，也具备很高的收率。

对各种制备方法的优缺点进行了比较分析，如表 3 所示。全化学合成法制备 GPC 具备收率高、产品纯度高、制备工艺完善的优点；但起始原料昂贵，最终得到的 GPC 产品中也会残留一些基因毒性杂质，对产品的品质有严重影响。利用化学催化水解 PC 同样存在这些问题，化学催化剂是毒性物质会影响产品在食品和药物中的应用。生物酶通常无毒无害，用生物酶水解 PC 是制备食品级 GPC 最好的方法，但此方法收率低，产品纯度低，对除杂的要求很高，规模化生产难度大。

3 GPC 的纯化方法

目前，市场要求 GPC 产品的 RID 纯度达到 99.65%，旋光度在-2.4~-2.72，且单一杂质含量不能超过 0.1%。但是，化学制备法会产生磷酸胆碱盐、缩水甘油、氯甘油和甘油等杂质，水解法会产生甘油磷酸乙醇胺（GPE）、甘油磷酸丝氨酸（GPS）、甘油磷酸肌醇（GPI）等杂质。因此，GPC 的纯化一直是一个难点。目前常用的纯化方法就是溶剂萃取法、结晶法和柱色谱法。

对于化学法制备的 GPC 粗品，刘振等^[48]先用活性炭脱色，再用丙酮萃取除去其中的有机溶剂，最后用 D001 大孔强酸性树脂和 711 大孔强碱性树脂混床柱脱盐，可得到纯度为 99.8% 的 GPC 产物。丁建飞^[50]采用 GPC 在无水乙醇中结晶的方法除去 GPC 中的有机杂质，得到的 GPC 纯度能达到 99.5%。于振鹏等^[51]考察了醇类、酯类、酮类和乙腈的结晶除杂效果，所得 GPC 晶体的纯度都达到了 99.5% 以上。尤家栋^[52]将反应液用丙酮萃取，然后用阴离子交换树脂柱除去萃取液中的盐分，最后在无水乙醇中结晶得到精制 GPC。

对于水解 PC 得到的 GPC 粗品，周丽等^[53]采用 D113 吸附树脂，将 GPE 和盐类杂质除去，所得 GPC 纯度达到 97%。Bang 等^[42]先将滤液用乙醚萃取三次以除去游离脂肪酸（FFA），接着用硅胶柱除去残留的 FFA 和 PC-Cl，从而得到纯化的 GPC。Zhang 等^[54]使用 D001 阳离子和 D301-111 阴离子交换树脂柱色谱法成功地将 GPC 和 GPE 分开，得到的 GPC 纯度为 98.8%。王志强等^[55]将水解的 PC 反应液直接进行氧化铝柱层析，再用 D001 大孔离子交换树脂除去盐分，所得 GPC 纯度可达 99% 以上。

对各种纯化方法的优缺点进行了比较分析，如表 4 所示。在 GPC 的纯化中，目前最重要的还是结晶法和柱色谱法，结晶法收率低，操作较为复杂，可作为产品纯化的最终步骤；柱色谱法除杂效果好，但在除杂过程中会产生大量“三废”，纯化周期长，工业应用成本高。因此，开发适用于工业生产的除杂方法非常重要。

4 结语

人口老龄化是当今世界发展的一个重要趋势，

表 3 不同制备方法的比较

制备方法	原料	优点	缺点	参考文献
直接提取	动物组织	毒性小	提取难度大，产量极低	[2]
化学催化水解	化学催化剂、PC	收率高，制备工艺简单	毒性大，纯度低	[35-39]
生物酶水解	生物酶、PC	毒性小，反应快，收率高	纯度低，提纯难度大	[40-44]
全化学合成	缩水甘油和磷酸胆碱盐	收率高，纯度高，制备工艺完善	原料成本高，毒性高	[19, 45-49]

表 4 不同纯化方法的比较

纯化方法	所除杂质	优点	缺点	参考文献
溶剂萃取法	有机杂质	可除去大量有机杂质，效率高	需耗费大量有机溶剂	[42, 49, 54]
结晶法	微量的盐分和有机杂质	产品纯度高，制备工艺简单	产品损失大，工艺复杂	[51-52]
柱色谱法	盐分	除杂效果好	产生大量“三废”，成本高	[42, 54-55]

老年人的精神健康问题也是全世界研究的热点, GPC能提高海马体中的乙酰胆碱水平, 支持大脑和神经系统的功能, 预防衰老造成的认知功能的下降, 在中国这样的老龄化社会中具备良好的市场前景。

在目前的分析方法中, 液相色谱法是GPC的定量分析最常用的方法, 液相色谱配合多种检测器联用还能检测各杂质的含量。薄层色谱法可作为中控方法, 判断反应过程中是否有GPC的生成。核磁共振谱法可用于GPC的鉴定, 也可用于测定最终得到的GPC产品的光学纯度。滴定法测量精度高, 常用于最终得到的GPC产品含量的测定。

在目前的制备方法中, 全化学合成法制备GPC具备收率高、产品纯度高、制备工艺完善的优点; 但起始原料昂贵, 最终得到的GPC产品中也会残留一些基因毒性杂质, 对产品的品质有严重影响。利用化学催化水解PC同样存在这些问题, 这些化学催化剂同样是毒性物质, 也会影响产品在食品上的应用。生物酶通常无毒无害, 用生物酶水解PC是制备食品级GPC最好的方法, 但此方法收率低, 产品纯度低, 对除杂的要求很高, 规模化生产难度大。

在目前的纯化方法中, 最常用的还是结晶法和柱色谱法: 结晶法收率低, 操作也较为复杂, 可作为产品纯化的最终步骤; 柱色谱法除杂效果好, 但在除杂过程中会产生大量“三废”, 纯化周期长, 工业应用成本高。

在社会老龄化的背景下, GPC具有良好的市场前景。开发能规模化生产GPC的工艺路线, 适用于工业生产的除杂方法是其关键和难点。

参考文献

- [1] LEVILLAIN O, SCHMOLKE M, GUDER W. Influence of dehydration on glycerophosphorylcholine and choline distribution along the rat nephron[J]. *Pflügers Archiv*, 2001, 442(2): 218–222.
- [2] SCHMIDT G, HERSHMAN B, THANNHAUSER S J. The isolation of alpha-glycerolphosphorylcholine from incubated beef pancreas; its significance for the intermediary metabolism of lecithin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1945, 161: 523–536.
- [3] HARTMANN P, FET N, GARAB D, et al. L-alpha-glycerolphosphorylcholine reduces the microcirculatory dysfunction and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase type 4 induction after partial hepatic ischemia in rats[J]. *Journal of Surgical Research*, 2014, 189(1): 32–40.
- [4] BERNHARD W, POETS C F, FRANZ A R. Choline and choline-related nutrients in regular and preterm infant growth[J]. *European Journal of Nutrition*, 2019, 58(3): 931–945.
- [5] LOPEZ C M, GOVONI S, BATTAINI F, et al. Effect of a new cognition enhancer, alpha-glycerolphosphorylcholine, on scopolamine-induced amnesia and brain acetylcholine[J]. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 1991, 39(4): 835–840.
- [6] SCHETTINI G, VENTRA C, FLORIO T, et al. Molecular mechanisms mediating the effects of L-alpha-glycerolphosphorylcholine, a new cognition-enhancing drug, on behavioral and biochemical parameters in young and aged rats[J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1992, 43(1): 139–151.
- [7] LEE S H, CHOI B Y, KIM J H, et al. Late treatment with choline alfoscerate (L-alpha glycerolphosphorylcholine, alpha-GPC) increases hippocampal neurogenesis and provides protection against seizure-induced neuronal death and cognitive impairment[J]. *Brain Research*, 2017, 1654: 66–76.
- [8] NARUKAWA M, KAMIYOSHIHARA A, IZU H, et al. Efficacy of long-term feeding of alpha-glycerophosphocholine for aging-related phenomena in old mice[J]. *Gerontology*, 2020, 66(3): 275–285.
- [9] PARNETTI L, ABATE G, BARTORELLI L, et al. Multicentre study of L-alpha-glycerolphosphorylcholine vs ST200 among patients with probable senile dementia of Alzheimer's type[J]. *Drugs Aging*, 1993, 3(2): 159–164.
- [10] DE JESUS MORENO MORENO M. Cognitive improvement in mild to moderate Alzheimer's dementia after treatment with the acetylcholine precursor choline alfoscerate: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial[J]. *Clinical Therapeutics*, 2003, 25(1): 178–193.
- [11] CANAL N, FRANCESCHI M, ALBERONI M, et al. Effect of L-alpha-glycerolphosphorylcholine on amnesia caused by scopolamine[J]. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology*, 1991, 29(3): 103–107.
- [12] BARBAGALLO SANGIORGI G, BARBAGALLO M, GIORDANO M, et al. alpha-Glycerophosphocholine in the mental recovery of cerebral ischemic attacks. An Italian multicenter clinical trial[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1994, 717: 253–269.
- [13] STRIFLER G, TUBOLY E, GÖRBE A, et al. Targeting mitochondrial dysfunction with L-alpha glycerolphosphorylcholine[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166682.
- [14] TÓKÉS T, TUBOLY E, VARGA G, et al. Protective effects of L-alpha-glycerolphosphorylcholine on ischaemia-reperfusion-induced inflammatory reactions[J]. *European Journal of Nutrition*, 2015, 54(1): 109–118.
- [15] GUASCH-FERRÉ M, HU F B, RUIZ-CANELA M, et al. Plasma metabolites from choline pathway and risk of cardiovascular disease in the PREDIMED (prevention with Mediterranean diet) study[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2017, 6(11): e006524.
- [16] SZABÓ E R, PLANGÁR I, TÓKÉS T, et al. L-alpha glycerolphosphorylcholine as a potential radioprotective agent in zebrafish embryo model[J]. *Zebrafish*, 2016, 13(6): 481–488.
- [17] IZU H, OKUDA M, SHIBATA S, et al. Anti-diabetic effect of S-adenosylmethionine and alpha-glycerophosphocholine in KK-A^y mice[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2019, 83(4): 747–750.
- [18] BROWNAWELL A M, CARMINES E L, MONTESANO F. Safety assessment of AGPC as a food ingredient[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(6): 1303–1315.
- [19] PARK J M, DE CASTRO K A, AHN H S, et al. Facile syntheses of L-alpha-glycerophosphorylcholine[J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2010, 31(9): 2689–2691.
- [20] 赵艳艳. 甘油磷酸胆碱的分离纯化、结构表征及其质量研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012.
ZHAO Yanyan. Separation, purification, structure characterization and quality study of glycerophosphocholine[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2012.
- [21] 杜旭佳. 水滑石固体碱催化大豆磷脂酯交换反应制备甘油磷脂酰

- 胆碱的研究[D]. 西安: 西北大学, 2017.
- DU Xujia. Study on the preparation of glycerol phosphatidylcholine by hydrotalcite solid base catalyzed by soybean phospholipid transesterification reaction[D]. Xi'an: Northwest University, 2017.
- [22] BILLADELLO J J, GARD J K, ACKERMAN J J H, et al. Determination of intact-tissue glycerophosphorylcholine levels by quantitative ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy and correlation with spectrophotometric quantification[J]. *Analytical Biochemistry*, 1985, 144(1): 269-274.
- [23] 杜章斌, 滕英来, 汪勇, 等. 核磁共振氢谱法测定卵磷脂、溶血磷脂和甘油磷脂酰胆碱含量[J]. *中国油脂*, 2015, 40(3): 83-86.
- DU Zhangbin, TENG Yinglai, WANG Yong, et al. Determination of contents of phosphatidylcholine, lysophosphatide and glycerylphosphorylcholine by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *China Oils and Fats*, 2015, 40(3): 83-86.
- [24] 黎玲玲, 邹亚娟, 吴节莉, 等. ^{31}P 核磁共振内标法测定甘油磷酸胆碱的含量[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(11): 1933-1936.
- LI Lingling, ZOU Yajuan, WU Jieli, et al. Determination of glycerophosphocholine by ^{31}P qNMR[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2017, 37(11): 1933-1936.
- [25] DE FERRA L, MASSA A, DI MOLA A, et al. An effective method for the determination of the enantio-purity of L- α -glycerophosphocholine (L- α -GPC)[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 183: 113152.
- [26] The United States Pharmacopoeial Convention. The United States Pharmacopoeia: General Chapters[S]. 42th Edition Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2019: 9294.
- [27] 刘丹, 张康逸, 黄健花, 等. 非水电位滴定法测定甘油磷脂酰胆碱[J]. *中国油脂*, 2012, 37(3): 82-84.
- LIU Dan, ZHANG Kangyi, HUANG Jianhua, et al. Determination of glycerylphosphorylcholine with non-aqueous potentiometric titration[J]. *China Oils and Fats*, 2012, 37(3): 82-84.
- [28] 黄祥元, 唐伟, 蒋艾青. 甘油磷脂酰胆碱含量测定方法的改进[J]. *科技视界*, 2019(17): 165-166.
- HUANG Xiangyuan, TANG Wei, JIANG Aiqing. Improvement of the method for the determination of glycerophosphatidylcholine[J]. *Science & Technology Vision*, 2019(17): 165-166.
- [29] 刘狄, 刘明, 冯宝民, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定甘油磷脂酰胆碱[J]. *分析科学学报*, 2014, 30(3): 377-380.
- LIU Di, LIU Ming, FENG Baomin, et al. Determination of L- α -glycerol-phosphatidylcholine by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection[J]. *Journal of Analytical Science*, 2014, 30(3): 377-380.
- [30] 杜章斌, 滕英来, 汪勇, 等. HPLC-ELSD法测定酶解磷脂中甘油磷脂酰胆碱含量的研究[J]. *粮食与食品工业*, 2014, 21(6): 82-86.
- DU Zhangbin, TENG Yinglai, WANG Yong, et al. HPLC-ELSD method for determination of glycerylphosphorylcholine content in enzyme hydrolyze lecithin[J]. *Cereal & Food Industry*, 2014, 21(6): 82-86.
- [31] KIELBOWICZ G, SMUGA D, GLADKOWSKI W, et al. An LC method for the analysis of phosphatidylcholine hydrolysis products and its application to the monitoring of the acyl migration process[J]. *Talanta*, 2012, 94: 22-29.
- [32] 傅超婷, 云冲, 刘五生, 等. 甘油磷酸胆碱中杂质的检测方法: CN104458942A[P]. 2015-03-25.
- FU C T, YUN C, LIU W S, et al. Determination of impurities in glycerol phosphatidylcholine: CN104458942[P]. 2015-03-25.
- [33] 陈东英, 赵宏伟, 孙玲, 等. 一种 L- α -甘油磷脂酰胆碱有关物质的检测方法: CN110133119A[P]. 2019-08-16.
- CHEN D Y, ZHAO H W, SUN L, et al. A detection method for related substances of L- α -glycerophosphorylcholine: CN110133119[P]. 2019-08-16.
- 2019-08-16.
- [34] LU Y Y, ZHANG A L, WANG X, et al. Surfactant enhanced L- α -glycerylphosphorylcholine production from phosphatidylcholine using phospholipase A1 in the aqueous phase[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2019, 37(5): 361-366.
- [35] TRONCONI G. Process for the preparation of L- α -glycerylphosphorylcholine and of L- α -glycerylphosphorylethanolamine: US5250719[P]. 1993-10-05.
- [36] 孙清瑞, 鹿保鑫, 刘志明, 等. 化学催化法制备甘油磷酸胆碱的研究[J]. *粮油加工*, 2009(11): 56-58.
- SUN Qingrui, LU Baoxin, LIU Zhiming, et al. Preparation of glycerophosphocholine by chemical catalytic method[J]. *Cereals and Oils Processing*, 2009(11): 56-58.
- [37] GIOVANNI T. Process for separating the main components of a mixture of raw deacylated phospholipids: WO199115494[P]. 1991-10-17.
- [38] LI H Y, ZHANG X L, BAI W L, et al. Study on the preparation of L- α -glycerophosphocholine catalyzed by low boiling point organic amines[J]. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 2013, 108(2): 305-316.
- [39] LI B, LI H Y, ZHANG X L, et al. Calcined sodium silicate as an efficient and benign heterogeneous catalyst for the transesterification of natural lecithin to L- α -glycerophosphocholine[J]. *Green Processing and Synthesis*, 2019, 8(1): 78-84.
- [40] ZHANG K Y, LIU Y F, WANG X G. Enzymatic preparation of L- α -glycerylphosphorylcholine in an aqueous medium[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2012, 114(11): 1254-1260.
- [41] ZHANG K Y, WANG X G, LIU Y F. Aqueous medium enzymatic preparation of L- α -glycerylphosphorylcholine optimized by response surface methodology[J]. *European Food Research and Technology*, 2012, 234(3): 485-491.
- [42] BANG H J, KIM I H, KIM B H. Phospholipase A1-catalyzed hydrolysis of soy phosphatidylcholine to prepare L- α -glycerylphosphorylcholine in organic-aqueous media[J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 201-206.
- [43] LI H, CAO X, LU Y Y, et al. Alkaline modification of a metal-enzyme-surfactant nanocomposite to enhance the production of L- α -glycerylphosphorylcholine[J]. *Catalysts*, 2019, 9(3): 237.
- [44] KIM J, SONG Y, LEE S J, et al. Enzymatic preparation of food-grade L- α -glycerylphosphorylcholine from soy phosphatidylcholine or fractionated soy lecithin[J]. *Biotechnology Progress*, 2020, 36(1): e2910.
- [45] SONG Y S, SONG E S, KANG D S, et al. A process for preparation of L- α -glycerylphosphorylcholine: WO2007145476[P]. 2007-12-21.
- [46] LEE B S, PARK S J, KWON D W, et al. Pharmaceutical formulation containing choline alfoscerate: US9339511[P]. 2016-05-17.
- [47] HWANG S O, YUN D M. Method for preparation racemic or optically active α -glycerophosphorylcholine: WO2015119438[P]. 2015-08-13.
- [48] 刘振, 杨海龙. 一种制备甘油磷脂酰胆碱的工艺方法及其制得的甘油磷脂酰胆碱: CN 110028524[P]. 2019-07-19.
- LIU Z, YANG H L. A process for preparing glycerol phosphatidylcholine and the prepared glycerol phosphatidylcholine: CN110028524[P]. 2019-07-19.
- [49] 尤家栋. L- α -甘油磷酸胆碱的制备方法: CN109265477[P]. 2019-01-25.
- YOU J D. Preparation method of L- α -glycerophosphocholine: CN109265477[P]. 2019-01-25.
- [50] 丁建飞. 液体甘油磷脂酰胆碱的结晶方法: CN104193778[P]. 2014-12-10.
- DING J F. Crystallization method of liquid glycerol phosphatidylcholine: CN104193778[P]. 2014-12-10.
- [51] 于振鹏, 张东亚, 王凯. L- α -甘油磷酸胆碱的纯化方法:

- CN106432326[P]. 2017-02-22.
- YU Z P, ZHANG D Y, WANG K. Purification method of L- α -glycerophosphocholine: CN106432326[P]. 2017-02-22.
- [52] 尤家栋. 一种分离纯化粗产品 L- α -甘油磷酸胆碱的方法: CN109456359[P]. 2019-3-12.
- YOU J D. A method for separating and purifying crude product L- α -glycerophosphocholine: CN109456359[P]. 2019-3-12.
- [53] 周丽, 王兴国, 张康逸, 等. 柱色谱法分离甘油磷脂酰胆碱的研究[J]. 中国油脂, 2012, 37(2): 35-37.
- ZHOU L, WANG X G, ZHANG K Y, et al. Separation of glycerol phosphatidylcholine by column chromatography[J]. China Oils and Fats, 2012, 37(2): 35-37.
- [54] ZHANG K, WANG X, LIU Y. Purification of L- α -glycerylphosphorylcholine from the enzyme reaction solutions by resin column chromatography[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2012, 89(6): 1155-1163.
- [55] 王志强, 王继文, 李津, 等. 一种制备高纯天然 L- α -甘油磷脂酰胆碱的方法: CN105017307[P]. 2015-11-04.
- WANG Z Q, WANG J W, LI J, et al. A method for preparing high-purity natural L- α -glycerol phosphatidylcholine: CN105017307[P]. 2015-11-04.