



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102093410 B

(45) 授权公告日 2015.04.22

(21) 申请号 201110004065.X

脂酰胆碱的研究》.《中国油脂》.2007,第32卷
(第11期),55-58.

(22) 申请日 2011.01.11

审查员 常晓屿

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800号

(72) 发明人 刘元法 张康逸 王兴国 钱祥云
周丽 宋志华

(51) Int. Cl.

C07F 9/09(2006.01)

C12P 13/00(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2007145476 A1, 2007.12.21, 全文.

CN 1154700 A, 1997.07.16, 全文.

钱峰等.《非水介质中磷脂酶A1催化水解磷

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

一种用硅胶柱层析法分离纯化甘油磷酸胆碱的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用硅胶层析柱法分离纯化甘油磷酸胆碱(L- α -GPC)的方法,属于脂质开发应用技术领域。包括如下步骤:酶解反应液为原料,先用离子交换树脂除去Ca²⁺和Cl⁻,然后将水相转化成醇相,通过硅胶层析柱将L- α -GPC和GPE、LPC及其它副产物分开,活性炭脱色,真空浓缩除水,得到无色、透明的产品;醇解反应液为原料,直接过硅胶柱分离,阳离子交换树脂除Na⁺,活性炭脱色,真空浓缩除水,得到产品。产品的指标检测:化学纯度99.6%,光学纯度ee:99%,mp142-143°C,【 α 】_D²⁰ = -2.6°(C = 2.6, H₂O含量16%, pH = 5.8)。本发明为分离纯化L- α -GPC提供了一种新的思路和方法,也增加了硅胶柱层析分离纯化方法在脂质科学中的应用。

1. 一种硅胶柱层析法分离纯化甘油磷脂酰胆碱 (L- α -GPC) 的方法, 其特征在于, 包括如下工艺步骤:

(1) 纯化酶解反应液: 将粉末磷脂加到蒸馏水中, 形成乳化态磷脂水溶液, 均质, 添加 CaCl_2 和磷脂酶 A_1 , 水浴加热, 反应一段时间, 然后离心、过滤, 得到澄清的酶反应液; 阳离子交换树脂去除 Ca^{2+} , 流速 $0.5 \sim 4\text{mL}/\text{min}$, 柱下收集液中不能检测到 Ca^{2+} , 吸附饱和后再生, 再生次数大于 10 次; 阴离子交换树脂去除 Cl^- , 流速 $0.5 \sim 4\text{mL}/\text{min}$, 柱下收集液中不能检测到 Cl^- , 吸附饱和后再生, 再生次数大于 10 次, $45 \sim 75^\circ\text{C}$, 旋转蒸发去水, 溶于低碳链醇, 转化成醇相; 称量一定量的硅胶, 溶于醇, 搅拌均匀浆、过夜、装柱、压实、上样, $0\% \sim 100\%$ 低碳链醇水溶液 ($v : v$, 醇 : 水) 进行洗脱, 流速 $0.5 \sim 4\text{mL}/\text{min}$, 每 $10 \sim 60\text{mL}$ 馏分进行收集, HPLC-ELSD 检测每份馏分, 合并 L- α -GPC 的馏分; 在 $50 \sim 90^\circ\text{C}$, 活性炭脱色, 得到澄清的水溶液, $45 \sim 75^\circ\text{C}$, 减压下蒸干溶剂, 得到产品, 低碳链醇进行回收, 重复使用; 硅胶回收, 烘箱中, $100 \sim 150^\circ\text{C}$ 、时间 $2 \sim 8\text{h}$, 硅胶可再生次数大于 10;

(2) 纯化醇解反应液: 将粉末磷脂溶于甲醇中, 室温、添加甲醇钠、磁力搅拌、反应一段时间, 然后低温结晶、分液、抽滤, 得到 L- α -GPC 醇溶液; 称量硅胶, 溶于甲醇, 搅拌均匀浆、过夜、装柱、压实、上样, 用 $0\% \sim 100\%$ 低碳链醇水溶液 ($v : v$, 醇 : 水) 进行洗脱, 流速 $0.5 \sim 4\text{mL}/\text{min}$, 每 $10 \sim 60\text{mL}$ 馏分进行收集, HPLC-ELSD 检测每份馏分, 合并 L- α -GPC 的馏分; 过阳离子交换树脂柱去除 Na^+ , 柱下收集液中不能检测到 Na^+ , 流速 $0.5 \sim 4\text{mL}/\text{min}$, 吸附饱和后再生, 再生次数大于 10 次; $50 \sim 90^\circ\text{C}$, 活性炭脱色, 得到澄清的水溶液, $45 \sim 75^\circ\text{C}$, 减压下蒸干溶剂, 得到产品, 低碳链醇进行回收, 重复使用; 硅胶回收, 烘箱中, $100 \sim 150^\circ\text{C}$ 、时间 $2 \sim 8\text{h}$, 硅胶可再生次数大于 10。

2. 如权利要求 1 中 (1) 或 (2) 所述的硅胶柱层析分离纯化甘油磷脂酰胆碱的方法, 其特征在于: 所述上样量的计算以反应液中 L- α -GPC 的量计, $1 : 20 \sim 1 : 100$ (g/g, L- α -GPC : 硅胶)。

3. 如权利要求 1 中 (1) 或 (2) 所述的硅胶柱层析分离纯化甘油磷脂酰胆碱的方法, 其特征在于: 所述馏分收集体积的计算以反应液中 L- α -GPC 的量计, $1 : 1 \sim 1 : 50$ (g/mL, L- α -GPC : 馏分)。

4. 如权利要求 1 中 (1) 或 (2) 所述的硅胶柱层析分离纯化甘油磷脂酰胆碱的方法, 其特征在于: 所述醇溶液洗脱时所用的低碳链醇为甲醇、乙醇、丙醇、正丁醇、异丁醇、戊醇、己醇、戊醇或己醇的异构体。

5. 如权利要求 1 中 (1) 所述的硅胶柱层析分离纯化甘油磷脂酰胆碱的方法, 其特征在于: 所述去除 Ca^{2+} 的阳离子交换树脂为强酸性、弱酸性、大孔吸附性阳离子树脂的 Na 型和 H 型。

6. 如权利要求 1 中 (1) 所述的硅胶柱层析分离纯化甘油磷脂酰胆碱的方法, 其特征在于: 所述去除 Cl^- 的阴离子交换树脂为强碱性、弱碱性、大孔吸附性阴离子树脂的 OH 型。

7. 如权利要求 1 中 (2) 所述的硅胶柱层析分离纯化甘油磷脂酰胆碱的方法, 其特征在于: 所述去除 Na^+ 的阳离子交换树脂为强酸性、弱酸性、大孔吸附性阳离子树脂的 H 型。

8. 如权利要求 1 中 (1) 或 (2) 所述的硅胶柱层析分离纯化甘油磷脂酰胆碱的方法, 其特征在于: 所述脱色剂为活性炭、凹凸棒土中的一种或两种。

一种用硅胶柱层析法分离纯化甘油磷酸胆碱的方法

技术领域

[0001] 一种用硅胶柱层析法分离纯化甘油磷酸胆碱的方法,涉及到药物化学和分离纯化技术领域。

背景技术

[0002] 甘油磷脂胆碱(L- α -Glycerophosphorylcholine, L- α -GPC)为体内天然存在的水溶性磷脂代谢产物,以及乙酰胆碱和磷脂酰胆碱合成的胆碱源,它的原子结构示意图如图1所示。

[0003] L- α -GPC具有重要的医学应用价值,能够提高脑部认知能力,甚至可以修复早期老年失智症患者已部分损伤的认知能力,能够保护肝组织免受有毒的四氯化碳和高脂蛋白类食品所产生的脂肪酸渗透,具有抗高血脂、保护血管的作用,在青少年身体成长、提高记忆力等方面都具有一定的功效。

[0004] 目前,国内外学者分离纯化L- α -GPC的方法主要有溶剂萃取法、沉淀法、重结晶法、树脂柱色谱法等。最早的纯化方法是萃取法,直接从牛胰脏中萃取纯化得到L- α -GPC(GSchmidt, J. Biochem, 1945, 161, 523),随后出现了沉淀法、重结晶法、树脂柱色谱法,但他们在纯度、旋光度、工业化方面都面临着不同程度的问题。1954年,美国专利No. 2864848发明了汞盐沉淀纯化技术,主要过程是以汞盐的形式沉淀副产物,过量的汞离子通过 H_2S 和 $BaCO_3$ 除去,这种方法的劣势在于不能完全将汞离子除去,还残留了部分未反应的卵磷脂,需要用钙盐和树脂进行二次纯化,这样增加了过程的复杂性,得率下降,工业化的困难;Brockerhoff和Yukowski的重结晶法也面临着去除催化剂的问题;为了解决金属离子残留和纯度的问题,Myriam Gozzoli和Cailo Scolastico发明了树脂纯化分离方法,先醇解反应,后溶剂萃取、再离子交换树脂吸附解析,活性炭脱色,这种方法却面临着大量使用有毒的氯仿,产品的旋光性解决困难的问题。对于经典的硅胶柱层析法应用在L- α -GPC方面的研究未见有报道,这种方法已经被成功应用于磷脂领域,如从粉末磷脂中提取高纯PE、PE和PI的研究。

[0005] 本发明提供一种硅胶层析柱法分离纯化L- α -GPC的方法,解决了纯化过程中面临的过程繁琐、有毒离子残留、纯度不够、旋光度不够、大量伴随物存在的难题。硅胶柱层析分离纯化的方法,具有纯化工艺简单、洗脱剂和硅胶均可以重复利用,以及产品的纯度高、成本低等方面的优点,是一种方便、经济、环保、可实现商业化规模的纯化分离方法,目前未见国内外关于此方面的文章报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种简单、可行、合理、适合工业化的L- α -GPC纯化分离新工艺,达到降低成本和提高经济效益的目的。以大豆粉末磷脂的磷脂酶 A_1 水解的酶解液和甲醇钠的醇解液为原料,采用本方法对药物制剂L- α -GPC进行纯化,可以保证产品的旋光性、纯度、回收率,以及一次性将反应液中主要成分全部进行分离。

[0007] 技术方案：该方法用大豆粉末磷脂为原料，酶解所用的酶为磷脂酶 A₁，醇解所用的催化剂为甲醇钠，通过酶水解和醇解两种工艺路线制备反应液，然后再用硅胶层析柱法进行纯化。对于酶反应液，先用离子交换树脂除去 Ca²⁺和 Cl⁻，然后将水相转化成醇相，通过硅胶层析柱将 L-α-GPC 和 GPE、LPC 及其它副产物分开，活性炭脱色，真空浓缩除水，得到无色、透明的产品；对于醇解反应液，直接过硅胶柱分离，阳离子交换树脂除 Na⁺，活性炭脱色，真空浓缩除水，得到产品。

[0008] 主要步骤包括：

[0009] (1) 酶解反应液：将粉末磷脂加到蒸馏水中，形成乳化态磷脂水溶液，均质，添加 CaCl₂和磷脂酶 A₁，水浴加热，反应一段时间，然后离心、过滤，得到澄清的酶反应液。

[0010] (2) 醇解反应液：将粉末磷脂溶于甲醇中，室温、添加甲醇钠、磁力搅拌、反应一段时间，然后低温结晶、分液、抽滤，得到 L-α-GPC 醇溶液。

[0011] (3) 树脂吸附：酶反应液，用阳离子树脂去除 Ca²⁺，阴离子树脂去除 Cl⁻；醇解反应液，用阳离子树脂去除 Na⁺。

[0012] (4) 硅胶纯化：工业硅胶活化，称量硅胶、装柱，反应液上柱，醇溶液洗脱，自动收集器收集，HPLC-ELSD 进行监控，最后得到纯度比较高的 L-α-GPC 和 GPE。

[0013] (5) 脱色：用活性炭去除 L-α-GPC 溶液中的色素物质，使最终产品保持无色、透明状态。

[0014] 本方法中硅胶纯化的步骤，硅胶称量、搅拌均匀浆、装柱、压实、上样、过柱和收集、检测、产品处理。硅胶称量，可称、可量，干硅胶的密度大约 0.4g/mL；上样，以硅胶重量计，1：50(g/g, L-α-GPC：硅胶)；收集馏分的体积，以上样量计，1：10(g/mL, L-α-GPC：馏分体积)；收集馏分，用 HPLC-ELSD 检测，检测 GPC, GPE 和杂质，将同一类馏分合并。

[0015] 本发明利用硅胶层析柱法分离纯化大豆粉末磷脂的酶解反应液和醇解反应液制备 L-α-GPC 的方法，属于开创性的研究。

附图说明

[0016] 图 1 L-α-GPC 的结构示意图

[0017] 其中：●表示 H，●表示 C，●表示 P，●表示 O，●表示 N。

[0018] 图 2 粉末磷脂原料的 HPLC-ELSD 色谱图。

[0019] 从图 2 可以看到粉末磷脂中有很多成分，PC、PE、PI、LPC 等，PC 保留时间 6.073，外标法定量 PC 的纯度 20.3%。

[0020] 图 3 粉末磷脂反应后的酶反应液 HPLC-ELSD 色谱图。

[0021] 从图 3 可以看到，粉末磷脂经过酶解反应后，色谱图中的 PC 几乎消失，保留时间在 4.517、12.013 处有大量的 GPE 和 GPC 生成。

[0022] 图 4 硅胶分离 L-α-GPC、GPE 和杂质的色谱图。

[0023] 从图 4 可以看出硅胶柱层析法能很好的将 L-α-GPC、GPE 和杂质分离开。

[0024] 图 5 硅胶层析柱装备图。

[0025] 从图 5 可以看到，整个纯化过程包含上样、过柱、收集三个部分。

具体实施方式

[0026] 下面通过实施例对本发明作进一步说明。应该理解的是,本发明实施例所述的制备方法仅仅是用于说明本发明,而不是对本发明的限制,在本发明的构思前提下对本发明制备方法的简单改进都属于本发明要求保护的范围。

[0027] 实施例 1

[0028] 所用反应液为粉末磷脂酶解反应制备。

[0029] 磷脂酶 A₁水解反应:50g 粉末磷脂,1000mL 去离子水,加入三孔烧瓶中,在 35℃ 水浴加热,300r/min 机械搅拌,均质 30min,添加 CaCl₂2g,均质,添加酶 5mL,反应 3h,将酶反应液离心、抽滤,得到纯净的酶解反应液;过 001X7 强阳离子交换树脂柱(交换容量 1800mmol/L)去除 Ca²⁺,过 D311 大孔型丙烯酸系弱碱阴离子交换树脂柱(2200mmol/L)去除 Cl⁻,离子交换树脂可再生;60℃,减压下,蒸干,溶于乙醇。

[0030] HPLC-ELSD 检测反应液,外标定量 L-α-GPC 2.97g,得率 90.1%,称量 148.5g 硅胶,溶于乙醇,搅拌均匀浆、过夜、装柱、压实、上样、用一定比例的乙醇水溶液(1:9, v:v)进行洗脱,流速 2mL/min,每 30mL 馏分收集,HPLC-ELSD 检测每份馏分,同类馏分进行合并,通过硅胶柱将 L-α-GPC 和 GPE、LPC、及其它副产物分开,硅胶回收,烘箱中,120℃、时间 3h,进行硅胶再生;L-α-GPC 的馏分,60℃活性炭脱色、抽滤,0℃减压下蒸干,得到无色、透明的 2.33g 产品,总得率 78.4%,蒸出的溶剂进行乙醇回收。薄层检测有少量斑点(符合美国行业标准),化学纯度 99.6%,光学纯度 ee:99%,mp142-143℃, $[\alpha]_D^{20} = -2.6^\circ$ (C = 2.6, H₂O16%, pH = 5.8)。

[0031] 实施例 2

[0032] 所用反应液为粉末磷脂醇解反应液。

[0033] 粉末磷脂醇解反应:50g 粉末磷脂溶于 250mL 甲醇中,室温、磁力搅拌、均质 30min,添加甲醇钠 5mL,反应 1h,得到醇解反应液,进行离心、抽滤,得到纯净的醇解反应液。

[0034] HPLC-ELSD 检测反应液,外标定量 L-α-GPC 2.90g,得率 88.2%,称量 145g 硅胶,溶于甲醇,搅拌均匀浆、过夜、装柱、压实、上样、用一定比例的甲醇水溶液(1:9, v:v)进行洗脱,流速 2mL/min,每 30mL 馏分进行收集,HPLC-ELSD 检测每份馏分,同类馏分合并,硅胶柱将 L-α-GPC 和 GPE、LPC、其它副产物分开,硅胶回收,烘箱中,120℃、时间 3h,进行硅胶再生;L-α-GPC 的馏分通过 001X7 强阳离子交换树脂(交换容量 1800mmol/L)去除 Na⁺,柱下馏分不能检测到 Na⁺,吸附饱和后进行再生,60℃,凹凸棒土脱色,得到澄清水溶液,减压下蒸干溶剂,得到无色、透明的 2.26g 产品,蒸出的溶剂进行甲醇回收,重复使用,总得率 77.9%。薄层检测有少量斑点(符合美国行业标准),化学纯度 98.8%,光学纯度 ee:99%,mp142-143℃, $[\alpha]_D^{20} = -2.8^\circ$ (C = 2.6, H₂O16%, pH = 5.8)。

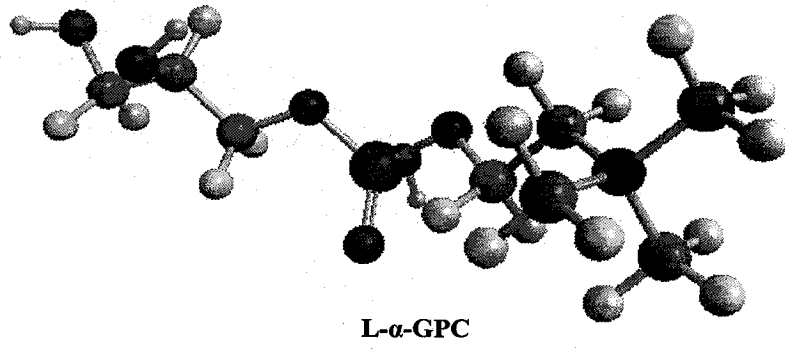


图 1

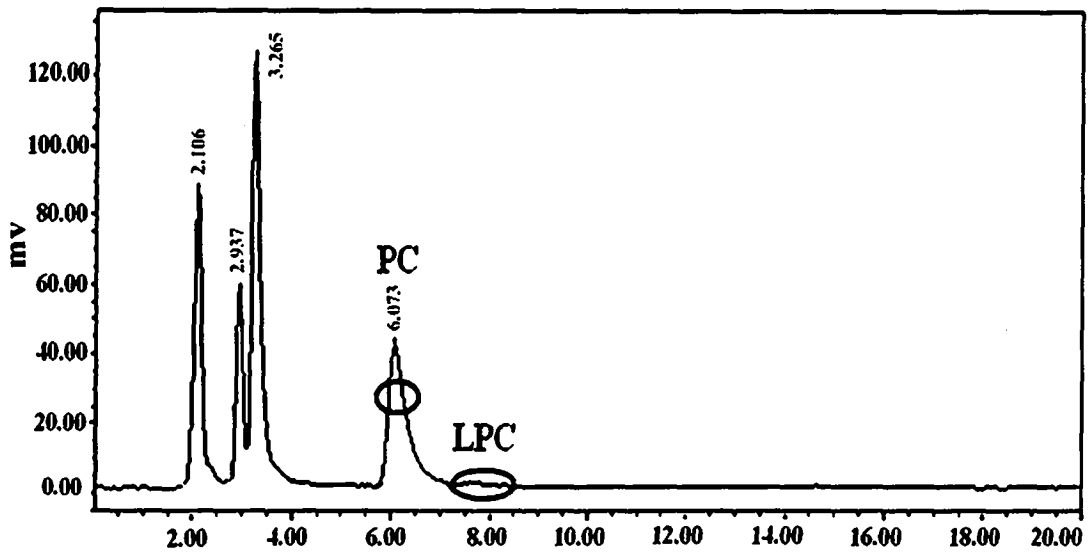


图 2

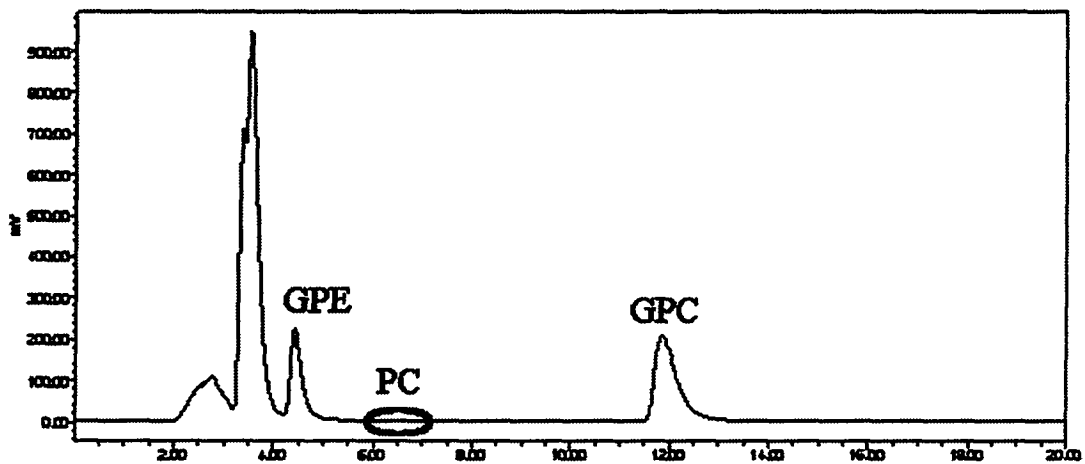


图 3

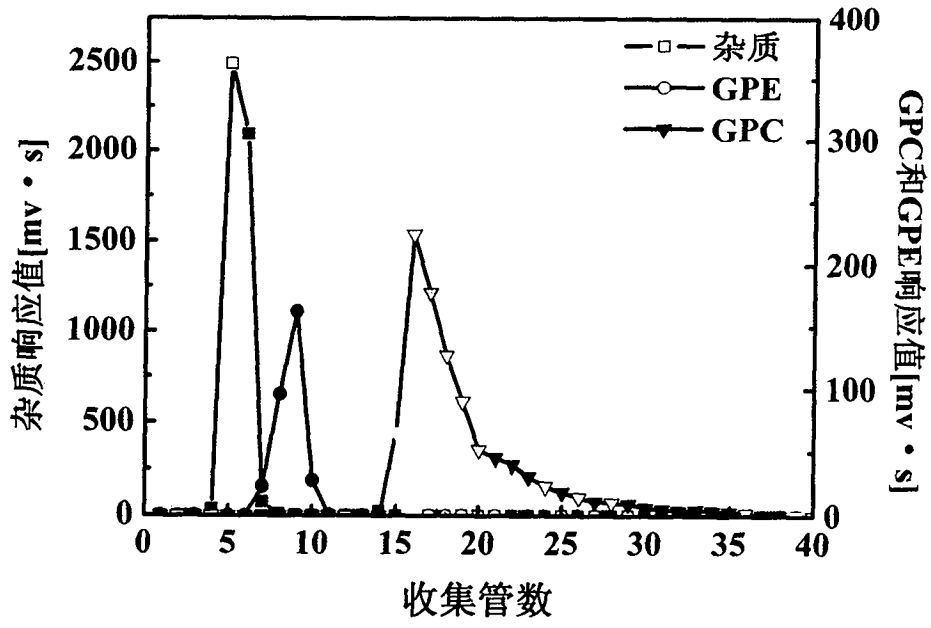


图 4

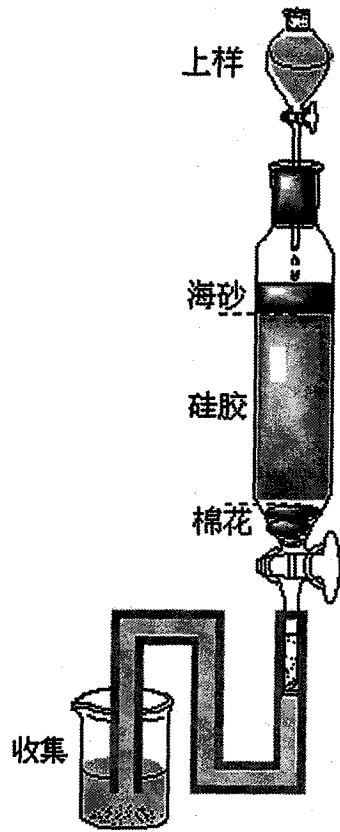


图 5