

# 汉麻叶中大麻二酚提取工艺研究

高宝昌\*, 孙宇峰, 张旭, 田媛, 石雨, 崔宝玉

黑龙江省科学院大庆分院, 大庆 163316

**摘要:**通过对汉麻叶中大麻二酚提取方式的选择与筛选, 考察了实验因素对提取效率的影响, 确定最佳提取工艺为无水乙醇作为提取试剂, 超声震荡 15 min、料液比为 1:20、提取次数 3 次的实验方法。同时对大麻二酚的纯化工艺进行了研究, 考察了大孔吸附树脂对大麻二酚的吸附和洗脱能力, 确定 DM130 大孔吸附树脂对大麻二酚的纯化能力较强。利用液相色谱、质谱、核磁等仪器对产品进行表征, 实现大麻二酚简单、高效的提取纯化。

**关键词:**汉麻; 大麻二酚; 提取; 纯化

中图分类号: O629.9; R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.028

## The Extraction Technology of Cannabidiol in Hemp Leaves

GAO Bao-chang\*, SUN Yu-feng, ZHANG Xu, TIAN Yuan, SHI Yu, CUI Bao-yu

*Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing 163319, China*

**Abstract:** An efficient method was established for the extraction of cannabidiol in hemp leaves. The optimized conditions were extract with ethyl alcohol, ultrasound-assisted oscillate for 15 minutes, ratio of sample to solvent 1:20, extraction 3 times. Meanwhile, the purification process of cannabidiol was also studied. The adsorption and elution capacity of cannabidiol by macroporous adsorption resin were investigated. The optimized macroporous adsorption resin is DM130. The product was characterized by HPLC, LCMS and HNMR. Finally, the cannabidiol of extracting and purification was established.

**Key words:** hemp; cannabidiol; extraction; purification

大麻(*Cannabis sativa* L.) 又称为汉麻、寒麻、线麻、花麻一年生草本植物<sup>[1]</sup>。大麻植物活性成分包括大麻素和非大麻素类化合物, 其中大麻素类化合物数量及活性成分较多。大麻素类化合物主要包括四氢大麻酚(THC)、大麻二酚(CBD)、大麻酚(CBN)及大麻萜酚(CBC)等成分<sup>[2]</sup>。国际上将 THC 含量低于 0.3% 的大麻称之为汉麻(工业大麻)<sup>[3]</sup>, 汉麻植物的用途十分广泛, 可用于纺织、造纸、制绳等领域。特别是近年来研究表明, 汉麻还具有极其良好的药用价值, 大麻素是其发挥药效作用的物质基础, 为汉麻植物中特有的活性成分。其中 CBD、THC 是大麻素类化合物的典型代表<sup>[4]</sup>, THC 因具有致幻成瘾性, 限制了其药用领域价值的发展, CBD 与 THC 活性作用截然不同, 是一种非成瘾性活性成分, 不具

有神经毒性<sup>[4]</sup>。研究表明 CBD 具有重要的药用价值, 在癫痫治疗、神经保护、多发性硬化症、风湿性关节炎、肿瘤治疗、戒烟等领域均表现出良好的药理活性<sup>[5-9]</sup>, 具有非常好的应用前景。特别是 GW 公司推出的 CBD 药物 Sativex 和 Epidiolex 用于治疗多发性硬化症和儿童发作性癫痫疗效非常明显<sup>[10]</sup>, 大麻酚类药物已成为研究热点。我国麻类作物种植地域覆盖范围广, 麻类作物种植面积逐年扩大, 是继粮、棉、油、菜之后的又一大作物群, 因此, 推广和普及麻类作物的开发及产品深加工具有重要的应用价值和深远意义, 本文为深入开展汉麻医药研究和汉麻多用途开发研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

汉麻叶, 黑龙江省科学院大庆分院火麻一号品种, 成熟期汉麻鲜叶经低温烘干、粉碎、过 100 目筛备用; 大麻二酚对照品(1 mg/mL), Sigma-Aldrich 试剂公司; 甲醇、乙醇、正己烷、乙酸乙酯等国产分析纯

收稿日期: 2017-11-15 接受日期: 2017-12-04

基金项目: 黑龙江省院所基本应用技术研究专项(201603); 黑龙江省科学院青年创新基金重点项目(201601); 国家国际合计合作专项(2015DFR50260)

\* 通讯作者 Tel: 86-459-8998829; E-mail: chemgbc@163.com

试剂;甲醇(色谱纯)、去离子水,北京百灵威科技有限公司。

液相色谱仪(LC-15C),日本岛津公司;分析天平(PB203-N),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;超声振荡器(KQ3200DE),昆山市超声仪器有限公司;台式高速冷冻离心机(Allegra64R),美国贝克曼库尔特有限公司;自动浓缩氮吹仪(NV24A-II),博纳艾杰尔公司;VARIAN UNITY-300MHz核磁共振仪;液质联用仪(AB),3200QTRAP。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 大麻二酚提取

汉麻花叶处理:汉麻成熟期收割花叶,花叶在自然的条件下晾干(含水量 < 5%),花叶粉碎包装待用。提取条件,无水甲醇作为提取试剂、超声震荡 15 min、料液比为 1:20、提取次数 3 次的实验方法。

### 1.2.2 大麻二酚纯化

大麻二酚提取母液采用大孔吸附树脂初步纯化,将提取母液加入到大孔吸附树脂中,在  $25 \pm 1$  °C 条件下震荡 12 小时,抽滤分离大孔吸附树脂,收集滤液。大孔吸附树脂用 10% ~ 100% 的乙醇进行梯度洗脱,收集洗脱液体,合并滤液与洗脱液进行浓缩,最后进行大孔吸附树脂再生。高纯度大麻二酚制备采用低压制备液相进行纯化,色谱条件:采用正相试剂石油醚、乙酸乙酯为流动相,硅胶填料分离柱,进行纯化分离,所得馏分浓缩得白色固体。

### 1.2.3 大麻二酚含量分析

采用等度洗脱方法进行大麻酚类物质含量分析,色谱条件:色谱柱:Inertsil ODS-3 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以甲醇:水(78:22, v:v)为流动相的高效液相色谱方法,流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长 220 nm,柱温 30 °C。在此色谱条件下大麻二酚理论板数均不低于 2500,分离度与拖尾因子均符合含量测试要求,按照外标法以峰面积定量计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取条件优化

本实验分别从提取试剂、提取时间、提取次数、料液比四个方面对提取工艺参数进行了优化。

由图 1 所示,综合考虑色谱基线稳定、杂质效应影响、试剂成本、试剂毒性、提取效率等因素,选择无水乙醇作为大麻二酚的理想提取试剂。

由图 2 所示,超声提取效果显著,提取时间短实验效率提高。经过实验研究超声提取 15 min,大麻

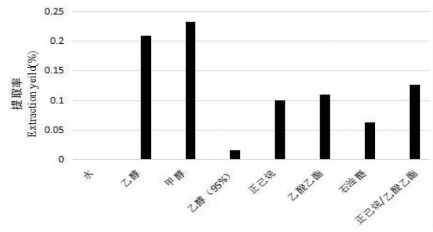


图 1 不同溶剂对大麻二酚提取效率的影响

Fig. 1 Effects of different solvents on the extraction efficiency of cannabidiol

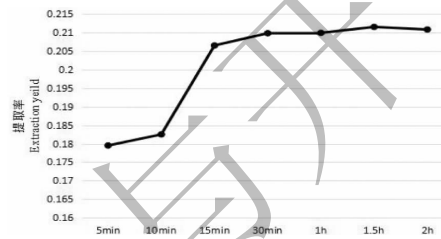


图 2 超声时间对大麻二酚提取效率的影响

Fig. 2 Effects of time of ultrasound-assisted oscillation on the extraction efficiency of cannabidiol

二酚含量达到最大值。此外,考察了浸泡 12 h 是否会提高大麻二酚的提取效率,实验如下,准确称量  $0.1 \text{ g} (\pm 0.20 \text{ mg})$  的汉麻叶样品 3 份(平行分析),分别溶于 2 mL 无水甲醇试剂中,充分搅拌后静置 12 h 后,相同的样品处理方式,在相同的色谱条件下进样分析。结果表明两种提取方法数据结果一致,浸泡 12 h 对大麻二酚化合物提取效率没有明显提高,由于提取时间过长影响实验效率,采用超声提取的方法满足样品测试工作要求。

由图 3 所示,可以看出第三次提取时大麻酚类化合物的含量已经非常低了,所以三次提取能够充分提取大麻酚类化合物。同时为考察实验数据的准确性,将三次提取液合并测试大麻二酚的含量,结果表明合并提取液数据与分别提取数据一致,所以三次提取能够充分提取汉麻叶中大麻酚类化合物。

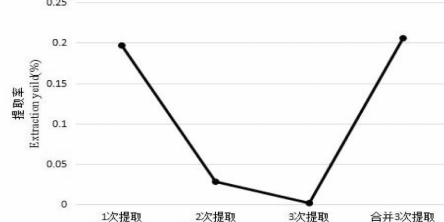


图 3 提取次数对大麻二酚提取效率的影响

Fig. 3 Effects of extraction times on the extraction efficiency of cannabidiol

由图4所示,随着液料比的增大,大麻二酚的含量逐渐增多,当液料比达到1:20时,大麻二酚的含量增加不显著。实验中考虑液料比越大,大麻二酚提取溶剂越多,浓缩处理时间越长,成本也会越来越高,因此最佳液料比为1:20。

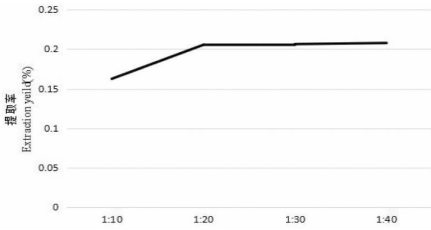


图4 料液比对四氢大麻酚和大麻二酚提取效率的影响

Fig. 4 Effects of solid-liquid ratio on the extraction efficiency of cannabidiol

## 2.2 大麻二酚纯化条件优化

### 2.2.1 大孔吸附树脂条件筛选

汉麻叶中大麻素种类非常多给大麻二酚纯化带来很大的困难,利用大孔吸附树脂选择性吸附,可有

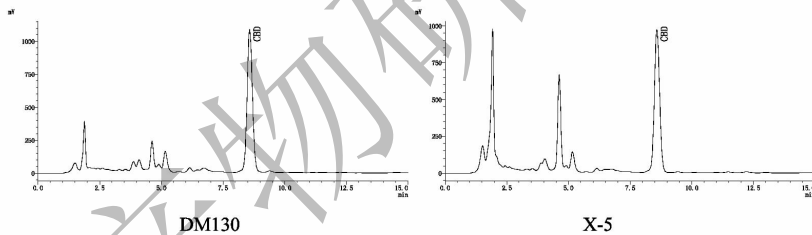


图6 大孔吸附树脂的纯化能力选择

Fig. 6 isolation ability of different resins

### 2.2.3 大麻二酚精制

本实验中大麻二酚精制采用快速纯化系统制备高纯度大麻二酚,DM130大孔吸附树脂初步纯化的提取液浓缩,硅胶拌样,采用正相试剂石油醚、乙酸乙酯为流动相,溶剂比10:90(乙酸乙酯:石油醚,v),流速15 mL/min,硅胶填料分离柱,进行纯化分离,所得馏分浓缩得白色固体。

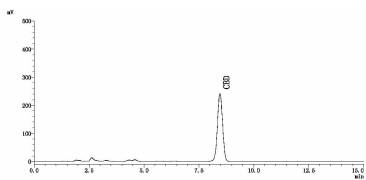


图7 大麻二酚液相色谱图

Fig. 7 HPLC profiles of CBD

效的去除杂质,为大麻二酚精制提供必要的条件。本实验通过选择不同种类和不同比表面积的大孔吸附树脂,考察吸附树脂的吸附能力和洗脱能力。

由图5所示,系列1为树脂的吸附能力,系列2为树脂的解析能力,综合考虑大孔吸附树脂的吸附和解析能力,X-5和DM130树脂的性能优异。

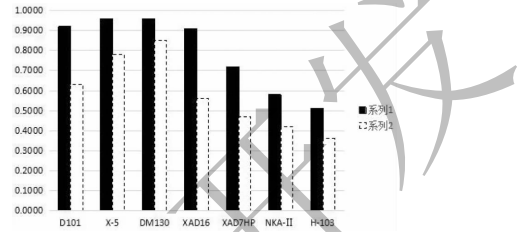


图5 大孔吸附树脂的吸附能力和解析能力选择

Fig. 5 Adsorption and desorption capacities of different resins

### 2.2.2 大孔吸附树脂选择性考察

由图6所示,X-5与DM130大孔吸附树脂的对大麻二酚的纯化能力相差很多,DM130大孔吸附树脂能够有效的去除提取母液中的杂质,大麻二酚的含量更高。

由图7所示,采用该方法制备的大麻二酚产品纯度可达到99%以上。

## 2.3 大麻二酚结构表征

为了保证提取目标产物结构的正确性,本实验利用核磁、质谱、液相色谱仪器对产品进行结构表征。

由图8所示,分子量313.3为大麻二酚的离子峰,分子量272.2为大麻二酚脱去基团的主要碎片峰,分子量488.3为大麻二酚脱去 $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ 基团的二聚体,数据结果表明提取纯化得到的大麻二酚结构正确。

大麻二酚结构表征:白色固体; $^1\text{H NMR}$  (DM-SO, 300 MHz)  $\delta$ : 8.64 (1H, s), 6.01 (1H, s), 5.09 (1H, s), 4.45 (1H, d,  $J = 23.9$  Hz), 3.83 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz), 3.12-2.95 (1H, m), 2.30 (1H, t,  $J =$

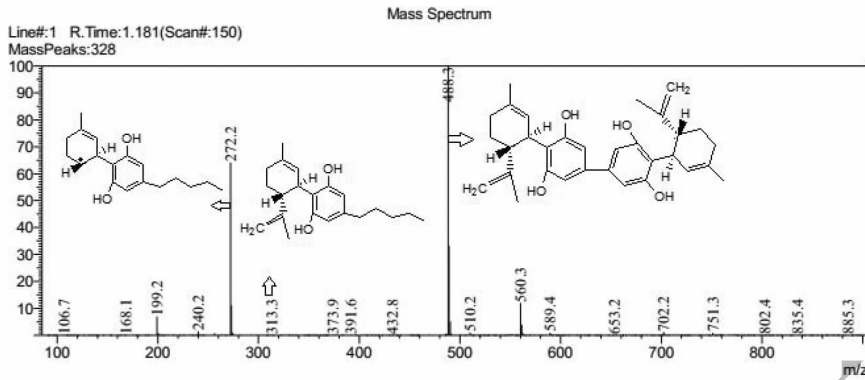


图8 大麻二酚的质谱分析

Fig. 8 Characterization of CBD by LC-MS

7.6 Hz), 2.09 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 1.91 (1H, d,  $J = 15.7$  Hz), 1.67 (1H, s), 1.58 (3H, s), 1.52-1.39 (1H, m), 1.36-1.16 (2H, m), 0.86 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz); MS  $m/z$  313.3 (calcd. for  $C_{21}H_{30}O_2$ , 314.2); Anal. Calcd for  $C_{21}H_{30}O_2$ : C, 80.21; H, 9.62; O, 10.18. Found: C, 80.17; H, 9.63; O, 10.21.

### 3 结论

汉麻叶中大麻素类化合物成分较多性质相近, 分离纯化困难, 特别是 THC 与 CBD 为同分异构体化学性质相近, 容易造成提取 THC 的风险。本实验通过对 CBD 提取工艺研究, 利用无水乙醇提取 CBD, 提取效果显著。利用 DM130 大孔吸附树脂选择性吸附纯化 CBD, 有效地去除提取液中杂质, 特别是 THC 成分。利用快速纯化系统有效地精制 CBD 产品, 可用于制药领域应用开发研究, 为大麻素活性成分开发提供理论参考。

#### 参考文献

- Zhang JC(张建春). Hemp cultivation and primary processing technology[M]. Beijing Chemical Industry Press, 2009.
- Ahmed SA, Ross SA, *et al.* Minor oxygenated cannabinoids from high potency Cannabis sativa L. [J]. *Phytochemistry*, 2015, 117:194-199.
- Elsohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana; the complex mixture of natural cannabinoids[J]. *Life Sci*, 2005, 78:539-548.

- Aizpurua-Olaizola O, Omar J, Navarro P, *et al.* Identification and quantification of cannabinoids in Cannabis sativa L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406: 7549-7560.
- Srikantaramas S, Taura F, Tanaka Y, *et al.* The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of D1-tetrahydrocannabinolic acid synthase from Cannabis sativa L. [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:39767-39774.
- Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, *et al.* Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30:515-527.
- Lee EL, Karschner G, Milman AJ, *et al.* Can oral fluid cannabinoid testing monitor medication compliance and/or cannabis smoking during oral THC and oromucosal Sativex administration[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2013, 130:68-76.
- Walsh JM, Crouch DJ, Danaceau JP, *et al.* Evaluation of ten oral fluid point-of-collection drug-testing devices[J]. *J Anal Toxicol*, 2007, 31:44-54.
- Moore C, Coulter C, Uges D, *et al.* Cannabinoids in oral fluid following passive exposure to marijuana smoke[J]. *Forensic Sci Int*, 2011, 212:227-230.
- Guo R(郭蓉), Chen X(陈璇), Guo HY(郭鸿彦). Review on pharmacological effects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29:1449-1453.