

- 2549-2555.
- [48] Hordyjewska A, Ostapiuk A, Horecka A, *et al.* Betulin and betulinic acid; triterpenoids derivatives with a powerful biological potential [J]. *Phytochem Rev*, 2019, 18 (3): 929-951.
- [49] Zeng A, Hua H, Liu L, *et al.* Betulinic acid induces apoptosis and inhibits metastasis of human colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2019, 27 (12): 2546-2552.
- [50] 乔文姝, 赵海田, 姚 磊. 羽扇豆烷型五环三萜生物活性研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(13): 235-241.
- [51] Jiao L, Wang S, Zheng Y, *et al.* Betulinic acid suppresses breast cancer aerobic glycolysis *via* caveolin-1/NF- κ B/c-Myc pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 161: 149-162.
- [52] Sun Y F, Song C K, Viernstein H, *et al.* Apoptosis of human breast cancer cells induced by microencapsulated betulinic acid from sour jujube fruits through the mitochondria transduction pathway[J]. *Food Chem*, 2013, 138(2-3): 1998-2007.
- [53] Fatemeh V, Mohsen F N, Kazem B. Evaluation of inhibitory effect and apoptosis induction of *Zyzyphus Jujube* on tumor cell lines, an *in vitro* preliminary study[J]. *Cytotechnology*, 2008, 56(2): 105-111.
- [54] 由丽华, 边学义, 边 原, 等. 酸枣果实注射液对降血压、抗心律失常的初步实验[J]. *锦州医学院学报*, 1986, 7 (4): 290; 287.
- [55] 吴巧敏, 赵艺初, 韩艺凡, 等. 生酸枣仁、炒酸枣仁、酸枣果肉对PCPA失眠模型大鼠学习记忆能力影响的对比研究[J]. *中医药导报*, 2016, 22(5): 72-75.

工业大麻中大麻二酚的研究进展

于晓瑾, 刘采艳, 杨连荣, 张育龙, 韩 华*
(黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 阐述工业大麻中大麻二酚的化学结构、提取分离、合成、定性定量分析方法。通过中国知网、万方、PubMed等数据库查阅了近5年来国内外有关大麻二酚研究的文献。获得大麻二酚的方法主要为从天然植株中提取及工业合成。提取分离方法主要有热回流提取法、超临界CO₂萃取法、超声辅助提取法及动态浸渍法;工业合成法可在短时间内获得大量的大麻二酚;通过生物合成途径调控大麻二酚合成的关键酶增加大麻二酚含量;通过半合成法可获得药效更好的大麻二酚衍生物;此外可采用气相、液相、气相-质谱联用等方法对大麻二酚进行定性定量分析。大麻二酚的各种提取方法较为完善,且产品含量高,但各有优缺点,可按实际情况选择适宜的方法;工业合成法短时间易获得大量的大麻二酚,但残留大量有毒溶剂,需要进一步的研究;大麻二酚进行结构修饰可获得稳定性及药效更优的产品。通过以上总结,以期为大麻二酚进一步的医药学研究提供参考。

关键词: 大麻二酚;化学结构与合成;提取分离;定性定量分析

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2021)05-1275-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.05.031

大麻 *Cannabis sativa* L 为桑科大麻属一年生的草本植物,且多为雌雄异株。主要分布于亚洲和欧洲等地区,且在我国具有悠长的栽培历史。大麻中主要含植物性大麻素类,植物性大麻素主要含大麻酚、大麻二酚、四氢大麻酚、大麻环酚萜等活性成分^[1],其中以大麻二酚、四氢大麻酚的含量最高,且四氢大麻酚具有致幻作用与成瘾性^[2]。在大麻中含大麻二酚最高的是工业大麻。目前全球有34个国家宣布了医疗用大麻的合法性,其中乌拉圭、加拿大、美国3个国家宣布了工业大麻的种植加工、使用的合法性。在欧美国家工业大麻主要用于农业、建筑材料、纺织、医药及化妆品领域。我国以四氢大麻酚/大麻二酚值的不同,

将我国的大麻分为毒品型大麻、中间型大麻、工业大麻和不含大麻二酚、四氢大麻酚的大麻4种类型,主要分布于云南、贵州、黑龙江、河北、吉林等省,国内的工业大麻主要作为纤维原料,以黑龙江的麻纤维质量最好。目前国内只有云南、黑龙江两省颁布种植、加工工业大麻合法性的地方法规^[3]。工业大麻中的大麻二酚被广泛应用于医药及化妆品领域。研究表明大麻二酚具有抗氧化活性^[4]、镇静^[5]、抗抑郁^[6]、抗炎活性^[7]、舒张血管^[8]等作用。大麻二酚无致幻及上瘾的作用,是临床治疗乳腺癌^[9]、癫痫^[10]的新型药物,在化妆品领域也受到了广大女性的青睐,如将大麻二酚加入雪花膏中制备成的抗炎祛斑雪花膏可用于

收稿日期: 2020-01-03

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81603366);哈尔滨市应用技术开发项目(2016RQXJ133)

作者简介: 于晓瑾(1979—),女,博士,副教授,从事天然产物研究。Tel: 13936665025, E-mail: yuxiaojin1979@126.com

* **通信作者:** 韩 华,女,博士,教授,从事天然产物研究。Tel: 18845635437, E-mail: hh7551@163.com

女性去斑,有巨大的市场开发前景^[11]。本文主要比较了获得大麻二酚不同方法之间的优缺点,以期获得安全且纯度较高的大麻二酚提供参考。

1 化学结构

大麻二酚主要集中于工业大麻的花与叶中,无成瘾性^[12]。Mechoulam等^[13]确定了大麻二酚的化学结构,工业大麻中的大麻二酚大多为左旋体,分子式 $C_{21}H_{30}O_2$,其熔点为66~67℃,易溶于甲醇、乙醇、丙酮、己烷等有机溶剂。

2 提取与分离

Mechoulam等^[14]发现了大麻二酚,工业大麻中的大麻二酚主要以大麻二酚酸形式存在,而大麻二酚酸可在光照、加热、碱化等条件下脱去羧基转化为具有药理活性的大麻二酚^[15]。常用甲醇、乙醇、丙酮、己烷等有机溶剂作为大麻二酚提取溶剂,对于大麻二酚的提取方法,包括动态浸渍法(DM)^[16]、超声辅助萃取法(UAE)^[17]、超临界CO₂萃取法(SFE)^[18]、微波辅助萃取法(MAE)^[17]、酶辅助溶剂提取法^[19]等。Cai等^[20]采用响应面法优化低共溶剂的浓度、固液比、萃取温度、萃取时间对工业大麻中的大麻二酚进行提取、分离,提取率高达12.22 mg/g。目前常用的为热回流提取法、超临界CO₂萃取法、动态浸渍法、超声辅助萃取法。

2.1 热回流提取法 高哲等^[21]采用热回流提取法对工业大麻叶中的大麻二酚进行提取,具体为将药材的花与叶经BJ-400型高速多功能粉碎机粉碎、过20目筛,用己烷作为提取溶剂,热回流提取3次,每次回流提取3h,提取温度80℃,合并3次所得提取液、回收己烷,然后将工业大麻的提取浓缩液浸膏经过大孔树脂层析,用2种不同体积分数乙醇进行洗脱,并用色谱监测馏分,合并含大麻二酚的洗脱液并进行浓缩,然后将浓缩物经过正相硅胶柱进行层析,用石油醚、二氯甲烷进行洗脱,并用色谱检测馏分,合并含大麻二酚的洗脱液、减压浓缩干燥即可得到纯的大麻二酚。该方法方便、快速、成本低,所得样品纯度高。

2.2 超临界CO₂萃取法 Attard等^[22]利用超临界CO₂萃取法从大麻中提取、分离出大麻二酚,具体为将100g碾碎的大麻粉尘残留物放入500cm³的萃取容器中,并连接至萃取系统。使用超临界流体级CO₂进行萃取,并使液态CO₂通过设定在所需温度的预热器中。将萃取器加热至50℃,保持压力,提取4h。然后用100mL二氯甲烷冲洗2次,收集容器来收集大麻二酚,然后加入无水硫酸镁,随后将溶液过滤,真空除去溶剂,即得。该方法操作简单、快捷、环保。

2.3 动态浸渍法 采用溶剂的相似相溶原理,采用动态浸渍法对大麻二酚进行提取、分离^[16,23]。其具体为,将工业大麻的花与叶自然晾干,并经粉碎机粉碎、过80目筛,然后称取约0.25g的粉末溶于适量的95%乙醇溶液中浸泡,进行超声热提取8h,共提取5次、滤过,合并5次提取

液,然后进行水浴减压浓缩得到样品A;稍后将样品A分散至一定量的纯化水中形成悬浮液,用适量的石油醚进行萃取,共萃取6次、合并萃取液,并进行水浴减压浓缩至干得到样品B;将得到的样品B通过正相硅胶柱层析,采用石油醚和二氯甲烷作为流动相进行梯度洗脱、收集洗脱液、浓缩,并用薄层色谱进行检测、合并相同的部分样品C;最后将样品C进行反相柱层析,采用甲醇-水作为流动相进行梯度洗脱,经过高效液相色谱进行定性分析,收集洗脱液、浓缩,合并相同部分即可得到纯度为(95±3)%的大麻二酚。该方法方便、简洁、经济,且获得产品的纯度高,缺点是用时长。

2.4 超声辅助萃取 随着科技的发展,超声辅助萃取被广泛用于提取生物活性化合物,其原理主要是超声可以通过破坏细胞壁使目标化合物溶解在溶剂中,从而在更短的时间内提高产量^[24]。Rovetto等^[18]采用超声辅助萃取法从工业大麻中提取大麻二酚,采用超声辅助萃取法提取大麻二酚,可缩短提取时间、增加大麻二酚的产率,且纯度高。

2.5 小结 热回流提取法与动态浸渍法的缺点是提取时间长,热回流提取法的提取温度不易控制,但操作简便、所用仪器简便且容易获得、对实验场所要求不高、工艺比较稳定、提取较完全、容易普及。超临界CO₂萃取法具有仪器设备的价格昂贵、CO₂的流量不易控制、容易堵塞等缺点,但其生产周期短,萃取率成品率高,萃取分离二为一,在萃取分离的过程中只需调节温度及压力的参数即可,操作工艺简单、技术容易掌握。动态浸渍法的缺点是提取时间长,对实验条件的要求不高,操作方法简单,可使样品中的有效成分全部溶出,所得大麻二酚的纯度高。超声辅助萃取法是利用超声振动加快分子振动的频率,从而破坏植物细胞壁,使药材的有效成分溶于溶剂中,提取率相较热回流提取法高,所需温度较低,可缩短萃取时间,可防止大麻二酚被氧化;但有超声波频率不易控制、出现超声空白区缺点。因此可根据实际情况采用适合的提取分离方法。

3 合成

3.1 大麻二酚在工业大麻体内的生物合成 大麻二酚的生物合成主要与聚酮化合物途径与脱氧木酮糖-5-磷酸途径有关,聚酮合酶与大麻二酚合酶是合成大麻二酚的关键酶^[25]。其具体的生物合成途径^[26],见图1。大麻萜酚酸也是工业大麻体内其他大麻素合成酶的底物,因此可以通过其他合成酶的作用下生成所需的大麻素。因此可以通过调节工业大麻体内的大麻素合成酶来调节植株体内相关大麻素的含量。

3.2 经典化学合成法 大麻二酚的化学合成可根据经典合成法^[27],见图2。经典合成法的原料低廉、易获得,方法简单;但在合成的成分中有同分异构体存在,不易分离出合格纯度的大麻二酚,因此需进一步研究。

3.3 现代化学合成法 目前大麻二酚的化学合成可根据一种大麻二酚的合成方法^[28]进行,见图3。该方法的原料及试剂廉价、易制得,所得大麻二酚纯度高,合格纯度的大

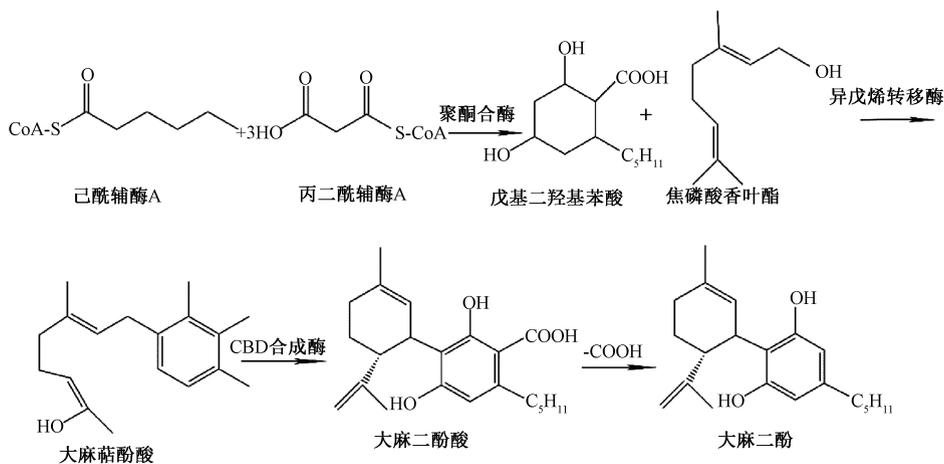


图1 大麻二酚生物合成途径

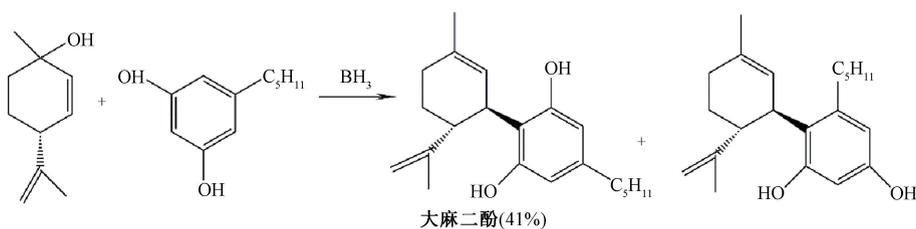


图2 大麻二酚的经典合成

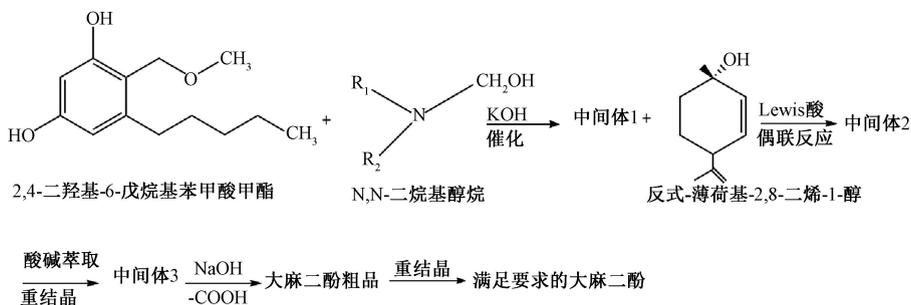


图3 大麻二酚的现代化学合成

大麻二酚总产率高达 35%~40%，对比前人的合成方法现代工艺所获得的大麻二酚纯度明显提高，可促进大麻二酚的进一步研究与应用；相比于经典合成法，减少了同分异构体的存在，使得所需的大麻二酚的纯度有所提高，具有较好的工业应用前景，但在现代法合成过程中会用到多种有机溶剂，且不易除去，会导致有害物质会大量残留于产品中，故仍然需要做进一步的改善。

3.4 半合成法 在现代药理学研究中，人们为了获得药效更好、易代谢、稳定性更好的新型药物，会对现有药物进行结构修饰从而获的该药的半合成药物，如在 6-氨基青霉烷酸上接适当的侧链，从而获得稳定性更好或抗菌谱更广、耐酸、耐酶的半合成青霉素（甲氧西林为耐酶的半合成青霉素）。因此可以对大麻二酚中的间苯二酚环及环己烯烷进行结构修饰可得大麻二酚衍生物，其相关的衍生物见图 4。Takeda 等^[29] 研究表明对大麻二酚间苯二酚环进行二甲基化，得到的大麻二酚-2', 6'-二甲醚对 15-脂肪氧合酶的抑制作用

为大麻二酚的 9.1 倍，可更好的抑制动脉粥样硬化的进一步发展；也可采用 1-氟吡啶三氟甲磺酸盐在大麻二酚的芳环上进行氟化，可得的 3'-氟大麻二酚。研究表明 3'-氟大麻二酚对在治疗焦虑症、抑郁症方面的药效作用强于大麻二酚^[30]。因此对大麻二酚进行结构修饰所得的大麻二酚衍生物，在人类治疗疾病方面具有较大大麻二酚更积极的作用。

4 定性定量分析

常用气相色谱、高效液相色谱、气相-质谱联用等方法对大麻二酚进行定性定量分析。傅强等^[31] 采用 RP-HPLC 法对大麻二酚进行定性分析；Sánchez-Carnero Callado 等^[32] 采用气相色谱-氢火焰离子化检测器对大麻二酚进行含量测定，所测得大麻二酚占样品总量的 12.93%；Marianne 等^[33] 采用 HPLC-DAD 法对大麻中的大麻二酚进行含量测定，测得大麻二酚占样品总量的 11.09%，该方法简单、准确度高、且灵敏度强。对大麻二酚进行定性定量分析的方法的优缺点见表 1。

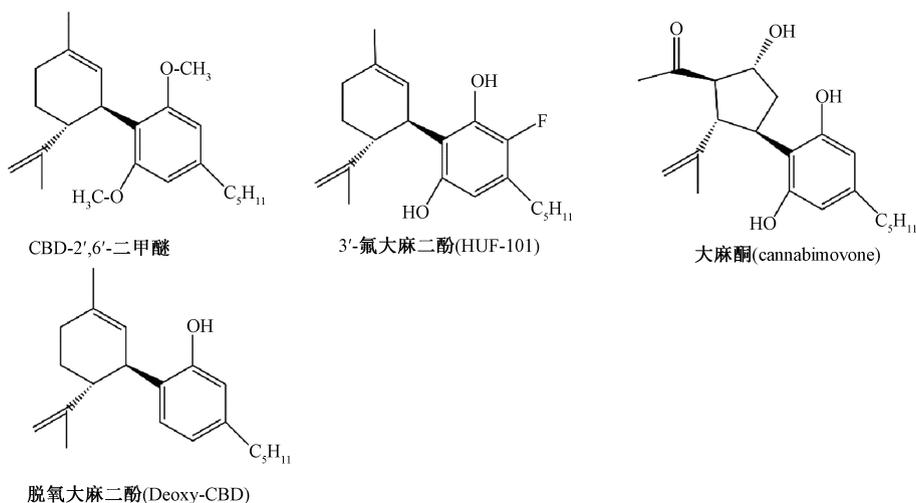


图 4 大麻二酚的衍生物

表 1 对大麻二酚进行定性定量分析方法的比较

特点	RP-HPLC 法	HPLC-DAD 法	GC-FID 法
优点	分离效能高,操作简单,分析速度快,可准确的对样品进行定性定量分析,不会破坏样品。操作简单,价格便宜	对于样品定性的准确度高于 HPLC,分离效能高,不会破坏样品,可准确、快速的对样品中的大麻素成分进行含量测定	分析速度较 HPLC 快,灵敏度高于 HPLC,高选择性,可准确的对样品中的大麻素成分进行含量测定
缺点	存在柱外效应,对一些结构相近的成分进行定性分析时不太准确	存在柱外效应	仪器设备复杂,价格昂贵对操作人员的要求高。不能直接给出样品定量分析结果

5 结语与展望

目前主要采用热回流提取法、超临界 CO₂ 萃取法、动态浸渍法、超声辅助提取法对工业大麻中的大麻二酚进行提取分离;同时也可采用工业合成法合成大麻二酚。此外也可根据大麻二酚在工业大麻植株内的生物合成途径,调控大麻二酚合成的关键酶可增加植株内的大麻二酚含量;还可对大麻二酚进行结构修饰,得到药效、稳定性较大麻二酚强且易代谢的衍生物。对大麻二酚进行定性定量分析的方法有 RP-HPLC、GC-FID、HPLC-DAD 等,这些方法可快速、准确的对大麻二酚进行定性定量分析,满足生产需求。从工业大麻内提取分离大麻二酚的方法技术较为成熟,具操作方法简单、提取大麻二酚含量及纯度高等优点,但生产成本低。采用工业合成法可在短时间内大量的大麻二酚,且生产成本低,但存在大量有机溶剂残留的问题,需要进一步研究。

参考文献:

[1] Angelo A I, Francesca B, Raffaele C, *et al.* Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30 (12): 609-609.

[2] Sherelle L C, Nicholas A, Christopher W V. Cannabis constituent synergy in a mouse neuropathic pain model [J]. *Pain*, 2017, 158(12): 2452-2460.

[3] 徐 炜, 杨淑君, 朱开才, 等. 国内外相关法律法规对工业大麻种植加工相关规定比较 [J]. *发展*, 2019(8): 52.

[4] Kalim M D, Bhattacharyya D, Banerjee A, *et al.* Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of plants used in Unani system of medicine [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2010, 10(16): 77.

[5] Murillo-Rodríguez E, Sarro-Ramirez A, Sanchez D, *et al.* Potential effects of cannabidiol as a wake-promoting agent [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2014, 12(3): 269-272.

[6] Zanelati T V, Biojone C, Moreira F A, *et al.* Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors [J]. *Brit J Pharmacol*, 2010, 159 (1): 122-128.

[7] Gregory I L, Cecilia J H, Gu Z, *et al.* Mediation of cannabidiol anti-inflammation in the retina by equilibrative nucleoside transporter and A2A adenosine receptor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(12): 5526-5531.

[8] Lourdes R V, José A M O, Cristina B. Cannabidiol reduces lipopolysaccharide-induced vascular changes and inflammation in the mouse brain: an intravital microscopy study [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8(1): 5.

[9] Sultan A S, Marie M A, Sheweita S A. Sheweita S. Novel mechanism of cannabidiol-induced apoptosis in breast cancer cell lines [J]. *The Breast*, 2018, 41: 34-41.

[10] Neubauer D, Benedik M P, Osredkar D. Cannabidiol for treatment of refractory childhood epilepsies: Experience from a single tertiary epilepsy center in Slovenia [J]. *Epilepsy Behavior*, 2018, 81: 79-85.

[11] 云南汉木森生物科技有限责任公司. 抗炎祛斑雪花膏及其

- 制备方法: 中国, CN201711023963.3[P]. 2018-03-20.
- [12] Kim P S, Fishman M A. Cannabis for Pain and Headaches: Primer[J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2017, 21(4): 1-11.
- [13] Mechoulam R. Marihuana chemistry[J]. *Science*, 1970, 168(3639): 1159-1165.
- [14] Mechoulam R, Hanuš L. A historical overview of chemical research on cannabinoids[J]. *Chem Phys Lipids*, 2000, 108(1-2): 1-13.
- [15] Aizpurua-Olaizola O, Soydaner U, Öztürk K, et al. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes[J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(2): 324-331.
- [16] Brighenti V, Pellati F, Marleen S, et al. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp) [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 143(5): 228-236.
- [17] Agarwal C, MáthéK, Hofmann T, et al. Ultrasound-assisted extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. optimized by response surface methodology[J]. *J Food Sci*, 2018, 83(13): 700-710.
- [18] Rovetto L J, Aieta N V. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. [J]. *J Supercrit Fluids*, 2017, 129: 16-27.
- [19] 吴俊锋, 杨晓泉. 酶辅助溶剂法提取大麻叶中大麻二酚工艺条件的优化[J]. *中国酿造*, 2016, 35(4): 79-82.
- [20] Cai C Y, Wang Y, Wang C Y. Green extraction of cannabidiol from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) using deep eutectic solvents coupled with further enrichment and recovery by macroporous resin[J]. *J Mol Liq*, 2019, 287(1): 110-957.
- [21] 高 哲, 张志军, 李晓君, 等. 大麻叶中大麻二酚的热回流法提取工艺研究[J]. *中国油脂*, 2019, 44(3): 107-111.
- [22] Attard T M, Bainier C, Lanot A, et al. Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and cannabidiol (CBD) from hemp wastes [J]. *Ind Crop Prod*, 2018, 112: 38-46.
- [23] 云南民族大学. 一种从工业大麻植物中分离提取大麻二酚的方法: 中国, 109369344[P]. 2019-02-22.
- [24] Shirsath S R, Sonawane S H, Gogate P R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status [J]. *Chem Eng Proc: Proc Intens*, 2012, 53: 10-23.
- [25] 陈 璇, 杨 明, 郭鸿彦. 大麻植物中大麻素成分研究进展[J]. *植物学报*, 2011, 46(2): 197-205.
- [26] Rahado T J, Chang W T, Verbeme M C, et al. Cloning and over-expression of a cDNA encoding a polyketide synthase from *Cannabis sativa* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42(4): 291-297.
- [27] Mechoulam R, Hanuš L. Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects Part I: chemical aspects [J]. *Chem Phys Lipids*, 2002, 121(1-2): 35-43.
- [28] 暨明医药科技(苏州)有限公司. 一种大麻二酚的合成方法: 中国, 106810426[P]. 2017-06-09.
- [29] Takeda S, Usami N, Yamamoto I, et al. Cannabidiol-2', 6'-dimethyl ether, a cannabidiol derivative, is a highly potent and selective 15-lipoxygenase inhibitor [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(8): 1733-1737.
- [30] Gaston T E, Bebin E M, Cutter G R, et al. Drug-drug interactions with cannabidiol (CBD) appear to have no effect on treatment response in an open-label expanded access program [J]. *Epilepsy Behav*, 2019, 98: 201-206.
- [31] 傅 强, 舒 智, 邓 轲, 等. 反相 HPLC 法同时测定大麻植物中的三种有效成分[J]. *法医学杂志*, 2016, 32(4): 261-263.
- [32] Sánchez-Carnerero Callado C, Núñez-Sánchez N, Casano S, et al. The potential of near infrared spectroscopy to estimate the content of cannabinoids in *Cannabis sativa* L.: A comparative study[J]. *Talanta*, 2018, 190(1): 147-157.
- [33] Marianne H, Stefan K, Wolfgang W, et al. Simultaneous quantification of delta-9-THC, THC-acid A, CBN and CBD in seized drugs using HPLC-DAD[J]. *Forensic Sci Int-Gen*, 2014, 243: 107-111.