

## 酶辅助溶剂法提取大麻二酚工艺条件的优化

吴俊锋 杨晓泉\*

(华南理工大学 食品科学与工程学院 淀粉与植物蛋白深加工教育部工程研究中心 广东 广州 510640)

**摘要:**为了研究从大麻的植物叶中利用酶辅助以及溶剂萃取方法制备富含大麻二酚的浸膏,考察了加热预处理方式、酶的种类、酶解的时间、酶量、料液比以及萃取时间等因素对浸膏得率的影响,并利用气相色谱方法对浸膏中的大麻二酚含量进行了表征。确定了最佳的工艺条件:大麻叶在100℃的烘箱中加热处理2h;采用的复合植物水解酶(Viscozyme L)和酸性蛋白酶的复合物进行酶解,用量分别为物料的0.5%,酶解时间1h,料液比1:20(g:mL),萃取时间3h。在此工艺条件下,浸膏得率达到5.40%,大麻二酚含量为56.11 mg/g。

**关键词:** 酶辅助; 大麻叶; 大麻二酚; 溶剂法

中图分类号: TS209

文章编号: 0254-5071(2016)04-0079-04

doi:10.11882/j.issn.0254-5071.2016.04.018

## Optimization of enzyme-assisted solvent extraction technology of cannabidiol from hemp leaf

WU Junfeng, YANG Xiaoquan\*

(Engineering Research Center of Starch and Vegetable Protein Processing Ministry of Education,  
School of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The extractum enriched in cannabidiol prepared by enzyme-assisted solvent extraction method from the waste of hemp plant leaf was investigated. The effects of heat pretreatment mode, enzyme type, hydrolysis time, enzyme concentration, material/solvent ratio and leaching time on the extractum yield were also investigated, and cannabidiol contents were quantified by gas chromatography. The optimal experiment condition was as follows: hemp leaf heated in air oven for 2 h; addition of viscozyme L and acid protease 0.5%, respectively, hydrolysis time 1 h, material/solvent ratio 1:20 (g:ml), and leaching time 3 h. Under these conditions, the extractum yield was 5.40%, and the corresponding cannabidiol content was 56.11 mg/g.

**Key words:** enzyme-assisted; hemp leaf; cannabidiol; solvent method

大麻(*Cannabis sativa* L.)起源于中亚<sup>[1]</sup>,且作为纤维、食物的来源已经有3 000多年的历史<sup>[2]</sup>。但之前由于历史的原因,人们对大麻研究出现了中断。随着大麻类产品的深入研究和开发,科学家认识到大麻对人体的有益作用,随之低毒型工业大麻的种植在全球普遍开展。相对于国外,中国大麻的种植面积很大,主要集中在广西一带,可以为大麻产品的科学研究与应用提供大量的原料。

大麻中的主要活性物质是大麻素类化合物,主要集中在大麻植物的叶中,目前已知的有60多种<sup>[3]</sup>,其中主要是大麻二酚(cannabidiol)及其羧基化合物。大麻二酚是非成瘾性成分,具有阻断某些多酚对人体神经系统的不利影响,并且具有阻断乳腺癌转移<sup>[4-5]</sup>、治疗癫痫<sup>[6-7]</sup>、抗类风湿关节炎<sup>[8-10]</sup>、抗失眠<sup>[11]</sup>等一系列生理活性功能。

溶剂萃取法是提取植物中色素以及多酚类物质最常用的技术手段,所用的溶剂主要是6#溶剂、正己烷、丙酮、二氯甲烷等非极性溶剂<sup>[12]</sup>。直接溶剂法对物料的萃取是有限的,因而不能获得很高的得率。越来越多的研究者进

转向对物料进行预处理——酶解处理,使用的酶多为纤维素酶、果胶酶及复合酶等。由于酶的水解作用,植物细胞壁被破碎,从而使物料中的活性物质或色素等更易被溶剂萃取出来。SOWBHAHYA H B等<sup>[13-15]</sup>对植物中色素、油脂及多酚等物质的酶辅助溶剂萃取进行了综述,包括万寿菊花、柑橘皮、玫瑰等,发现酶辅助溶剂法可以显著提高这些物质的提取率。

该文首先研究了加热预处理对大麻二酚提取的影响,确定了加热脱羧的作用。然后系统研究了所用酶的种类、酶的用量、酶解时间及物料溶剂比、萃取时间等因素对提取大麻二酚的影响,最终确定了大麻二酚提取的最佳工艺条件。本研究结果为利用大麻二酚制备大麻二酚提供了参考,将极大促进大麻产业以及大麻二酚制备技术的发展和运用。

### 1 材料与试剂

#### 1.1 材料与试剂

大麻二酚:云南工业大麻有限公司;大麻二酚标准品:国家

收稿日期: 2016-01-13

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863计划”项目(2013AA102208-3) 国家自然科学基金资助项目(31130042, 31371744)

作者简介: 吴俊锋(1990-),男,硕士研究生,研究方向为植物蛋白开发与利用。

\*通讯作者: 杨晓泉(1965-),男,教授,博士,研究方向为植物蛋白开发与利用。

食品药品检定所,酸性蛋白酶、纤维素酶和果胶酶;广州齐云生物科技有限公司;复合植物水解酶(Viscozyme L);丹麦诺维信公司;粉状活性炭;江苏活性炭厂;氯仿色谱纯;德国Merck公司;其他所用试剂均为分析纯;实验用水均为去离子水。

### 1.2 仪器与设备

PHS数显pH计:德国Mettler Toledo公司;DHG-9240电热恒温鼓风干燥箱:上海博讯实业有限公司;BS 224S电子天平:赛多利斯科学仪器有限公司;CR22G高速冷冻离心机:日本Hitachi公司;T25 Ultraturrax搅拌机、RV10旋转蒸发器:德国IKA公司;Agilent 7890A气相色谱仪(配有自动进样器和火焰离子化检测器):美国Agilent公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 火麻叶的预处理

取1 000.0 g火麻叶置于铺有铝箔纸的托盘中,然后将其置于100 °C烘箱中进行加热处理2.0 h,冷却密封备用。取加热处理过的火麻叶子20.0 g,按1:10(g:mL)加入酶液(含有相对于火麻叶0.5%的酶量),在相应酶的最佳条件下于摇床内水解1.0 h,作为溶剂萃取备用。

#### 1.3.2 浸膏的制备

于上述水解液中加入400 mL萃取溶剂正己烷,然后将其置于转速为1 000 r/min的搅拌器中快速搅拌3.0 h,使物料与溶剂充分接触。分离出上层的正己烷,进行旋蒸操作除掉溶剂,得到油状物。按油状物与甲醇为1:5的比例加入甲醇,置于-40 °C的冰箱内进行冬化处理1.0 h。于-6 °C条件下离心获取上清液,在上清液中加入相对于油状物10%的活性炭,进行脱色处理30 min。过滤所得的滤液再次进行旋蒸,即得到富含大麻二酚的浸膏。

$$\text{浸膏得率}=(M/m)\times 100\%$$

式中:M为浸膏的质量,g;m为样品质量。

#### 1.3.3 大麻二酚含量的测定

分别准确称取0.1 g上述旋蒸制备的浸膏产品,加入5 mL氯仿溶解,于功率150 W与温度25 °C的超声浴中超声5 min后过0.22 μm的有机膜,所得滤液按下面的气相条件和标准曲线进行大麻二酚定量。

气相色谱条件:使用Agilent HP-5色谱柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm),Agilent 7890A型气相仪进行测定。载气为氦气,流速1.00 mL/min,柱温程序:起始温度100 °C,保持5 min,以10 °C/min程序升温至250 °C,5 °C/min升温至300 °C,保持10 min,进样口温度150 °C,检测器温度300 °C,分流比5:1,氢气流速40 mL/min,空气流速400 mL/min;自动进样,进样量为4.0 μL,检测时间30 min。

大麻二酚标准曲线:配制不同浓度的标品溶液,按上述气相条件进行检测,以大麻二酚含量为X轴,峰面积为Y

轴制作标准曲线,通过标准曲线来计算样品中大麻二酚的含量。

#### 1.3.4 提取条件工艺优化单因素试验

分别考察加热处理方式:未处理、100 °C加热2 h、100 °C加热4 h、120 °C加热2 h;酶的种类:未加酶、纤维素酶、果胶酶、Viscozyme L、Viscozyme L/蛋白酶;酶解时间:0.25 h、0.5 h、1.0 h、2.0 h、5.0 h;加酶量:0.3%、0.5%、1.0%;料液比和萃取时间:1:10/3 h、1:20/3 h、1:30/3 h、1:20/1 h、1:20/5 h对浸膏得率和大麻二酚含量的影响。

#### 1.3.5 数据分析

每次实验重复2次,结果以平均值±标准偏差来表示。利用Origin 8.0作图,利用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析,利用置信度为95%的最小显著性差异( $P<0.05$ )来比较平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 大麻二酚标准曲线

以大麻二酚含量(μg)为X轴,峰面积为Y轴制作大麻二酚标准曲线,结果见图1。由图1可知,大麻二酚标准曲线回归方程为 $Y=2\,227.6X+24.123$ ,相关系数 $R^2=0.999\,8$ ,二者在1.5~6.0 μg范围内线性关系良好。

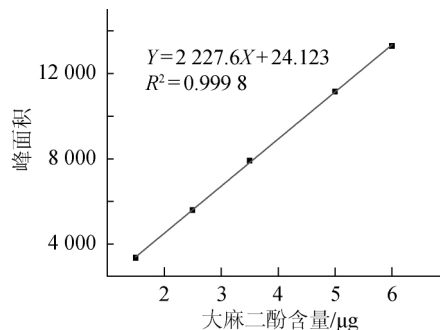


图1 大麻二酚标准曲线

Fig. 1 Standard curve of cannabidiol

### 2.2 单因素试验

#### 2.2.1 加热处理对大麻二酚提取的影响

不同加热处理对火麻叶中大麻二酚含量的影响见图2。由图2可知,100 °C条件下加热原料2 h可以显著提高浸膏中大麻二酚的含量,从20.34 mg/g提高至25.62 mg/g。这是由于大麻二酚会以羧酸的形式存在,而加热可以使其羧酸衍生物脱去羧基,从而可以增加浸膏得率和大麻二酚含量。但长时间的加热和更高温度的加热,并不能提高得率和大麻二酚含量,得率稳定在3.30%左右,大麻二酚含量稳定在25.00 mg/g。这可能是由于100 °C/2 h条件下羧酸衍生物已经完全发生了脱酸反应,故提供更多的能量并不能提高得率。因此应该先对物料进行加热处理,选择100 °C条件下加热2 h。

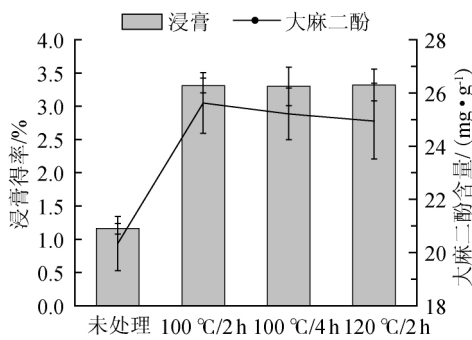


图2 加热处理对大麻二酚提取的影响  
Fig. 2 Effects of heat treatment on cannabidiol extraction

### 2.2.2 酶的种类对大麻二酚提取的影响

本研究探讨了不同酶对已加热处理过的火麻叶子中大麻二酚提取的影响,结果见图3。由图3可知,与对照组相比,经过纤维素酶和果胶酶处理的样品,其浸膏得率分别从3.31%提高至4.51%、4.29%,相应的大麻二酚含量也从25.62 mg/g上升至37.03 mg/g、34.35 mg/g。这是因为纤维素酶和果胶酶破坏了植物细胞壁组织,从而让溶剂更好地渗入组织内部,进而提高大麻二酚的提取。并且这两种酶的效果差不多,这表明火麻叶子细胞壁主要成分是纤维素和果胶。Viscozyme L是一种水解植物细胞壁的复合酶,含有纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶等多种多糖酶,其效果优于单一酶。从图3可以看出,该复合酶处理过的物料,其浸膏得率达到4.82%,大麻二酚含量达52.16 mg/g。将等量的酸性蛋白酶与复合酶一同作用火麻叶时,发现得率和大麻二酚含量还会有所增加。这表明植物细胞壁中还含有少量的蛋白质,且该蛋白质与纤维素相互连接在一起,添加蛋白酶可以破坏蛋白结构,进而破坏细胞壁。因此最佳的酶为Viscozyme L与蛋白酶的复合酶。

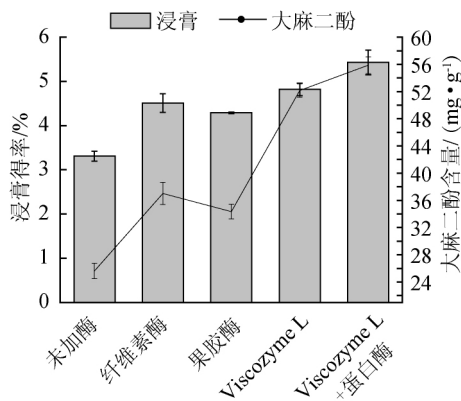


图3 酶的种类对大麻二酚提取的影响  
Fig. 3 Effect of different enzymes on cannabidiol extraction

### 2.2.3 酶解时间对大麻二酚提取的影响

酶在最适温度和pH条件下的酶解效率还与其和底物

作用的时间有关,在一定范围内,时间越长,酶解效率越高。复合酶与蛋白酶综合水解火麻叶时间对大麻二酚提取率的影响如图4所示。由图4可知,随着酶解时间的延长,浸膏得率从4.65%提高至5.40%,大麻二酚含量也从41.27 mg/g增加至56.11 mg/g。但酶解时间的进一步延长,并不能增加得率。这是因为在1.0 h的酶解时间内,酶已经充分地破坏了植物细胞组织,因此最佳酶解时间选择1.0 h。

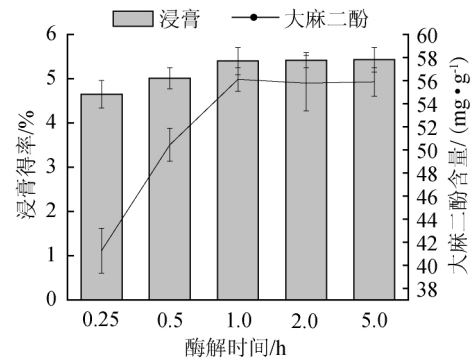


图4 酶解时间对大麻二酚提取的影响  
Fig. 4 Effect of hydrolysis time on cannabidiol extraction

### 2.2.4 酶量对大麻二酚提取的影响

加酶量对大麻二酚含量的影响见图5,由图5可知,复合酶各自的添加量从0.3%增加至0.5%时,添加的酶量越多,在一定范围内酶解效率越高,得率和大麻二酚含量都相应的增加。但进一步增加酶的用量,大麻二酚含量已稳定在56.11 mg/g左右,浸膏得率也有类似的现象。这表明0.5%的酶用量已经达到对物料中的细胞壁进行了充分的破坏,能够获得最高的得率与含量。因此复合酶各自的添加量选择0.5%为最佳。

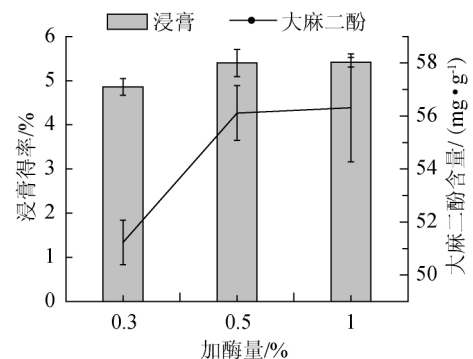


图5 酶量对大麻二酚提取的影响  
Fig. 5 Effect of enzyme addition on cannabidiol extraction

### 2.2.5 料液比与萃取时间对大麻二酚提取的影响

本实验为液液萃取过程,因此添加不同量溶剂时,形成的两相界面的强弱也就不同,从而会影响溶剂对大麻二酚的提取。如图6所示,当料液比为1:10(g:mL)时,浸膏得率

只有3.81% 这说明正己烷的量太少 不能抵抗水在细胞外围的界面压力 不能很好地进入细胞内萃取大麻二酚。而当提高料液比至1:20(g:mL)时 浸膏得率也提高至5.40% ,大麻二酚含量也从40.02 mg/g增加至56.11 mg/g。过多的溶剂表现出不能提高得率与含量。不同时间对萃取效率的影响也是不同的 在最佳料液比条件下 3 h的溶剂萃取是较为理想的条件。这或许是因为长时间的萃取 溶剂已经完全萃取出其中的大麻二酚 或者溶剂与水相已经达到平衡了 不能再进入细胞壁内萃取大麻二酚。因此最佳料液比和萃取时间分别为1:20(g:mL) 3 h。

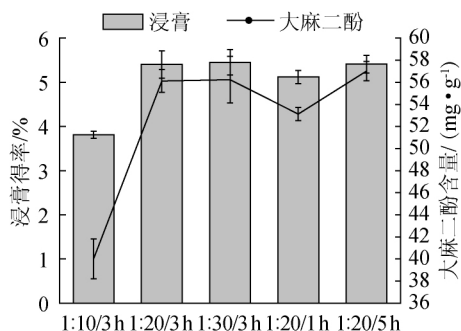


图6 料液比和萃取时间对大麻二酚提取的影响

Fig. 6 Effect of material/solvent ratio and leaching time on cannabidiol extraction

### 3 结论

本研究以火麻植物的叶为原料 对原料进行了加热与酶解预处理 探讨了预处理与料液比及萃取时间对大麻二酚提取的影响。综合单因素试验结果以及经济效率问题 确定了最佳的工艺条件如下 :火麻叶在100 ℃烘箱内加热处理2 h 进而进行酶解 采用的酶是复合植物水解酶(Viscozyme L)与酸性蛋白酶的复合 其用量分别为底物的0.5% 酶解时间为1 h 料液比为1:20(g:mL) 萃取时间取3 h。在此工艺条件下获得的浸膏得率为5.40% ,大麻二酚含量为56.11 mg/g。总之 通过酶辅助溶剂萃取法可以很好地提取火麻叶中的生理活性物质大麻二酚 本研究为从其

他植物中提取多酚或者色素提供了一定的参考。

### 参考文献 :

- [1] GIRGIH A T, UDENIGWE C C, ALUKO R E. *In vitro* antioxidant properties of hemp seed(*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2011, 88: 381-389.
- [2] CALLAWAY J C. Hempseed as a nutritional resources: an overview[J]. *Euphytica*, 2004, 140: 65-72.
- [3] GERRA G, ZAIMOVIC A, GERRA M L, et al. Pharmacology and toxicology of cannabis derivatives and endocannabinoid agonists [J]. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2010, 5(1): 46-52.
- [4] MASSI P, SOLINAS M, CINQUINA V, et al. Cannabidiol as potential anticancer drug[J]. *Brit J Clin Pharmacol*, 2012, 75(2): 303-312.
- [5] MECHOUAM R, PETERS M, RODRIGUEZ E, et al. Cannabidiol-recent advance[J]. *Chem Biodivers*, 2007, 5: 1678-1692.
- [6] 刘元江. 大麻二酚可阻断乳腺癌转移[N]. 中国医药报, 2007-12-6.
- [7] MINTZ C S, NISON E, FABRIZIO A J. Cannabis-derived pharmaceuticals[J]. *J Comme Biot*, 2015, 21: 16-31.
- [8] 成亮, 吕峰, 孔德云, 等. 大麻二酚抗风湿性关节炎作用研究[J]. 世界临床医药, 2013, 34(9): 527-530.
- [9] 殷莎, 唐双奇, 陆阳. 大麻二酚神经保护作用机制研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(3): 432-436.
- [10] IUOVONE T, ESPOSITO G, FILIPPIS D D, et al. Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders?[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2009, 15: 65-75.
- [11] 成亮, 孔德云. 大麻中非成瘾性成分大麻二酚及其类似物的研究概况[J]. 中草药, 2008, 39(5): 783-787.
- [12] LONE T A, LONE R A. Extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. plant and its potential antimicrobial activity[J]. *U J Med Den*, 2012, 1(4): 51-55.
- [13] SOWBHAGYA H B, CHITRA V N. Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials[J]. *Crit Rev Food Sci*, 2010, 50(2): 146-161.
- [14] PURI M, SHARMA D, BARROW C J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants[J]. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(1): 37-44.
- [15] BARZANA E, RUBIO D, SANTAMARIA RI, et al. Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*) [J]. *J Agr Food Chem*, 2002, 50: 4491-4496.

欢迎订阅 2016 年《中国酿造》杂志