GC 法测定国内工业大麻挥发油中的 β- 石竹烯、α- 石竹烯和氧化石竹烯

罗嘉嘉，周　靖，徐云辉，郭玉涵，华茉莉*
（中国医药工业研究总院上海医药工业研究院有限公司，创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 201203）

摘要：采用水蒸气蒸馏法提取工业大麻挥发油样品，并建立气相色谱 - 氢火焰离子化检测（GC-FID）法测定其中主要组分 β- 石竹烯（**1**）、α- 石竹烯（**2**）和氧化石竹烯（**3**）的含量，选择正十三烷（**4**）作为内标物。结果显示，建立的方法具有良好的分离度和专属性，**1**、**2**、**3** 分别在 0.001 7 ～ 0.174 8、0.001 7 ～ 0.170 0、0.001 8 ～ 0.178 4 mg/mL 内线性关系良好，检测限分别为 0.087、0.085、0.180 μg/mL。平均加样回收率（*n*=9）分别为 107.12%、99.01%、93.30%，RSD 分别为 2.33%、1.14%、1.61%。本法可用于工业大麻挥发油中 **1**、**2**、**3** 的含量测定，也为其质量控制及医药应用研究提供了技术支持。

关键词：工业大麻；气相色谱；β- 石竹烯；α- 石竹烯；氧化石竹烯
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)04-0604-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.04.018

Determination of β-Caryophyllene, α-Caryophyllene and Caryophyllene Oxide in Volatile Oils of Hemp by GC

LUO Jiajia, ZHOU Jing, XU Yunhui, GUO Yuhan, HUA Moli*
(*State Key Lab. of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: The volatile oils of hemp were extracted by steam distillation and the gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) method was established to determine the main components including β-caryophyllene (**1**), α-caryophyllene (**2**) and caryophyllene oxide (**3**) with *n*-tridecane (**4**) as the internal standard. The results showed that this method had good resolution and specificity. It was linear for **1** – **3** in the concentration ranges of 0.001 7 – 0.174 8, 0.001 7 – 0.170 0, 0.001 8 – 0.178 4 mg/mL, respectively. The detection limits of **1** – **3** were 0.087, 0.085, 0.180 μg/mL, respectively. The average sample recoveries (*n*=9) were 107.12%, 99.01% and 93.30%, with the RSDs of 2.33%, 1.14% and 1.61%, respectively. This method can be used for the determination of **1** – **3** in the volatile oils of hemp and provides a technical support for its quality control and medical application research.

Key Words: hemp; GC; β-caryophyllene; α-caryophyllene; caryophyllene oxide

大麻（*Cannabis sativa* L.）为桑科大麻属一年生植物[1]，在全世界均有野生分布和栽培，作为纤维及医药应用历史悠久。大麻花叶中含有丰富的植物大麻素，其中四氢大麻酚（tetrahydrocannabinol，THC）是大麻作为毒品的主要精神活性物质。国际上通常将大麻干植物花叶中 THC 含量低于 0.3%的大麻称为工业大麻（hemp），也称为汉麻。由于工业大麻的药物滥用风险相对较低，我国云南和黑龙江两省均已通过地方立法，允许其在公安系统监管下种植加工，因此可为国内开展非 THC 大麻化学成分的医药应用开发提供可利用的植物资源。

除大麻素外，大麻花叶中还含有散发特殊香气的挥发油，类似于一般芳香植物花叶中的芳香精油。已有大量研究证实大麻挥发油中多为单萜类如 α- 蒎烯、β- 蒎烯、β- 月桂烯、D- 柠檬烯等，以及倍

收稿日期：2022-10-17
作者简介：罗嘉嘉（1998—），女，硕士研究生，专业方向：中药质量研究。
通信作者：华茉莉（1972—），女，研究员，博士生导师，从事中药、天然药物的新药研究与开发。
E-mail：huamoli@sinopharm.com

半萜类组分如 β- 石竹烯（β-caryophyllene，**1**）、α- 石竹烯（α-caryophyllene，**2**，也称为 α- 葎草烯）、氧化石竹烯（caryophyllene oxide，**3**）等（**1** ～ **3** 的化学结构如图 1 所示）[2]，组合发挥着多样化的生物活性，甚至有研究认为这些芳香组分能够协同大麻素产生有益的“随行效应”[3]，如减轻 THC 的精神症状[4]、增强大麻二酚（cannabidiol，CBD）的药理学活性[5]等。

本实验室前期研究了国内工业大麻花叶中挥发性成分的组成，结果显示不同批次原料中倍半萜类物质占比较高，且 **1**、**2**、**3** 为主要共有成分[6]，3 种组分在以水蒸气蒸馏法提取的挥发油中合计占比一般超过 40%，但在不同批次提取物中的含量有明显波动。已有研究[7—10]表明，这 3 种倍半萜烯本身也具有良好的药理学活性：**1** 是一种大麻素 2 型受体（CB_2）选择性激动药，但不激活大麻素 1 型受体（CB_1），因此没有精神活性，且具有胃保护、镇痛、抗肿瘤、抗菌、抗抑郁、抗炎、抗增殖、抗氧化、抗焦虑和神经保护等作用，已被美国 FDA 批准可作为膳食补充剂使用[11]；**2** 与 **1** 互为同分异构体，**2** 广泛存在于鼠尾草、人参等植物花叶中，可预防肿瘤、抑制食欲、抗炎、镇痛等[12—13]；**3** 是 **1** 的氧化产物，在贮存较长时间或经高温干燥处理的大麻花叶中，占比会不同程度上升。不过，也有研究[14]称大麻中倍半萜类成分氧化后可能会产生一定毒性。因此，准确测定工业大麻挥发油中 **1**、**2**、**3** 的含量，将有利于客观、科学地研究和评估大麻挥发油的医药应用价值。

本研究首先采用水蒸气蒸馏法提取不同批次工业大麻花叶原料中的挥发油，并考察提取时间、加热温度及料液比对挥发油提取效果的影响；然后建立气相色谱 - 氢火焰离子化检测（GC-FID）法测定挥发油中 **1**、**2**、**3** 的含量，同时选择正十三烷（**4**）作为内标物以有效减少测定误差，以期为国内工业大麻挥发油的质量控制及其医药研究提供参考。

1 仪器与试药

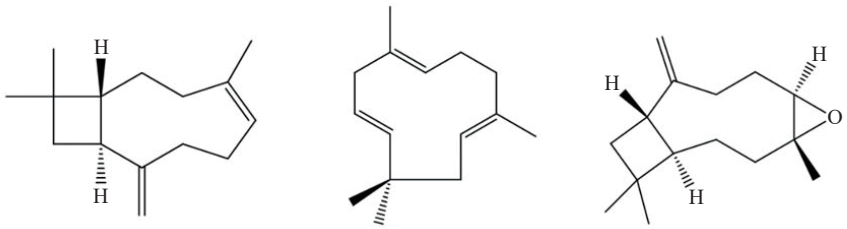
7890B 型气相色谱仪（美国 Agilent 公司）；MS204TS 型分析天平（上海梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；0.22 μm 针头式微孔滤器（上海泰坦科技股份有限公司）。

1 对照品（含量 98%，批号 NIFDC111819）、**2** 对照品（含量 90%，批号 ST58290381）和 **3** 对照品（含量 98%，批号 ST57910120）均购于上海诗丹德标准技术服务有限公司；**4**［梯希爱（上海）化成工业发展有限公司，含量 >99%，批号 YBXSM-BK］；工业大麻花叶样品（云南翰谷生物科技有限公司，批号 DM-Y-20190909、DM-Y-011、DM-Y-012、DM-Y-013，其中 DM-Y-20190909 为 2019 年采收，DM-Y-011 为 2020 年采收，DM-Y-012 和 DM-Y-013 为 2021 年采收；采用《云南省工业大麻种植加工许可规定》及企业内定验收标准验收，即 THC 含量≤ 0.3%，CBD 含量≥ 0.6%，水分含量 <12%，无果实花叶；本研究采用的花叶原料为企业按上述标准验收、干燥、粉碎后赠送，为保证研究样品的一致性，后续研究所需样品均由该企业提供）；无水乙醇为分析纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 工业大麻中挥发油的提取与样品的制备

采用水蒸气蒸馏法提取工业大麻中的挥发油，具体操作参照《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）四部通则 2204 中的“挥发油测定法甲



1 **2** **3**

图 1 1 ～ 3 的化学结构

Fig.1 Chemical Structures of **1** – **3**

法”。称取工业大麻花叶 500 g，置圆底烧瓶中，加水 4 L，于 160 ℃以水蒸气蒸馏法提取 5 h，收集挥发油，计算提取率并测定其中 **1**、**2**、**3** 的含量。

2.2 色谱条件

色谱柱 HP-5 柱（0.32 mm×30 m×0.25 μm）；载气 高纯氮气；载气流量 2.0 mL/min；分流比 2∶1；进样量 1 μL，直接进样；进样口温度 250 ℃；检测器温度 250 ℃；空气流量 400 mL/min；氢气流量 40 mL/min；尾吹气流量 10 mL/min；柱温 程序升温，初始温度 60 ℃，保持 2 min，以 20 ℃/min 升温至 120 ℃，以 2 ℃/min 升温至 146 ℃，保持 1 min，以 20 ℃/min 升温至 160 ℃，保持 1 min；后运行 280 ℃，保持 10 min。

2.3 溶液配制

内标溶液：精密称取 **4** 适量，加入乙醇溶解，制成每 1 mL 中约含 **4** 0.05 mg 的溶液，于 4 ℃保存。

混合对照品溶液：精密称取 **1**、**2**、**3** 对照品适量，置 50 mL 量瓶中，加入无水乙醇溶解并定容，作为混合对照品贮备液；精密量取混合对照品贮备液 1 mL，精密加入内标溶液 1 mL，摇匀，制成每 1 mL 中含 **1**、**2**、**3** 均约为 0.02 mg 的混合对照品溶液。

供试品溶液：精密称取“**2.1**”项下的挥发油样品适量，加入无水乙醇溶解，制成每 1 mL 含挥发油样品约 0.5 mg 的贮备液；精密量取该贮备液 1 mL，加入内标溶液 1 mL，摇匀，过滤，取续滤液，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适用性试验

取“**2.3**”项下的混合对照品溶液，按“**2.2**”项下色谱条件连续进样 6 次，计算 **1**、**2**、**3** 峰面积与内标 **4** 峰面积比值的 RSD。结果显示，RSD（n=6）分别为 0.17%、0.41%、0.34%，理论塔板数均大于 50 000。

2.4.2 专属性试验

分别取无水乙醇（空白溶剂）和“**2.3**”项下的混合对照品溶液和供试品溶液，按“**2.2**”项下色谱条件进样测定并记录色谱图。结果如图 2 所示，**1**、**2**、**3** 与其相邻峰的分离度分别为 2.79、4.27、7.80，且空白溶剂和内标物对 **1**、**2**、**3** 的测定均无干扰，表明方法专属性良好。

2.4.3 线性试验、检测限与定量限

精密称取对照品 **1**、**2**、**3** 适量，置 25 mL 量瓶中，加入内标溶液溶解并定容，即得 **1**、**2**、**3** 质量浓度分别为 0.174 8、0.170 0、0.178 4 mg/mL 的溶液；精密吸取上述溶液适量，用内标溶液分别逐级稀释 2、5、10、25、50、100 倍，即得系列浓度线性试验溶液。

取上述系列浓度线性试验溶液，分别按“**2.2**”项下色谱条件进样并记录峰面积。以对照品质量浓度（c）为横坐标、对照品与内标物峰面积比值（R）为纵坐标绘制标准曲线，所得 **1**、**2**、**3** 的回归方程及相关系数如表 1 所示。结果显示，**1**、**2**、**3** 分别在 0.001 7 ～ 0.174 8、0.001 7 ～ 0.170 0、0.001 8 ～ 0.178 4 mg/mL 内线性关系良好。

取“**2.3**”项下的混合对照品溶液，用无水乙醇逐级稀释，以信噪比（S/N）为 10 和 3 时对应的进样浓度为定量限（LOQ）和检测限（LOD），结果如表 1 所示。

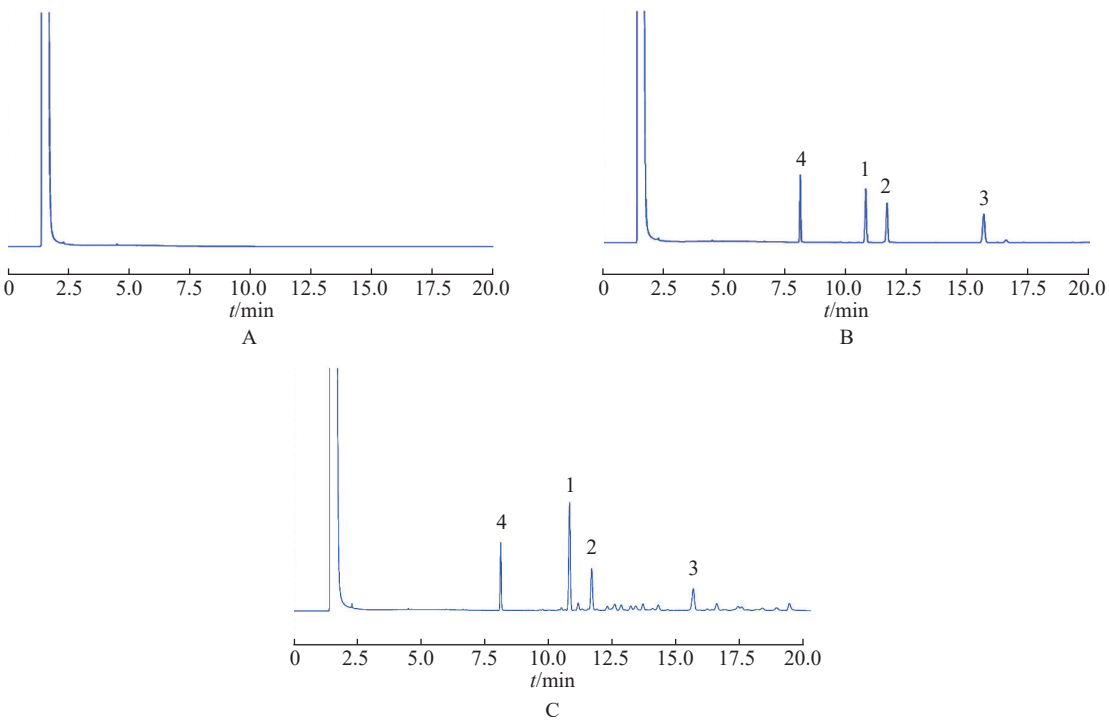
2.4.4 重复性与中间精密度试验

取“**2.1**”项下制备的挥发油，按“**2.3**”项下方法配制供试品溶液，平行制备 6 份，按“**2.2**”项下色谱条件进样测定，按内标法计算样品中 **1**、**2**、**3** 的含量。结果显示，挥发油样品中 **1**、**2**、**3** 含量测定值的 RSD（n=6）分别为 0.49%、0.55%、0.61%，表明本法的重复性良好。

于不同日期、不同人员重复上述操作，按内标法计算每份样品中 **1**、**2**、**3** 的含量。结果显示，挥发油样品中 **1**、**2**、**3** 含量测定值的 RSD（n=6）分别为 1.38%、1.42%、1.58%，说明本法的中间精密度良好。

2.4.5 稳定性试验

取“**2.1**”项下制备的挥发油，按“**2.3**”项下方法配制供试品溶液，并取“**2.3**”项下的混合对照品溶液，分别于室温放置 0、2、4、6、8、12、24 h 时按“**2.2**”项下色谱条件进样测定。结果显示，混合对照品溶液和供试品溶液在 24 h 内基本保持稳定，其待测物与内标物峰面积比值的 RSD 均小于



A—无水乙醇（空白溶剂）；B—混合对照品溶液；C—供试品溶液。

1—**1**；2—**2**；3—**3**；4—**4**。

图 2 典型色谱图

Fig.2 Typical Chromatograms

表 1 线性试验、LOD 和 LOQ 结果

Tab.1 Results of Linearity Test, LODs and LOQs

化合物	线性回归方程	*r*	LOD/(μg·mL^{-1})	LOQ/(μg·mL^{-1})
1	*R*=20.932 23*c* − 0.000 50	0.999 9	0.087	0.35
2	*R*=18.608 13*c* − 0.000 67	0.999 9	0.085	0.34
3	*R*=16.520 67*c* − 0.006 36	0.999 9	0.180	0.54

3%。

2.4.6 加样回收率试验

精密称取 **1**、**2**、**3** 对照品适量，置 10 mL 量瓶中，加入无水乙醇溶解并定容，制得 **1**、**2**、**3** 质量浓度分别为 0.504、0.247、0.204 mg/mL 的混合对照品试验溶液。精密称取已知含量的挥发油样品 25 mg，置 10 mL 量瓶中，加入无水乙醇溶解并定容，作为供试品贮备液。分别精密量取供试品贮备液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，按不同加样水平（50%、100%、150%）分别加入混合对照品试验溶液，每个水平平行配制 3 份，加入无水乙醇定容；分别精密移取上述溶液 1 mL，加入内标溶液 1 mL，摇匀，过滤，取续滤液，按“**2.2**”项下色谱条件进行测定并记录色谱图，计算挥发油样品中 **1**、**2**、**3** 的平均加样回收率。

结果显示，各加样水平挥发油样品中 **1**、**2**、**3** 的平均加样回收率（*n*=9）分别为 107.12 %、99.01%、93.30%，RSD（*n*=9）分别为 2.33%、1.14%、1.61%，符合含量测定要求，表明本法测定的含量结果准确可靠。

2.4.7 耐用性试验

取“**2.3**”项下的混合对照品溶液和供试品溶液，分别考察起始柱温变化（±5 ℃）、载气流速变化（±0.5 mL/min）、进样口温度变化（±10 ℃）、检测器温度变化（±10 ℃）的情况对样品含量测定结果的影响。结果显示，上述色谱参数在小范围波动

时，含量测定结果稳定，表明本法耐用性良好。

2.5 样品测定

取工业大麻花叶样品（批号 DM-Y-20190909、DM-Y-011、DM-Y-013），按“**2.1**”项下方法制备挥发油样品，按“**2.3**”项下方法配制供试品溶液和混合对照品溶液，按“**2.2**”项下色谱条件进样测定，以内标法计算各样品中 **1**、**2**、**3** 的含量，结果如表 2 所示。

表 2　样品含量测定结果

Tab.2　Determination Results of Samples

药材批号	提取率/%	含量测定值/%		
		1	**2**	**3**
DM-Y-20190909[1)]	0.08	3.93	2.05	28.23
DM-Y-011[1)]	0.11	19.95	10.04	8.60
DM-Y-011[2)]	0.08	18.94	8.77	10.80
DM-Y-012[3)]	0.16	7.78	4.80	11.45
DM-Y-013[2)]	0.20	20.14	13.02	11.50
DM-Y-013[3)]	0.16	16.02	10.10	9.89

注：[1)] 为 2021 年 7 月提取挥发油，[2)] 为 2022 年 7 月提取挥发油，[3)] 为 2022 年 12 月提取挥发油。

3　讨论

3.1 工业大麻花叶中挥发油的提取

本研究采用的水蒸气蒸馏法充分利用了提取物的易挥发性，既能实现完全提取，又能最大程度排除非挥发性组分，如同样是倍半萜烯类植物大麻素的干扰，为简便、准确测定工业大麻花叶中挥发油的含量提供了较理想的供试品制备方法。一般，有机溶剂提取或超临界流体萃取时会同时提取出大量非目标待测物，给色谱分析带来较大干扰，因此不推荐作为首选方法。

水蒸气蒸馏法的提取条件如温度、时间、料液比等会直接影响挥发油的提取效果，因此预试验中考察了提取时间（5、9 h）、加热温度（120、140、160、180、200 ℃）、料液比（向工业大麻花叶 500 g 中加入 6、8、10、12、14 倍量水）对挥发油提取率及其中 **1**、**2**、**3** 含量的影响，以优化提取条件。结果表明，挥发油提取量在前 5 h 逐渐达到稳态且其中 **1**、**2**、**3** 的含量变化不大；在一定范围内提高加热温度，可增加挥发油的提取率，但高于 160 ℃ 时，提取量不再增加，且其中 **1** 和 **2** 的含量逐渐下降、**3** 的含量逐渐上升；料液比可在一定程度上影响挥发油的提取率，但对其中 **1**、**2**、**3** 的含量影响不明显，加 8 倍量水即可达到良好的提取效果。因此，最终选定了“**2.1**”项下的提取条件。

3.2 色谱条件的优化

由于气相色谱进样量为 1 μL，操作误差相对较大，因此采用内标法测定以减小结果的偏差。通过系列比较和摸索试验，最终选择 **4** 作为内标物，可与国内工业大麻挥发油中含有的其他组分达到良好分离。

3.3 国内工业大麻中挥发油的变化

采用建立的方法测定不同年份、不同批次原料中的挥发油。结果显示，较早年份的原料中挥发油的提取率明显较低，且其中 **1** 和 **2** 的含量有所下降、**3** 的含量有所上升，提示挥发油中的成分在贮存过程中不仅有损失，还会发生转化，因此需要关注贮存条件的影响，后续将收集更多批次样品，做进一步研究。

参考文献：

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 223.

[2] RADWAN M M, CHANDRA S, GUL S, *et al*. Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis [J]. *Molecules*, 2021, **26**(9): 2774.

[3] KOLTAI H, NAMDAR D. Cannabis phytomolecule ‘Entourage’: from domestication to medical use [J]. *Trends Plant Sci*, 2020, **25**(10): 976-984.

[4] RUSSO E B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, **163**(7): 1344-1364.

[5] YOKUBAITIS C G, JESSANI H N, LI H, *et al*. Effects of cannabidiol and beta-caryophyllene alone or in combination in a mouse model of permanent ischemia [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(6): 2866.

[6] 孙　静, 周　靖, 罗嘉嘉, 等. GC-MS 和 UPLC-Q-TOF-MS 法测定工业大麻花叶中的化学成分[J]. 中国医药工业杂志, 2022, **53**(10): 1465-1481.

[7] TAMBE Y, TSUJIUCHI H, HONDA G, *et al*. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, β-caryophyllene [J]. *Planta Med*, 1996,

62(5): 469-470.

[8] DAHHAM S S, TABANA Y, ASIF M, *et al*. β-Caryophyllene induces apoptosis and inhibits angiogenesis in colorectal cancer models [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(19): 10550.

[9] PAULA-FREIRE L I G, ANDERSEN M L, GAMA V S, *et al*. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice [J]. *Phytomedicine*, 2014, **21**(3): 356-362.

[10] MACHADO K C, ISLAM M T, ALI E S, *et al*. A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene [J]. *Phytother Res*, 2018, **32**(12): 2376-2388.

[11] GERTSCH J, LEONTI M, RADUNER S, *et al*. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, **105**(26): 9099-9104.

[12] CHEN H, YUAN J, HAO J, *et al*. α-Humulene inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and induces apoptosis through the inhibition of Akt signaling [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, **134**: 110830.

[13] NUUTINEN T. Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus* [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, **157**: 198-228.

[14] TISSERAND R, YOUNG R. Essential oil safety: a guide for health care professionals [J]. *J Herb Med*, 2013, **4**(3): 172-173.

（上接第583页）

[10] 朱广辉, 刘博峰, 朱德志. 一种盐酸氨溴索掩味制剂及其制备方法: 中国, 108113971A [P]. 2018-06-05.

[11] BERND P, KATRIN B, UWE S, *et al*. Cough medicine containing ambroxol hydrochloride: AU, 2015261940B2 [P]. 2020-07-09.

[12] 侯新朴. 物理化学(第6版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 208-214.

[13] ÖNCEL H, ÇAPAN Y, PINARBAŞLI O, *et al*. Stabilized pharmaceutical syrup composition comprising terbutaline sulphate and ambroxol hydrochloride: WO, 2018/182546 A1 [P]. 2020-07-08.