

提取方法对汉麻叶大麻素成分及 体外降糖降脂功能的影响*

李德海^{1,2}, 马可¹, 张道明¹, 尹静¹

1. 东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040
2. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 以汉麻浸膏得率、大麻二酚(CBD, cannabidiol)、四氢大麻酚(THC, tetrahydrocannabinol)含量为评价指标, 研究了溶剂提取法、酶辅助提取法、超声波辅助与高剪切辅助对小叶汉麻中大麻素类成分的制备效果, 进一步采用超高效液相高分辨质谱联用仪分析了大麻素成分, 并对比分析了以上 4 种提取方法制备的小叶汉麻中大麻素浸膏的体外降糖降脂功能的差异性。试验结果表明: 超声波辅助提取法制备的小叶汉麻大麻素效果最好, 汉麻浸膏得率为 7.06%, 浸膏中 w_{CBD} 为 283.04 mg/g, 浸膏中 THC 未检出。超高效液相高分辨质谱联用仪对 4 种方法制备的汉麻浸膏进行检测, 其中超声波辅助提取法含有的大麻素成分为 8 种, 并且浸膏中 w_{CBD} 最高。体外降糖降脂试验结果表明, 随着大麻素浸膏质量浓度的增加, 4 种提取方法制备大麻素的降糖降脂效果均显著提高, 综合分析试验结果可以看出, 超声波辅助提取法制备的大麻素浸膏降糖降脂效果最好, 其中对 α -葡萄糖苷酶抑制率的 IC_{50} 值为 0.20 mg/mL, α -淀粉酶的抑制率 IC_{50} 值为 0.50 mg/mL, 对胆酸钠结合率的 IC_{50} 值为 4.88 mg/mL, 甘氨酸钠结合率的 IC_{50} 值为 8.64 mg/mL, 牛磺胆酸钠结合率的 IC_{50} 值为 12.14 mg/mL。本实验研究结果为汉麻叶大麻素成分制备及在辅助调节血糖血脂等健康产品中的应用提供参考。

关键词: 提取方法; 大麻素; 降糖降脂; 成分分析

中图分类号: TS209 文献标志码: A 文章编号: 2097-0137(2022)05-0094-11

Effects of extraction methods on cannabinoids in hemp leaves and *in vitro* hypoglycemic and lipid-lowering functions

LI Dehai^{1,2}, MA Ke¹, ZHANG Daoming¹, YIN Jing¹

1. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China
2. Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150040, China

Abstract: The extraction yield of hemp extract, cannabidiol (CBD) and tetrahydrocannabinol (THC) contents were used as evaluation indexes to investigate the effects of solvent extraction, enzyme assisted extraction, ultrasonic assisted and high shear assisted on the preparation of cannabinoids and the composition of cannabinoid was also analyzed by ultra-performance liquid mass spectrometry (UPLC). The difference of the hypoglycemic and lipid-lowering functions of cannabinoid extract from hemp prepared by the above four extraction methods was further compared and analyzed *in vitro*. The results showed that the ultrasonic assisted extraction method had the best effect of cannabinoid, and the

* 收稿日期: 2021-09-22 录用日期: 2021-10-13 网络首发日期: 2022-01-07
基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (2572019BA04); 哈尔滨市科技局创新研究基金 (2017RAQXJ091); 黑龙江省自然科学基金 (C2015062)
作者简介: 李德海 (1976年生), 男; 研究方向: 食品化学; E-mail: lidelai@nefu.edu.cn

yield of hemp extract was 7.06%, w_{CBD} in the extract was 283.04 mg/g. THC was not detected in the extract. UPLC was used to detect the hemp extract prepared by four methods. Among them, ultrasound-assisted method contained 8 kinds of cannabinoids, and w_{CBD} in the extract was the highest. Hypoglycemic lipid-lowering *in vitro* test results showed that, with the increase of cannabinoid extract concentration, four kinds of extraction methods of preparing cannabinoid hypoglycemic lipid-lowering effect were significantly improved. Comprehensive analysis of test results showed that ultrasonic assisted preparation of cannabinoid extract hypoglycemic lipid-lowering effect is best, among which, alpha glycosidase enzyme inhibition rate of IC_{50} value concentration was 0.20 mg/mL, the IC_{50} value of α -amylase was 0.50 mg/mL, the IC_{50} value of sodium cholate binding rate was 4.88 mg/mL, the IC_{50} value of sodium glycocholate binding rate was 8.64 mg/mL, and the IC_{50} value of sodium taurocholate binding rate was 12.14 mg/mL. The results of this study would provide references for the preparation of hemp leaf cannabinoid and its application in regulating blood glucose and lipid.

Key words: extraction methods; cannabinoid; lowering glucose and lipid; composition analysis

汉麻 *Cannabis sativa* L. 是一种一年生雌雄异株的草本植物, 早期汉麻因其茎秆、叶子中含有丰富的纤维被广泛用于纺织工业中。近年来汉麻种子、叶子和其副产物中含有丰富的蛋白质、油脂、大麻素和非大麻素等成分而在化妆品、药品和食品工业中得到广泛研究与应用。虽然汉麻因含有致幻成瘾的四氢大麻酚 (THC) 导致在许多地区被禁止使用, 但 THC 在医药治疗疾病时可以用作麻醉剂^[1]。为避免非法使用大麻作为毒品来娱乐吸食等, 仅允许培养 $w_{\text{THC}} < 0.2\%$ 的工业大麻^[2]。研究表明汉麻中含有丰富的大麻二酚 (CBD)、大麻色烯、大麻环萜酚等大麻素类化合物, 具有防治慢性疾病、增强记忆力、改善睡眠、降血糖血脂与抗氧化等作用。其中 CBD 在高血糖状态下对人体视网膜微血管内皮细胞 (HRCECs) 的增长具有一定的抑制作用, 进而影响核转录因子 (FOXO3a) 的活性, 最终抑制血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达^[3]。内源性大麻素系统可以降低肥胖小鼠空腹血糖、空腹胰岛素水平, 通过拮抗剂抑制大麻素受体 2 (CB2 受体) 起到控制肥胖和调节血糖水平的作用^[4]。另外大麻籽油中含有大麻二酚、大麻酚、大麻萜酚等主要成分, 可以显著降低血清和肝脏的 Lee's 指数、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白水平、丙二醛含量、肾脏和附睾周围脂肪组织的含量, 提高血清和肝脏的高密度脂蛋白水平, 增强超氧化物歧化酶活性, 具有显著的降血脂功效^[5]。可见大麻酚类化合物具有调节血糖血脂的功能, 对高血脂高血糖患者有辅助调节作用。

大麻素是大麻植株特有的活性成分, 其中 w_{CBD} 仅有 1%~3%, 这部分物质的提取、分离纯化是该

研究领域的难题, 选择适用于大麻素的提取方法对其纯度的提高与产品开发利用具有深远影响。目前关于火麻仁油中提取大麻素类化合物的报道指出, 利用超声波辅助提取法确定最佳提取工艺, 使火麻仁油中大麻素类化合物提取得较完全, 为其中大麻酚类化合物的含量测定奠定基础^[6]。以火麻叶为原料采用热回流法提取大麻素中的大麻二酚, 此法对浸膏得率与 w_{CBD} 有显著影响, 但因需要加热, 故有消耗能量且费时费力的缺点^[7]。为了进一步提高大麻素的提取效率, 通过对超临界二氧化碳萃取温度、萃取时间、夹带剂用量、萃取次数进行筛选, 提高了 3 种大麻酚的提取率, 并且具有优良的抑菌性能^[8]。但是超临界二氧化碳设备投资大、能耗高, 显著提高了制备成本。近年来, 生物酶法、超声波^[9]与高剪切辅助^[10]等提取方式在成分提取方面越来越受到大家的关注, 通过细胞壁分解酶对工业大麻叶进行酶解, 经过溶剂萃取、脱色等过程, 能够大大提高大麻二酚的提取率^[11]。采用超声波技术从汉麻花中提取生物活性化合物多酚、黄酮与大麻素, 使抗氧化活性有明显的增强^[12]。高剪切辅助提取法^[13]至今并未有研究用于汉麻提取, 因易操作且设备简单、提取效率高、节约能源等优点, 越来越受到重视。

因此本试验为建立一种高效且保持大麻素活性的制备方法, 以小叶汉麻为原料, 探究了溶剂提取法、酶辅助提取法、超声波辅助提取法、高剪切辅助提取法 4 种提取方式对大麻素浸膏得率、 w_{CBD} 以及体外降血脂血糖的影响, 旨在为推动汉麻资源的利用及开发具有调节血糖血脂作用的健康产品提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小叶汉麻: 产自黑龙江青冈县, 取叶子进行 60 °C 烘干, 粉碎, 过 60 目筛备用。

试剂: 对硝基苯- α -D-葡萄糖苷(PNPG), 上海麦克林生化科技有限公司; 牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、胆酸钠, 上海金穗生物科技有限公司; α -淀粉酶(76 000 U/mg)、 α -葡萄糖苷酶(70 万 U/mL)、纤维素酶(50 U/mg)、果胶酶(500 U/mg)、胃蛋白酶(3 000 U/mg)、胰蛋白酶(75 U/mg), 上海源叶生物科技有限公司; 大麻二酚标准品, 云南汉素生物科技有限公司; 四氢大麻酚标准品, 美国 Sigma 公司; 甲醇为色谱级; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Thermo Fisher Q Exactive Focus 型超高效液相质谱联用仪, 美国 Thermo 公司; Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; TGL-16G 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; AL-1041C 分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; DK-8D 电热恒温水槽, 上海森信实验仪器有限公司; RE-52 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器公司; KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; FLUKO 高剪切乳化机, 上海弗鲁克流体机械制造有限公司; EPOCH12 型酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 不同提取方法制备汉麻叶大麻素浸膏 取一定量汉麻叶粉, 分别采用以下 4 种方法进行处理。

溶剂提取法^[14] 按照料(m , g):液(V , mL)=1:4 分别加入提取剂($\varphi=70\%$ 乙醇、 $\varphi=80\%$ 乙醇、 $\varphi=90\%$ 乙醇、 $\varphi=95\%$ 乙醇、无水乙醇、石油醚、正己烷, 以及 $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{二氯甲烷}}=4:6$), 在 25 °C 下转速为 500 r/min 的搅拌器中搅拌 2.0 h。

酶辅助提取法根据参考文献[15]稍做修改, 预实验基础上, 使用 pH 5.0 的磷酸盐缓冲溶液配制酶液。按料(m , g):液(V , mL)=1:10 加入酶液, 酶的添加量分别为: 纤维素酶 250 U/g(汉麻叶粉)、果胶酶 2 500 U/g、纤维素果胶复合酶 2:1(500 U/g: 2 500 U/g)。在温度 50 °C 摇床内分别酶解时间(0.25、0.5、0.75、1.0 h), 酶解后放入 100 °C 中灭活 5 min。取出冷却至室温, 4 000 r/min 离心 15 min 取沉淀, 再加入料(m , g):液(V , mL)=1:4 的最佳提取溶剂(由溶剂提取法确定), 然后将其

置于转速为 500 r/min 的搅拌器中快速搅拌 3 h。

超声波辅助提取法^[16] 以料(m , g):液(V , mL)=1:4 加入最佳提取溶剂(由溶剂提取法确定), 超声温度 30 °C, 考察超声时间(20、25、30、35、40 min)、超声功率(180、240、300 W), 超声处理后溶剂提取 30 min。

高剪切辅助提取法^[17] 以料(m , g):液(V , mL)=1:4 加入最佳提取溶剂(由溶剂提取法确定), 高剪切速率分别为(12 000、14 000、16 000、18 000 r/min), 剪切时间(30、60、90、120、130 s)启动高剪切 10 s, 暂停 20 s 为 1 个周期, 溶剂再提取 30 min。

以上所有样品处理后, 全部过滤取滤液。平行试验 3 次, 得提取液, 在 60 °C、0.05 MPa 条件下进行旋蒸除掉溶剂, 得到膏状物, 该物质即为含有汉麻素的浸膏。分别以大麻素浸膏得率、 w_{CBD} 、 w_{THC} 为指标来评价提取效果。

1.3.2 汉麻叶中大麻素浸膏得率测定 分别称取汉麻叶粉, 按 1.3.1 方法, 在设定的温度、时间等条件下提取, 冷却抽滤, 将滤液在 60 °C 下旋蒸浓缩制得浸膏。浸膏得率为

$$Y = \frac{G_1}{G_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中 Y 为浸膏得率(%); G_1 为浸膏的质量(g); G_2 为汉麻叶粉的质量(g)。

1.3.3 汉麻浸膏中 CBD 与 THC 含量测定 采用高效液相色谱法检测, 取汉麻叶的大麻素浸膏用甲醇配制成质量浓度 1 mg/mL, 微孔滤膜滤过, 取滤液作为供试品溶液。参考孙孔春等^[18] 的方法, 稍做修改。标准曲线的绘制: 称取 10.000 1 mg 大麻二酚标准品, 以甲醇定容制成母液($\rho=1$ mg/mL), 分别取 20、40、80、120、160、200 μ L, 均放置于 2 mL 容量瓶中, 配制成 ρ 为 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL 的标准品溶液。按条件进行检测, 以大麻二酚质量浓度 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线。 $Y=11.87X-40.126$, $R^2=0.9906$, 同以上方法配置四氢大麻酚标准品, 绘制标准曲线 $Y=22.172X-1.536$, $R^2=0.9999$ 。适用范围: 0.01 ~ 0.1 mg/mL。色谱条件: 色谱柱, Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流速, 1.0 mL/min; 检测波长, 230 nm; 进样量, 10 μ L; 柱温, 30 °C; 以 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=85:15$ 为流动相进行等度洗脱。在此色谱条件下, 取大麻素样品进样分析。

1.3.4 超高效液相质谱联用技术对浸膏中大麻素类成分分析 取 4 种提取方法制备的汉麻叶浸膏

0.001 0 g用甲醇定容至10 mL, 8 000 r/min离心20 min, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取滤液作为样品溶液备用。UPLC-Q Exactive Focus MS/MS分析条件:使用GOLD VANQUISH色谱柱, 100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μm ; 流动相A为甲酸水溶液, $\varphi=0.1\%$, B为甲醇溶液; 梯度洗脱的设置如下:从 $\varphi=2\%$ 到 $\varphi=98\%$ B的线性梯度为0.0~9.0 min; 9.1~12.0 min $\varphi=98\%$ B; 12.1~15.0 min回到 $\varphi=2\%$ B, 平衡柱5 min, 总运行时间为15 min。柱温40 $^{\circ}\text{C}$; 流速设定为0.350 mL/min; 样品进样量为5 μL 。

质谱同时在正、负离子模式下检测:电喷雾离子化电离源(HESI);毛细管温度320 $^{\circ}\text{C}$;汽化器温度350 $^{\circ}\text{C}$;电喷雾电压3 kV;鞘气体积流量40个单位;辅助气体积流量10个单位;质谱分辨率17 500 FWHM;扫描范围为 m/z 80~1 200;AGC设置为 $1e^5$;NCE值分别为20、40和60 eV。

采用Compound Discoverer 3.2软件和compounds化学成分数据库信息进行匹配,初步进行分析,与ChemSpider、mzCloud、mzVault等数据库对比。通过质谱图、相对分子质量、一级、二级碎片离子和化学结构与参考文献信息分析后确定物质名称与分类^[19]。

1.3.5 大麻素类体外降血糖功能的研究 α -葡萄糖苷酶抑制率的测定:取50 μL 0.5 U/mL的 α -葡萄糖苷酶溶液置于96孔板中,再分别加入不同质量浓度(0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、2.0、5.0 mg/mL)的大麻素样品液100 μL ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min,加入10 mmol/L PNPG 50 μL ,再放入37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中加热10 min,最后使用0.1 mol/L Na_2CO_3 100 μL 终止反应,在酶标仪上于405 nm处测定吸光度 A_1 ;另取100 μL pH 6.8磷酸盐缓冲液代替大麻素样品液测定吸光度 A_2 ;为消除反应体系干扰,在不加 α -葡萄糖苷酶溶液条件下分别测定只加入大麻素样品液反应体系的吸光度 A_3 和只加入磷酸盐缓冲液反应体系的吸光度 A_4 。 IC_{50} 值是通过不同质量浓度大麻素样品液对 α -葡萄糖苷酶抑制率的计算而得。

α -淀粉酶抑制率的测定:取50 μL 0.5 U/mL的 α -淀粉酶液溶液置于96孔板中,再分别加入不同质量浓度(0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、2.0、5.0 mg/mL)的大麻素样品液100 μL ,放入37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中10 min,加入 $w=0.2\%$ 淀粉溶液50 μL ,再次37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min后,使用显色剂(5 mmol/L I_2 和5 mmol/L KI溶于1 mol/L HCl) 100 μL 终止反应,在酶标仪上于620 nm处测定吸光度 A_1 ;另取

100 μL pH 6.8磷酸盐缓冲液代替大麻素样品液,测定吸光度 A_2 ;再测定只有大麻素样品液反应体系的吸光度 A_3 和只有磷酸盐缓冲液反应体系的吸光度 A_4 。 IC_{50} 值是通过不同质量浓度大麻素样品液对 α -淀粉酶抑制率的计算而得。

每组试验3次平行,公式如下

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{A_3 - A_1}{A_4 - A_2}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中 A_1 为样品组吸光度, A_2 为样品空白组吸光度, A_3 为样品对照组吸光度, A_4 为空白对照组吸光度。

1.3.6 大麻素类体外降血脂功能的研究 胆酸盐结合能力的测定:准确吸取1 mL大麻素样品液于试管中,依次加入1 mL 10 mg/mL胃蛋白酶(以pH 6.3的0.1 mol/L磷酸缓冲液配制),3 mL 0.01 mol/L的HCl溶液,模拟胃环境,在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡消化1 h;以0.1 mol/L的NaOH溶液调节pH值至6.3,随后加入4 mL 10 mg/mL胰蛋白酶,模拟肠道环境,在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡消化1 h,加入4 mL 1 mmol/L胆酸盐(胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠)消化1 h,8 000 r/min离心20 min,取上清液,加入6 mL $\varphi=60\%$ 的 H_2SO_4 于70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴20 min,取出冰浴5 min后,在387 nm处测定吸光度 A_e ,另取1 mL pH 6.3的0.1 mol/L磷酸缓冲液代替大麻素样品液,测定吸光度 A_0 ;再测定只有大麻素样品液反应体系并用磷酸缓冲液代替 H_2SO_4 的吸光度 A_i 。 IC_{50} 值是通过不同质量浓度大麻素样品液对胆酸盐结合率的计算而得,平行3次实验,计算样品对胆酸盐结合率^[20]计算公式如下

$$\text{胆酸盐结合率} = \left(1 - \frac{A_e - A_i}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (3)$$

式中 A_0 为样品空白组吸光度, A_e 为样品组吸光度, A_i 为样品对照组吸光度。

1.4 数据处理与分析

每个处理进行平行3次试验,结果表示为平均值 \pm 标准差。采用Origin、SPSS软件对数据进行处理与分析,利用置信度为95%的最小显著性差异($P<0.05$)比较平均值。

2 结果与讨论

2.1 提取方法对大麻素浸膏得率影响

图1(a)~(d)通过汉麻浸膏得率、 w_{CBD} 、 w_{THC} 为评价指标,得到4种提取方法的最佳提取条件。分析图1(a)可知,大麻素浸膏得率随着乙醇体积分数的增加而增大,其中无水乙醇制备的大麻素浸膏得率最大,为9.43%,其次是 $\varphi=95\%$ 乙醇制备

的浸膏得率为 3.95%。而乙醇/二氯甲烷制备的浸膏得率为 3.25%，显著低于无水乙醇和 $\varphi=95\%$ 乙醇分别制备浸膏的得率，正己烷和石油醚制备的浸膏得率效果更低。汉麻浸膏中 w_{CBD} 检测结果表明 $\varphi=95\%$ 乙醇制备的浸膏中 w_{CBD} 最高，值为 241.80 mg/g，显著高于无水乙醇制备的汉麻浸膏 w_{CBD} 。无水乙醇作为提取溶剂会导致汉麻叶中更多非大麻素类化合物溶出，导致汉麻浸膏量增加，而浸膏中 w_{CBD} 降低会影响大麻素的纯度，不利于后续大麻素类化合物的分离纯化和浓缩单元操作，增大工作量和能耗^[21]，因此本实验选取 $\varphi=95\%$ 乙醇为最佳提取剂。由图 1(b)可知，浸膏得率随着超声时间的增加呈现先升高后降低的趋势，当超声功率为 300 W 时，超声时间 30 min 时浸膏得率达到最大，为 10.03%。其次是超声功率为 240 W 时，超声时间为 25 min 浸膏得率较大为 8.68%。当超声功率为 180 W 时，超声时间为 30 min 浸膏得率为 7.75%，显著低于前两种条件浸膏得率。当超声功率为 300 W，超声时间 25 min 时浸膏得率 7.06%，但是大麻素浸膏中 w_{CBD} 检测值为 283.04 mg/g，显著高于超声功率为 300 W，超声时间 30 min 时大麻素浸膏 w_{CBD} 。随着超声功率的增大，细胞的破碎程度变大，但是过大的超声功率会使大麻素类化合物被破坏，过多杂质溶出。适宜的超声时间会使细胞中的物质更好地溶出，如果时间过长或过短都会对大麻素有影响^[22-23]。经过各方面考虑，选用超声功率 300 W、超声时间 25 min 作为超声提取最佳条件。

图 1(c)实验结果表明，随着酶解时间延长得率逐渐增大，直到 1 h 达到最大，随后逐渐降低。经过纤维素酶和果胶酶处理的样品，酶解 1 h 其浸膏得率最大分别为 19.90%、19.98%，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^[24]，进而提高大麻素的提取。并且这两种酶的效果差异性不显著，这表明汉麻叶细胞壁主要成分是纤维素和果胶。纤维素与果胶进行复合酶解 1 h，其浸膏得率达到了 21.11%，浸膏中 w_{CBD} 检测值最高为 $w=24.98$ mg/g，其效果明显优于单一酶，选用复合酶酶解时间 1 h 作为酶辅助提取法提取最佳条件。如图 1(d)所示，在 4 个速率条件下，浸膏得率随时间的增加而先升高后降低。高剪切速率为 16 000 r/min 时，高剪切时间 90 s 时，浸膏得率达到最大值 7.5%，其次高剪切速率为 14 000 r/min 时间 120 s 时浸膏得率为 7.25%，而高剪切速率为 14 000 r/min 时间 130 s 时

浸膏得率为 6.93%，这是由于相同速率条件下高剪切时间过长对目标物具有破坏性。高剪切速率 14 000 r/min、高剪切时间 60 s 时浸膏得率为 3.00%，显著低于其他条件下浸膏得率，但汉麻浸膏中 w_{CBD} 检测值最大为 161.46 mg/g。在设定的剪切频率范围内，随着剪切频率增大，机械剪切效应增大，气蚀作用增强，导致非大麻素类物质的溶出^[25]。因此，选用高剪切速率 14 000 r/min、高剪切时间 60 s 作为高剪切提取最佳条件。

2.2 HPLC 法测定不同提取方法样品中的 CBD 和 THC 的含量

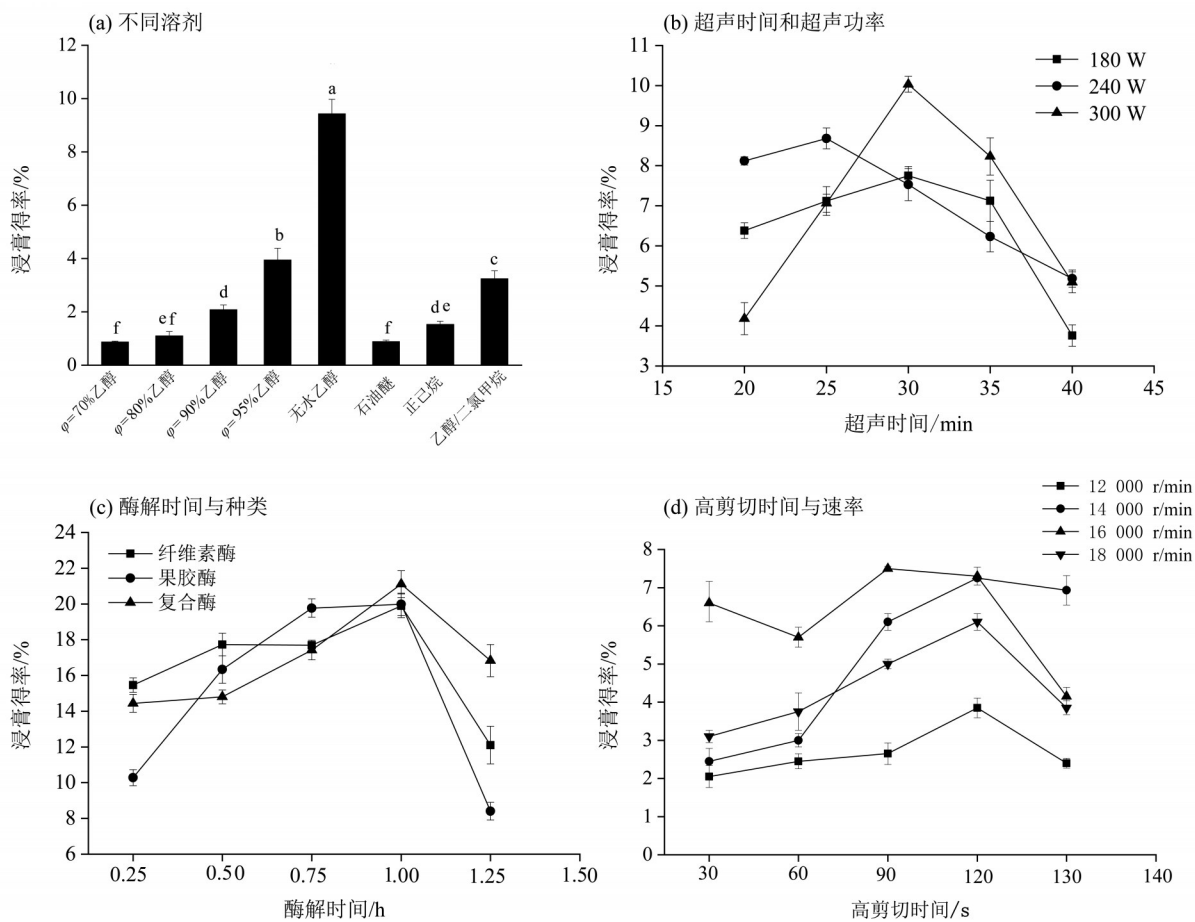
4 种提取方法的汉麻中大麻素含量结果见表 1 所示，通过 4 种样品高效液相色谱图进行比对。由表 1 可知，对于大麻素，超声波辅助提取法可以得到最高含量，且与其他 3 种方法有显著差异 ($P < 0.05$)，其中超声波辅助提取法 w_{CBD} 最大，其值为 (283.04 ± 16.63) mg/g，其次是溶剂提取法与高剪切辅助提取法，而酶辅助提取法 w_{CBD} 最低，其值仅为 (24.98 ± 3.24) mg/g。超声技术由于具有机械效应、空化效应和热效应，通过增大分子的运动速度与穿透力来增加提取效果^[26]。而高剪切技术由于转子高速旋转产生强烈的剪切力和离心挤压力等机械作用，使汉麻叶组织细胞发生变形，细胞壁破裂，加速细胞内物质溶出，虽提高了提取效果^[27]，但是也对大麻素造成部分破坏。采用溶剂提取法直接提取，获得 w_{CBD} 也比较好，但耗时长，不能够快速提取大麻素。通过上述 4 种方法处理后发现，易使人致幻成瘾的 THC 完全被去除，为以后汉麻叶的食品、药品等应用提供科学的依据。

2.3 液相-质谱联用对提取方法萃取物成分分析

2.3.1 UPLC-Q Exactive Focus MS/MS 分析结果

采用 UPLC-Q Exactive Focus MS/MS 超高效液相高分辨质谱联用仪对汉麻叶提取物进行成分分析，所得到的总离子流质谱图如图 2。按照上述数据处理方法对汉麻叶中的大麻素类化合物进行结构推测和确证。目标物存在较多的同分异构体，主要通过质谱裂解方式的不同进行区分。依据化合物的高分辨质谱数据，结合自建数据库等多个数据库比对，12 种物质结合质子分子，总结了准确的相对分子质量、保留时间、分子式和二级碎片，具体鉴定结果见表 2。

2.3.2 大麻素类化合物成分鉴定 研究共分析鉴定了 12 种大麻素类化合物，以含量较多的大麻二酚和大麻色烯为例，二者互为同分异构体。大麻



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 不同提取方法对浸膏得率的影响

Fig. 1 Effects of different extraction methods on the yield of extract

表 1 不同提取方法下浸膏中 w_{CBD} 和 w_{THC} 测定结果¹⁾
Table 1 Determination results of CBD and THC content in extract with different extraction methods

提取方法	w_{CBD}	w_{THC}
溶剂提取法	241.80±14.08 ^b	—
酶辅助提取法	24.98±3.24 ^d	—
超声辅助法	283.04±16.63 ^a	—
高剪切辅助提取法	161.46±13.64 ^c	—

1) 同一列数据后不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 试验结果采用平均值±标准差表示, “—”表示未检测到该成分。

二酚 MS¹ 谱图中显示该化合物的准分子离子峰为 m/z 314.224 5 [M-H]⁻, 可以作为大麻素类化合物的特征离子, 特征离子进一步失去 1 个 H 形成, 其分子式 $C_{21}H_{30}O_2$, 相对分子质量为 314.224 1, 能够很好地吻合。MS² 图谱给出主要的碎片离子分别为 m/z 137.094 9, 179.105 7, 173.095 5, 158.072 1, 205.122 1, 311.200 4。大麻色烯 MS¹ 谱图中显示该

化合物的准分子离子峰为 m/z 314.224 5 [M-H]⁻, 可以作为大麻素类化合物的特征离子, 特征离子进一步失去 1 个 H 形成, 其分子式 $C_{21}H_{30}O_2$, 相对分子质量为 314.224 1, 能够很好地吻合。MS² 图谱给出主要的碎片离子分别为 m/z 191.106 1, 163.075 2, 136.051 1, 136.052 9, 191.107 7, 193.122 3。利用液相色谱质谱联用技术, Gul 等^[28] 对大麻根中的 10 种大麻素类化合物, 包括大麻色烯、 Δ^8 -四氢大麻酚、大麻酚、大麻二酚等, 进行了定量分析。Christinat 等^[29] 采用气相色谱质谱联用法, 对大麻类食品中 15 种大麻素类成分的含量进行了测定, 包括大麻二酚、大麻萜酚、 Δ^9 -四氢大麻酚等。

2.4 不同提取方法对大麻素的体外降血糖影响

α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶在糖类消化以及吸收中发挥着重要的作用, 可抑制酶的活性、降低机体的血糖和血脂水平、防止餐后高血糖的发生, 对 2 型糖尿病的预防及治疗具有积极作用^[30]。

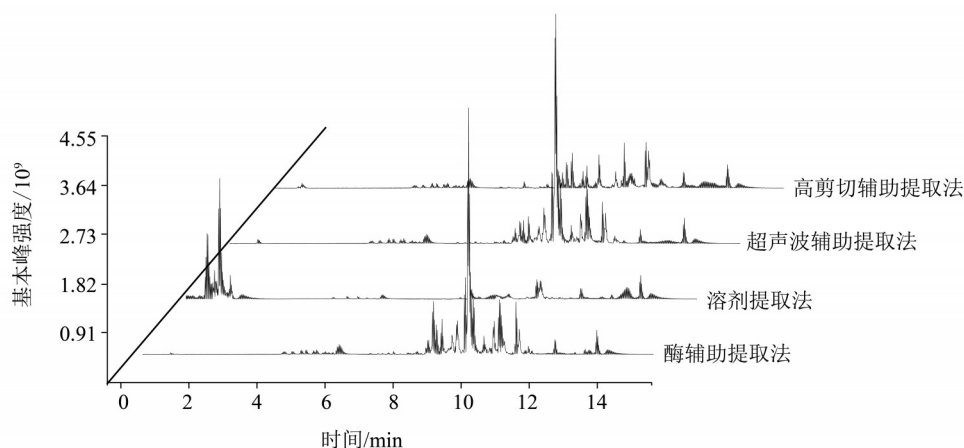


图2 汉麻叶4种方法提取物总离子流质谱图(TIC)

Fig. 2 Total ion mass spectrometry of hemp leaves extracted by four methods(TIC)

表2 汉麻叶大麻素类成分鉴定¹⁾

Table 2 Identification of cannabinoids in hemp leaves

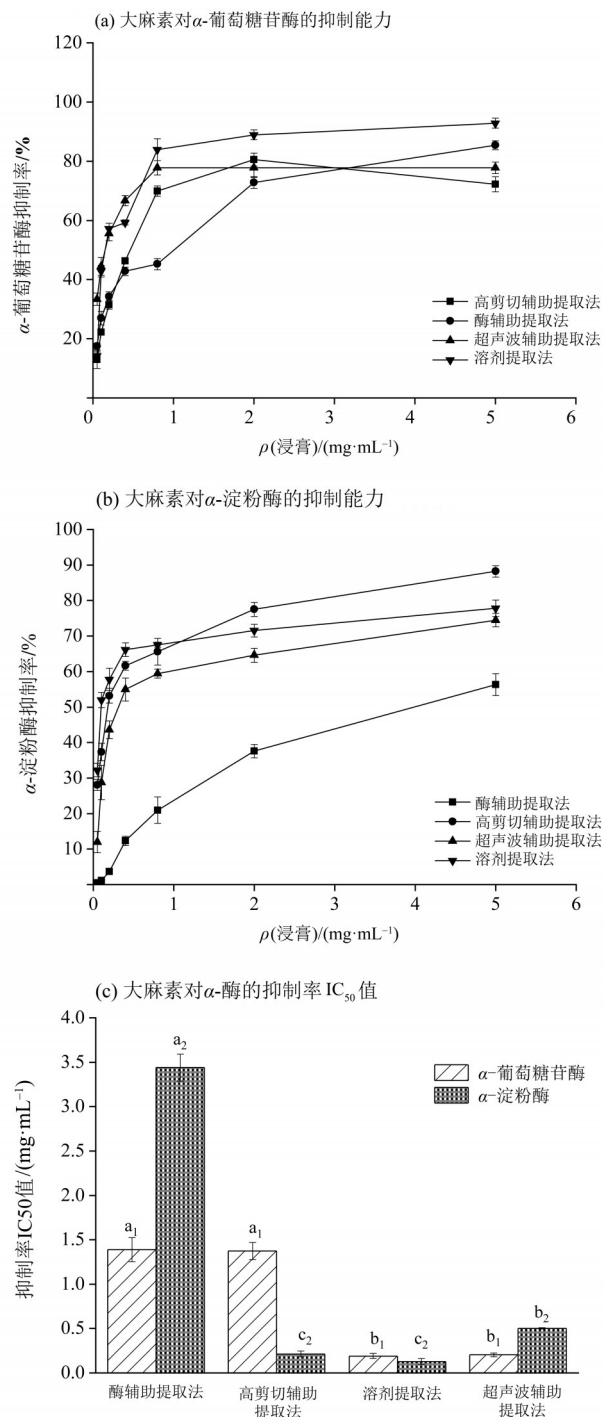
编号	化合物	分子式	准分子离子峰	二级碎片(MS/MS)	提取方法 ²⁾			
					A	B	C	D
1	大麻二酚	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314. 224 5 [M-H] ⁻	137. 094 9, 179. 105 7, 173. 095 5, 158. 072 1, 205. 122 1, 311. 200 4	+	+	+	+
2	大麻色烯	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314. 224 5 [M-H] ⁻	191. 106 1, 163. 075 2, 136. 051 1, 136. 052 9, 191. 107 75, 193. 122 3	+	+	—	—
3	大麻二吡喃环烷	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314. 224 5 [M-H] ⁻	123. 043 3, 193. 120 9, 231. 136 6, 259. 168 0, 79. 054 1, 315. 229 8	—	—	—	—
4	次大麻二酚	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286. 193 2 [M-H] ⁻	165. 091 0, 287. 198 4, 123. 043 2, 231. 136 6, 57. 070 2, 207. 136 3	+	—	—	—
5	大麻酚	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310. 192 3 [M-H] ⁻	279. 172 2, 311. 198 0, 69. 069 9, 279. 138 0, 222. 067 8, 309. 184 4	+	+	+	+
6	大麻二醇	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310. 193 2 [M-H] ⁻	311. 200 5, 223. 110 1, 309. 185 0, 279. 138 0, 190. 077 7, 293. 189 9	+	—	—	—
7	次大麻色酚	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286. 193 2 [M-H] ⁻	163. 074 9, 175. 075 0, 217. 122 5, 285. 186 0, 107. 048 1, 203. 106 8	+	—	—	—
8	大麻二酚酸	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358. 214 4 [M+FA-H] ⁻	79. 053 6, 107. 048 5, 170. 072 3, 227. 143 4	+	+	+	—
9	大麻萜酚酸	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	360. 230 [M-H] ⁻	79. 053 4, 107. 048 4, 191. 106 2, 341. 209	+	+	+	—
10	(+)-大麻二酚	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314. 224 5 [M-H] ⁻	79. 053 5, 107. 048 5, 131. 048 1, 164. 521 3, 191. 164, 203. 106 3	—	+	—	—
11	大麻萜酚	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	371. 219 4 [M+Na] ⁺	191. 106 6, 161. 023 0, 136. 051 3, 205. 123 3, 122. 237 3, 243. 138 5	—	+	—	+
12	反-四氢大麻酚	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	359. 221 9 [M-H] ⁻	191. 062 8, 107. 048 4, 79. 053 4, 341. 209 3, 257. 422 3	—	+	—	—

1) “+”指检测到该成分，“—”未检测到该成分；2) A:高剪切辅助提取法;B:超声波辅助提取法;C:溶剂提取法;D:酶辅助提取法。

不同提取方法获得的大麻素浸膏对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制能力如图3所示, 4种提取方法都呈现随样品浓度增大, 抑制能力逐渐上升的趋势。浸膏质量浓度为0~2 mg/mL时, 4种提取方法的抑制率快速增加, 2~5 mg/mL时抑制率增长缓慢。如图3(a)所示, 在质量浓度为5 mg/mL时, 溶剂提取法对 α -葡萄糖苷酶抑制率最强, 为92.85%, 其次是酶辅助提取法、超声波辅助提取法和高剪切辅助提取法, 分别为85.38%、77.78%、72.22%。溶剂提取法对原料无机械作用与高速剪切破坏, 并且没有酶作用产生大量杂质, 因此对 α -葡萄糖苷酶抑制能力最好, 对汉麻叶分子结构破坏程度较小。如图3(c)所示, 通过软件计算 α -葡萄糖苷酶的半抑制质量浓度分别为酶辅助提取法1.39 mg/mL、高剪切辅助提取法1.37 mg/mL、超声波辅助提取法0.20 mg/mL、溶剂提取法0.19 mg/mL, 超声波辅助提取法与溶剂提取法之间差异不显著($P>0.05$), 超声波辅助提取法与酶辅助提取法和高剪切辅助提取法之间差异显著($P<0.05$), 酶辅助提取法与高剪切辅助提取法之间差异不显著($P>0.05$)。分析图3(b)实验结果可知, 当浸膏质量浓度为2 mg/mL时, 4种提取方法制备大麻素浸膏对淀粉酶的抑制能力不同, 其中高剪切辅助提取法抑制率为77.48%, 溶剂提取法为71.51%, 其次是超声波辅助提取法64.58%, 酶辅助提取法抑制率最小37.57%。当浸膏质量浓度为5 mg/mL时, 其对 α -淀粉酶的抑制能力与质量浓度为2 mg/mL时抑制能力相同, 高剪切辅助提取法具有最大的 α -淀粉酶抑制能力, 为88.22%, 酶辅助提取法具有最小的抑制率为56.32%。不同提取方法的大麻素降血糖能力存在差异, 这可能与大麻素类化合物中其他成分相关。见图3(c)可知, 4种提取方法的大麻素浸膏对 α -淀粉酶抑制率 IC_{50} 值由大到小为: 酶辅助提取法为3.44 mg/mL、超声波辅助提取法为0.50 mg/mL、高剪切辅助提取法为0.21 mg/mL、溶剂提取法为0.13 mg/mL, 高剪切辅助提取法与溶剂提取法之间的差异不显著($P>0.05$), 而酶辅助提取法与超声波辅助提取法之间存在显著性差异($P<0.05$)。

2.5 不同提取方法对大麻素的体外降血脂影响

分别采用溶剂提取法、酶辅助提取法、超声波辅助与高剪切辅助提取法制备大麻素, 按照方法1.3.6, 吸附结合胆酸盐, 并比较分析4种不同提取方法获得大麻素结合甘氨酸胆酸钠、胆酸钠、牛磺胆酸钠的差异。



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

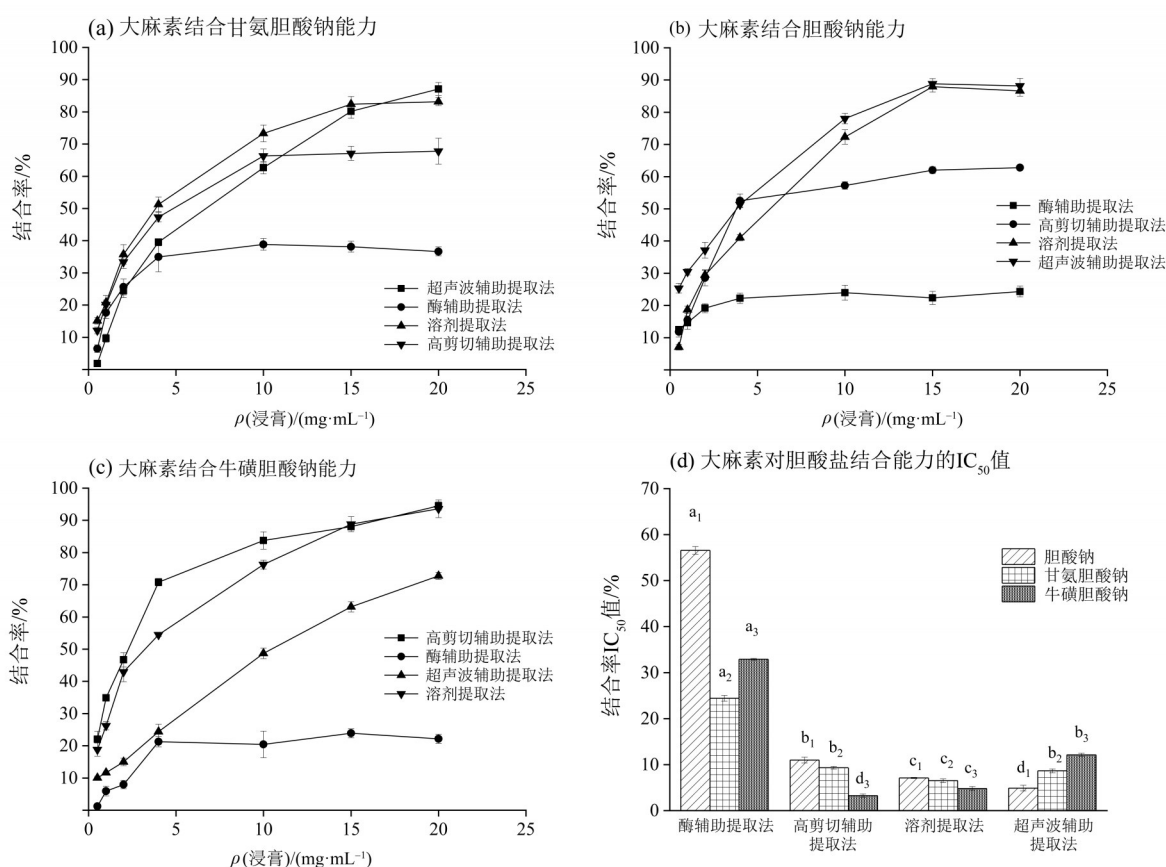
图3 不同提取方法对大麻素的体外降血糖影响

Fig. 3 Effects of different extraction methods on the hypoglycemic effect of cannabinoids *in vitro*

由图4可见, 4种方法提取的大麻素结合3种胆酸盐能力其结合量和质量浓度之间呈明显的剂量效应关系, 随着质量浓度的增加其结合量逐渐上升。由图4(a)所示, 在浸膏质量浓度为15 mg/mL时, 除超声波辅助提取法其他3种提取方法结

合率变化较小,溶剂提取法与甘氨酸胆酸钠结合率最大为 82.41%。当浸膏质量浓度为 20 mg/mL 时,超声提取技术获得的大麻素能力最强为 87.09%,降血脂功能最显著,其次溶剂提取法抑制率为 83.18%、高剪切辅助提取法抑制率为 67.82%、酶辅助提取法抑制率为 36.64%。说明超声技术能促进大麻素的溶出,增强与甘氨酸胆酸钠的结合,加快甘氨酸胆酸钠在肠肝中的循环,胆酸盐排出时会促使肝脏不断把体内胆固醇转化成胆酸盐,促进胆固醇降解代谢,从而起到降血脂的作用^[31]。如图 4(d)所示,当浸膏质量浓度达到 20 mg/mL, IC_{50} 值由大到小分别为酶辅助提取法 56.58 mg/mL、高剪切辅助提取法 11.01 mg/mL、溶剂提取法 7.11 mg/mL、超声波辅助提取法 4.88 mg/mL, 各组间差异性显著 ($P < 0.05$)。由图 4(c)可见,当浸膏质量浓度为 20 mg/mL 时,4 种方法结合率达到最大。高剪切辅助提取法明显优于其他几种提取技术,其对牛磺胆酸钠的结合率为 94.48%, 主要是因为牛磺胆酸钠中磺酸基的酸性比胆酸钠和甘氨酸胆酸钠的羧基更强,在高浓度下更容易离子化,且由于高剪切技术使细胞被迅速破碎,大大减小了有效成分的扩散阻力,大麻素被快速释放,结合量明显增强,降血脂效果明显^[33]。其次是溶剂提取法

胆酸钠的结合率最大为 88.85%, 超声功率逐渐提高,对细胞壁的破损程度逐渐增大,使大麻素快速溶出,提取率升高,增大与胆酸钠的结合量,降血脂作用有一定的提升效果^[32]。其次溶剂提取法胆酸钠结合率较大,为 86.64%,高剪切辅助提取法为 62.79%,酶辅助提取法胆酸钠结合率最小,为 24.32%。如图 4(d)所示,当浸膏质量浓度达到 20 mg/mL,大麻素与胆酸钠结合率 IC_{50} 值由大到小分别为酶辅助提取法 56.58 mg/mL、高剪切辅助提取法 11.01 mg/mL、溶剂提取法 7.11 mg/mL、超声波辅助提取法 4.88 mg/mL, 各组间差异性显著 ($P < 0.05$)。由图 4(c)可见,当浸膏质量浓度为 20 mg/mL 时,4 种方法结合率达到最大。高剪切辅助提取法明显优于其他几种提取技术,其对牛磺胆酸钠的结合率为 94.48%, 主要是因为牛磺胆酸钠中磺酸基的酸性比胆酸钠和甘氨酸胆酸钠的羧基更强,在高浓度下更容易离子化,且由于高剪切技术使细胞被迅速破碎,大大减小了有效成分的扩散阻力,大麻素被快速释放,结合量明显增强,降血脂效果明显^[33]。其次是溶剂提取法



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 4 不同提取方法对大麻素的体外降血脂影响

Fig. 4 Effect of different extraction methods on the hypolipemia of cannabinoids *in vitro*

与超声波辅助提取法对牛磺胆酸钠的结合率分别为93.63%、73.75%,而酶辅助提取法与牛磺胆酸钠结合率最低为22.17%,汉麻叶细胞壁被酶解后使大量杂质溶出,破坏大麻素成分,大大降低提取效率,与牛磺胆酸钠的结合量明显降低,降血脂功能明显低于其他3种方法。如图4(d)所示,当浸膏质量浓度达到最大,牛磺胆酸钠结合率 IC_{50} 值由大到小分别为酶辅助提取法32.91 mg/mL、超声波辅助提取法12.14 mg/mL、溶剂提取法4.83 mg/mL、高剪切辅助提取法3.26 mg/mL,各组间差异性显著($P<0.05$)。

3 结 论

本文通过溶剂提取法、酶辅助提取法、超声波辅助与高剪切辅助4种提取方法制备大麻素类成分,结果表明超声波辅助提取法 w_{CBD} 最高,为

283.04 mg/g;其次是溶剂提取法,为241.80 mg/g;高剪切辅助提取法,为161.46 mg/g;酶辅助提取法最低,为24.98 mg/g。利用UPLC-Q Exactive Focus MS/MS分析可知超声波辅助提取法得到的大麻素成分最多,达到8种。体外降血糖、降血脂试验发现,超声波辅助提取法提取出的大麻素类成分对 α -葡萄糖苷酶与 α -淀粉酶都具有较好的抑制能力,且对胆酸盐结合能力最高。4种方法对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的最好抑制率分别为92.85%和88.22%;不同方法对甘氨酸胆酸钠、胆酸钠和牛磺胆酸钠的结合率分别为87.09%、88.85%和94.48%。研究对4种提取方法进行比较发现,超声波辅助提取法获得的大麻素含量最高,并且都具有较为良好且稳定的降糖降脂功能。因此低成本、高效率的超声波辅助提取法在汉麻资源开发与应用中具有潜在优势。

参考文献:

- [1] CHENG C H, ZANG G G, ZHAO L N, et al. A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. *Industrial Crops & Products*, 2016, 83: 61–65.
- [2] ESCRIVA U, ANDRES-COSTA M J, ANDREU V, et al. Analysis of cannabinoids by liquid chromatography-mass spectrometry in milk, liver and hemp seed to ensure food safety [J]. *Food Chemistry*, 2017, 228: 177–185.
- [3] 张婵, 谭钢. 大麻二醇对高糖条件下视网膜血管内皮细胞表达VEGF的影响及机制[J]. *中国社区医师*, 2019, 35(30): 12–13.
- [4] 陈彦, 许桂平, 陈刚, 等. 大麻素受体2对肥胖小鼠空腹血糖、胰岛素的影响[J]. *中外医疗*, 2014, 33(35): 47–48.
- [5] 赵国玺, 孟露曦, 臧茜茜, 等. 火麻仁油藻油对高脂血症大鼠血脂及脂质过氧化的影响[J]. *中国中医药科技*, 2016, 23(6): 671–673.
- [6] 张岗, 郭江宁, 毕开顺. 正交试验法优选火麻仁油中大麻酚类化合物的提取工艺[J]. *中药材*, 2005(5): 417–418.
- [7] 高哲, 张志军, 李晓君, 等. 火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.
- [8] 张旭, 孙宇峰, 崔宝玉, 等. 超临界 CO_2 萃取汉麻3种大麻酚工艺及其抑菌性研究[J]. *化学试剂*, 2019, 41(4): 415–420.
- [9] KONG S, BUDHIJANTO W, BUDIMAN A. Protein extraction from *Spirulina platensis* by using ultrasound assisted extraction: Effect of solvent types and extraction time [J]. *Key Engineering Materials*, 2021, 872: 33–37.
- [10] JIANG Y L, ZHOU X F, ZHENG Y R, et al. Impact of ultrasonication/shear emulsifying/microwave-assisted enzymatic extraction on rheological, structural, and functional properties of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. seed protein isolates [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112: 1–10.
- [11] 赵平岭. 一种提取工业大麻叶中大麻二酚的方法: CN109232191A [P]. 2019–01–18.
- [12] AGARWAL C, MÁTHÉ K, HOFMANN T, et al. Ultrasound-assisted extraction of *Cannabinoids* from *Cannabis sativa* L. optimized by response surface methodology [J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(3): 1–11.
- [13] 王悦, 徐元元, 杨二林, 等. 酶解结合高剪切破壁技术对蜂花粉酚类物质及抗氧化活性的影响[J]. *农业工程学报*, 2021, 37(2): 313–320.
- [14] ŠAIN A, MATEŠIĆ N, JURINA T, et al. Optimization of ethanol-water solvent extraction of bioactive components originating from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. *Food in Health and Disease, Scientific-Professional Journal of Nutrition and Dietetics*, 2020, 9(1): 30–39.

- [15] 吴俊锋,杨晓泉. 酶辅助溶剂提取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.
- [16] 郭莹,夏林波,邓仕任. HPLC法测定大麻仁中大麻二酚的含量[J]. 化学工程师, 2009, 23(9): 23-24.
- [17] BELLO F, CHIMPHANGO A. Optimization of lignin extraction from alkaline treated mango seed husk by high shear homogenization-assisted organosolv process using response surface methodology[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167: 1379-1392.
- [18] 孙孔春,陈兴龙,杨璨瑜,等. 不同条件下工业大麻中大麻二酚含量变化[J]. 昆明医科大学学报, 2020, 41(5): 23-28.
- [19] 张琪,胡安琪,范倩,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS的柑普茶外果皮、鲜陈皮和鲜沙糖桔皮的全成分对比分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2021, 60(6): 128-141.
- [20] 芦宇,吕长鑫,焦天慧,等. 聚酰胺纯化红树莓籽黄酮及其结合胆酸盐能力评价[J]. 中国食品学报, 2019, 19(10): 172-178.
- [21] LIN L N, YANG J, ZHANG G C, et al. Extraction optimization of insecticidal compounds from *Lysurus mokusin* by response surface methodology[J]. Journal of Forestry Research, 2020, 31(5): 1985-1993.
- [22] KENARI R E, DEGHAN B. Optimization of ultrasound assisted solvent extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil using RSM: Evaluation of oxidative stability and physicochemical properties of oil[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(2): 1-11.
- [23] SHARAYEI P, ELHAM A, SHAHIN Z, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of astaxanthin from green tiger (*Penaeus semisulcatus*) shrimp shell[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 76: 1-9.
- [24] LI M F, ZHANG Q T, CHEN C Z, et al. Interaction with cellulase during enzymatic hydrolysis[J]. Paper and Biomaterials, 2019, 4(4): 15-30.
- [25] SAEJUNG T, DON-IN J, CHIMSOOK T. Preparation of ethanolic butterfly pea extract using microwave assisted extraction and loaded nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for stabilization of fish oil[J]. Key Engineering Materials, 2021, 873: 1-5.
- [26] THATCHAJAREE M, BILAL S M, KUMAR A A. Comparative extraction of bromelain and bioactive peptides from pineapple byproducts by ultrasonic- and microwave-assisted extractions[J]. Journal of Food Process Engineering, 2021, 44(6): 1-13.
- [27] 李德海,杜令娟,康宁,等. 提取技术对粗毛纤孔菌三萜类化合物制备及体外降血脂作用的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 291-297.
- [28] GUL W, GUL S W, CHANDRA S, et al. Detection and quantification of cannabinoids in extracts of *Cannabis sativa* roots using LC-MS/MS [J]. Planta Medica, 2018, 84(4): 267-271.
- [29] CHRISTINAT N, SAVOY M C, MOTTIER P. Development, validation and application of a LC-MS/MS method for quantification of 15 cannabinoids in food[J]. Food Chemistry, 2020, 318: 1-10.
- [30] SIEGIEŃ J, BUCHHOLZ T, POPOWSKI D, et al. Pancreatic lipase and α -amylase inhibitory activity of extracts from selected plant materials after gastrointestinal digestion in vitro[J]. Food Chemistry, 2021(1): 1-13.
- [31] PANG J, XU H H, WANG X, et al. Resveratrol enhances trans-intestinal cholesterol excretion through selective activation of intestinal liver X receptor alpha [J]. Biochemical Pharmacology, 2021, 186(3): 1-12.
- [32] 傅奇,肖玉娟,毛玉婷,等. 超声波协同复合酶提取猴头菇多糖的研究[J]. 农产品加工, 2020, 10(5): 34-38+43.
- [33] GONG Y, HUANG X Y, LIU J F, et al. Effective on-line high-speed shear dispersing emulsifier technique coupled with high-performance countercurrent chromatography method for simultaneous extraction and isolation of carotenoids from *Lycium barbarum* L. fruits [J]. Journal of Separation Science, 2020, 43(14): 2949-2958.

(责任编辑 张冰)