



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108276467 A

(43)申请公布日 2018.07.13

(21)申请号 201810178841.X

A01P 3/00(2006.01)

(22)申请日 2018.03.05

(71)申请人 广东省农业科学院果树研究所  
地址 510640 广东省广州市天河区五山大  
丰二街80号

申请人 惠州市四季鲜绿色食品有限公司

(72)发明人 孟祥春 黄泽鹏 蔡国豪 蔡国富

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
11332

代理人 巩克栋

(51)Int.Cl.

C07J 63/00(2006.01)

C07H 15/256(2006.01)

C07H 1/08(2006.01)

A01N 43/16(2006.01)

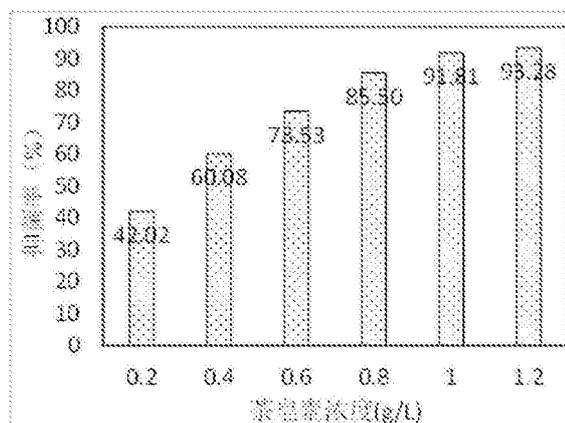
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

## (54)发明名称

一种茶皂素及其提取工艺和应用

## (57)摘要

本发明提供了一种茶皂素及其提取工艺和应用,提取工艺为将茶树油粕加入体积浓度为70-80%的乙醇中进行热回流提取1.5-2.5小时,过滤减压浓缩后进行大孔吸附树脂分离纯化;本发明通过合理优化提取工艺,将乙醇热回流提取与大孔树脂分离纯化相结合,筛选适宜的乙醇浓度、热回流温度、热回流时间和料液比等提取条件以及大孔树脂分离纯化过柱流速、吸附和解吸附等条件,各步骤各条件协同增效,相互影响,最终得到茶树油粕中茶皂素提取和分离纯化的最佳工艺组合,提取得到的茶皂素的得率高达13.35%,纯度高达95%,能够用于防控果蔬采后病害致病菌的生长,具有广阔的应用前景和巨大的市场价值。



1. 一种茶皂素的提取工艺,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将茶树油粕加入体积浓度为70-80%的乙醇中进行热回流提取1.5-2.5小时,得到粗提液;

(2) 将步骤(1)得到的粗提液去除乙醇,加水稀释至原料5-15倍体积,调节pH后得到预提取液;

(3) 将步骤(2)得到的预提取液上样至大孔吸附树脂柱中,洗涤杂质后进行洗脱并减压浓缩真空干燥得到所述茶皂素。

2. 根据权利要求1所述的提取工艺,其特征在于,步骤(1)所述热回流的料液比为1:(12-16),优选为1:14。

3. 根据权利要求1或2所述的提取工艺,其特征在于,步骤(1)所述乙醇的体积浓度为73-77%,优选为75%。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的提取工艺,其特征在于,步骤(1)所述热回流的提取时间为1.7-2.2小时,优选为2小时;

优选地,步骤(1)所述热回流的温度为80-90℃,优选为85℃。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的提取工艺,其特征在于,步骤(2)所述加水的体积为原料的8-12倍,优选为10倍;

优选地,步骤(2)所述去除乙醇的方法为过滤减压浓缩;

优选地,步骤(2)所述pH为6-7,优选为6.3-6.7。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的提取工艺,其特征在于,步骤(3)所述上样的流速为1.0-2.0BV·h<sup>-1</sup>,优选为1.0-1.5BV·h<sup>-1</sup>;

优选地,步骤(3)还包括对所述大孔吸附树脂进行预处理的步骤;

优选地,步骤(3)所述大孔吸附树脂包括DM130、D101或AB-8中的任意一种,优选为AB-8树脂;

优选地,步骤(3)所述洗涤的洗涤剂为蒸馏水;

优选地,所述蒸馏水的流速为1.5-2.0BV·h<sup>-1</sup>。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的提取工艺,其特征在于,步骤(3)所述洗脱的洗脱液为乙醇;

优选地,所述乙醇的体积浓度为72-77%,优选为75%;

优选地,步骤(3)所述洗脱的流速为1.5-2.0BV·h<sup>-1</sup>。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的提取工艺,其特征在于,具体包括如下步骤:

(1) 以1:(12-16)的料液比向茶树油粕中加入体积浓度为73-77%的乙醇在80-90℃下进行热回流提取1.7-2.2小时,得到粗提液;

(2) 将步骤(1)得到的粗提液过滤减压浓缩去除乙醇,加水稀释至原料8-12倍体积,调节pH至6-7得到预提取液;

(3) 将步骤(2)得到的预提取液以1.0-2.0BV·h<sup>-1</sup>的流速上样至预处理后的大孔吸附树脂柱中,以1.5-2.0BV·h<sup>-1</sup>的流速用蒸馏水洗涤杂质,72-77%的乙醇以1.5-2.0BV·h<sup>-1</sup>的流速洗脱,减压浓缩真空干燥得茶皂素。

9. 一种如权利要求1-8中任一项所述提取工艺提取得到的茶皂素。

10. 一种如权利要求9所述的茶皂素用于果蔬采后病害致病菌生长的防控。

## 一种茶皂素及其提取工艺和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及农业资源再利用及果蔬采后病害防控领域,尤其涉及一种茶皂素及其提取工艺和应用。

### 背景技术

[0002] 南山茶(*Camellia semiserrata* Chi)是中国特有的天然野生木本油料植物,又称山茶树,别名红花油茶、广宁油茶,其球形蒴果的种仁富含油脂,可榨油。茶树油渣(粕),又称油茶饼,是种仁榨油后的剩余物。目前,一部分茶树油粕作肥料利用,但多数均被废弃,因此造成了一种很大的资源浪费。茶树油粕除含残油外,还含有蛋白、多糖、茶皂素、多酚、生物碱和单宁等功能成分,其中含量最丰富的是茶皂素,含量高达10%-14%。茶皂素是一种性能优良的天然非离子表面活性剂,不仅具有良好的乳化、发泡、分散、渗透、润滑等活性作用,而且还具有消炎、镇痛、杀菌、止痒等药理作用。随着茶皂素应用研究工作的不断深入,其应用范围越来越广,可广泛应用于日化、轻纺、医药和农药等行业中。

[0003] CN107056876A提供了一种从油茶籽粕中提取高纯度茶皂素的方法,利用碳酸二甲酯,将油茶籽粕粉中的包括油脂在内的脂溶性物质从油茶籽粕粉中分离,降低了油茶籽粕粉中的杂质,为进一步水提醇萃茶皂素提供方便,同时提高了水提醇萃茶皂素的效率和纯度;将脱酯的油茶籽粕粉进行水提醇萃提取高纯度茶皂素,利用茶皂素易溶于热水和乙醇水溶液,不溶于冷水的性质,用80℃-90℃的热水浸提油茶籽粕粉,由于前一步利用碳酸二甲酯除去了油茶籽粕粉中的大部分杂质,因此,热水浸提之后得到的滤液中杂质较少,不需要进一步除杂的过程,直接浓缩所得的滤液得到水提稠膏,进一步利用体积分数为75%-95%的乙醇萃取。CN104945463A提供了一种茶皂素的提取方法,包括以下步骤:a)将茶籽粕与提取液混合,进行粗提处理,得到茶皂素提取液;b)将所述茶皂素提取液与甾醇类络合剂混合,进行络合处理,得到茶皂素络合物;c)将所述茶皂素络合物与解络溶剂混合,进行解络分离处理,得到茶皂素。CN101177447提供了一种制备茶皂素的工艺,其方法步骤为:a.提取和吸附过程,将一定量的脱脂油茶枯饼加入索氏提取器,大孔吸附树脂加入到含低浓度有机溶剂溶液的圆底烧瓶中加热回流;b.解吸过程,将吸附了茶皂素的大孔吸附树脂再加入高浓度有机溶剂的溶液中圆底烧瓶加热回流,过滤后得到茶皂素溶液;c.将茶皂素溶液经脱色和干燥后,得到茶皂素产品。干丽等(2014,中南药学)采用含70%乙醇的硫酸溶液100℃水浴加热回流提取5h,茶皂素得率为10.8%。提取时间较长,浓硫酸的使用也比较危险,且提取时间过长或硫酸浓度太大时,得率明显降低,因此条件不好控制。黄建凡等(2008,海峡药学)采用75%乙醇浸提、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>回流脱色、丙酮纯化等工艺提取得到茶皂素,但提取的茶皂素含量不高,回收率也很低。谢秋英等(2010,福建水产)采用AB-8大孔吸附树脂对茶皂素进行初步纯化,但得率较低。高凯翔等(2010,油脂开发)采用水提醇沉法提取茶皂素,需要提取3次以上,需要用90%的乙醇,比较耗时,纯度也只有69.9%。

[0004] 上述现有技术存在操作步骤繁琐复杂、添加过多化学成分、产生较多废物污染环境、茶皂素产率低等诸多缺点,目前茶皂素的提取工艺一般采用水提法,因为水提法生产成

本低,无污染,但需要长时间热水浸泡,会使茶皂素发生水解变质,大量杂质溶解,造成杂质分离困难,增加后续纯化难度。得到的茶皂素纯度也比较低,而且提取后色泽较深,不易后续处理。

[0005] 因此,研发一种高效环保且简洁的提取工艺,从茶树油粕中高效提取大量天然的茶皂素,具有显著的经济效益和社会效益。

## 发明内容

[0006] 针对现有技术的不足及实际的需求,本发明提供一种茶皂素及其提取工艺和应用,通过合理优化提取工艺,将乙醇热回流提取与大孔树脂纯化相结合,筛选适宜的浓度、温度、时间和料液比等提取条件以及流速和试剂等洗脱条件,各步骤各条件协同增效,相互影响,最终提取得到高得率和高纯度的茶皂素,用于果蔬采后病害致病菌生长的抑制具有显著效果。

[0007] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 第一方面,本发明提供一种茶皂素的提取工艺,包括如下步骤:

[0009] (1) 将茶树油粕加入体积浓度为70-80%的乙醇中进行热回流提取1.5-2.5小时,得到粗提液;

[0010] (2) 将步骤(1)得到的粗提液去除乙醇,加水稀释稀释至原料5-15倍体积,调节pH后得到预提取液;

[0011] (3) 将步骤(2)得到的预提取液上样至大孔吸附树脂柱中,洗涤杂质后进行洗脱并减压浓缩真空干燥得到所述茶皂素。

[0012] 本发明中,发明人在长期研究茶皂素的提取工艺和产品特性的过程中,总结分析现有技术的优缺点,针对茶皂素的理化特性,综合比较各种提取工艺和方法,逐步筛选提取及纯化流程的各个条件,攻克茶树油粕中提取茶皂素的工艺难点,通过大量实验摸索优化工艺流程,将乙醇热回流提取与大孔树脂纯化相结合,筛选适宜的浓度、温度和时间等提取条件以及流速和试剂等洗脱条件,各步骤各条件协同增效,相互影响,牵一发而动全身,只有在本发明提供的特定条件组合下,才能提取得到高得率和高纯度的茶皂素。

[0013] 优选地,步骤(1)所述热回流的料液比为1:(12-16),例如可以是1:12、1:13、1:14、1:15或1:16,优选为1:14。

[0014] 本发明中,所述料液比影响茶树油粕在乙醇中的溶解度,进而影响热回流提取效率,发明人发现热回流的料液比为1:(12-16)时,热回流提取茶皂素的效率较高。

[0015] 优选地,步骤(1)所述乙醇的体积浓度为73-77%,例如可以是73%、74%、75%、76%或77%,优选为75%。

[0016] 本发明中,茶皂甙属于三萜类皂角甙,易溶于含水甲醇和乙醇等,由于乙醇不会对环境产生影响,经济,来源方便,因此本发明选用含水乙醇作为提取溶剂;乙醇浓度过低会下调茶皂素的溶解率,而过高又增加成本,增加后期去醇步骤的时间,因此经过大量实验验证,发明人发现当乙醇浓度在70-80%时,其有助于后续茶皂素的提取。

[0017] 优选地,步骤(1)所述热回流的提取时间为1.7-2.2小时,例如可以是1.7小时、1.8小时、1.9小时、2.0小时、2.1小时或2.2小时,优选为2小时。

[0018] 本发明中,所述提取时间过短会极大降低茶皂素溶解提取率,而随着提取时间的

增加,使茶树油粕中杂质的溶出量增加,得到的提取液颜色逐渐加深,因此需要严格控制提取时间,以适配乙醇浓度及回流温度,发明人在实验中发现热回流的提取时间在1.5-2.5小时,提取率较高,尤其是1.7-2.2小时时,提取率进一步增高。

[0019] 优选地,步骤(1)所述热回流的温度为80-90℃,例如可以是80℃、82℃、84℃、85℃、86℃、88℃、89℃或90℃,优选为85℃。

[0020] 本发明中,温度过高易使提取的茶皂素类化合物被破坏,杂质的溶出量增加,乙醇在更高的温度下容易挥发,提取的茶皂素含量反而降低,但低温下茶皂素溶解率较低,提取率因此受到影响,发明人在实验过程中发现热回流的温度在80-90℃时,提取率较高。

[0021] 优选地,步骤(2)所述去除乙醇的方法为过滤减压浓缩。

[0022] 优选地,步骤(2)所述体积为原料的8-12倍,例如可以是8倍、9倍、10倍、11倍或12倍,优选为10倍。

[0023] 优选地,步骤(2)所述pH为6-7,例如可以是6.1、6.2、6.3、6.5、6.6或6.7,优选为6.3-6.7。

[0024] 本发明中,茶皂素属于五环三萜类皂甙,由亲水性糖体和疏水性的配位基及有机酸构成,含有酚羟基、羧基,呈弱酸性,弱酸性化合物在弱酸性溶液中易被吸附。此外,酸性条件下有利于葡萄糖苷型茶皂素水解成苷元型,更容易被树脂所吸附。

[0025] 优选地,步骤(3)所述上样的流速为1.0-2.0BV·h<sup>-1</sup>,例如可以是1.0BV·h<sup>-1</sup>、1.2BV·h<sup>-1</sup>、1.4BV·h<sup>-1</sup>、1.6BV·h<sup>-1</sup>、1.8BV·h<sup>-1</sup>或2.0BV·h<sup>-1</sup>,优选为1.0-1.5BV·h<sup>-1</sup>。

[0026] 优选地,步骤(3)所述大孔吸附树脂包括DM130、D101或AB-8中的任意一种,优选为AB-8树脂。

[0027] 优选地,步骤(3)还包括对大孔吸附树脂的预处理步骤,所述预处理的步骤为体积浓度为5%乙醇浸泡树脂24h,期间不断搅拌→用蒸馏水洗至无白色混浊,无醇味→1mol/L的NaOH溶液浸泡4h→蒸馏水洗至中性→0.5mol/L的HCl溶液浸泡3h→蒸馏水洗至中性,待用。

[0028] 优选地,步骤(3)所述洗涤的洗涤剂为蒸馏水。

[0029] 优选地,所述蒸馏水的流速为1.5-2.0BV·h<sup>-1</sup>,例如可以是1.5BV·h<sup>-1</sup>、1.7BV·h<sup>-1</sup>、1.9BV·h<sup>-1</sup>或2.0BV·h<sup>-1</sup>。

[0030] 优选地,步骤(3)所述洗脱的洗脱液为乙醇。

[0031] 优选地,所述乙醇的体积浓度为72-77%,例如可以是72%、73%、75%、76%或77%,优选为75%。

[0032] 优选地,步骤(3)所述洗脱的流速为1.5-2.0BV·h<sup>-1</sup>,例如可以是1.5BV·h<sup>-1</sup>、1.7BV·h<sup>-1</sup>、1.8BV·h<sup>-1</sup>、1.9BV·h<sup>-1</sup>或2.0BV·h<sup>-1</sup>。

[0033] 作为优选技术方案,所述茶皂素的提取工艺,具体包括如下步骤:

[0034] (1)以1:(12-16)的料液比向茶树油粕中加入体积浓度为73-77%的乙醇在80-90℃下进行热回流提取1.7-2.2小时,得到粗提液;

[0035] (2)将步骤(1)得到的粗提液过滤减压浓缩去醇,加水稀释至原料8-12倍体积,采用2mol/L的盐酸或2mol/L的氢氧化钠调节pH至6-7得到预提取液;

[0036] (3)取吸附材料AB-8树脂,采用50mm×500mm的玻璃层析柱作为吸附柱,称取预处理好的树脂400g,湿法装柱,将步骤(2)得到的预提取液以1.0-2.0BV·h<sup>-1</sup>的流速上样至预

处理后的大孔吸附树脂柱中,以 $1.5-2.0\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速用蒸馏水洗涤杂质,72-77%的乙醇以 $1.5-2.0\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速洗脱,减压浓缩真空干燥得茶皂素。

[0037] 第二方面,本发明提供一种如第一方面所述提取工艺提取得到的茶皂素。

[0038] 本发明中,通过第一方面所述方法提取得到的茶皂素的得率高达13.35%,纯度高达95%。

[0039] 第三方面,本发明提供一种如第二方面所述的茶皂素用于果蔬采后病害致病菌生长的控制。

[0040] 发明人经过试验验证发现提取的茶皂素在一定浓度范围内可显著抑制胶孢炭疽菌、荔枝霜疫霉菌、链格孢菌、柑橘青霉菌、柑橘绿霉病和灰霉菌的离体生长,并对这些病害致病菌诱导的果实采后病害有明显的防效。

[0041] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0042] (1) 本发明提供的提取工艺通过将乙醇热回流提取与大孔树脂纯化相结合,筛选适宜的浓度、温度和时间等提取条件以及流速和试剂等洗脱条件,各步骤各条件协同增效,相互影响,最终提取得到的茶皂素的得率高达13.35%,纯度高达95%;该工艺简洁高效,绿色环保,无有毒有害废物产生,不需水提醇沉或醇提水溶等繁琐步骤;

[0043] (2) 本发明提取得到的茶皂素能够用于果蔬采后病害致病菌生长的防控,为以茶皂素为主要组分的天然果蔬保鲜剂的研究开发提供一条新的途径,对拓宽茶皂素作为果蔬天然植物源保鲜剂的开发应用有重要意义,也有利于茶树油粕的综合环保利用。

## 附图说明

[0044] 图1为本发明实施例7的茶皂素对荔枝霜疫霉菌的离体抑制作用图;

[0045] 图2为本发明实施例7的不同浓度茶皂素对荔枝霜疫霉菌的抑菌率;

[0046] 图3为本发明实施例7的茶皂素对荔枝霜疫霉菌的毒力回归方程。

## 具体实施方式

[0047] 为更进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果,以下结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案,但本发明并非局限在实施例范围内。

[0048] 实施例1

[0049] (1) 以1:14的料液比向茶树油粕中加入体积浓度为75%的乙醇在85℃下进行热回流提取2小时,得到粗提液;

[0050] (2) 将步骤(1)得到的粗提液过滤减压浓缩去醇,加水稀释至原料10倍体积,采用2mol/L的盐酸或2mol/L的氢氧化钠调节pH至6.5得到预提取液;

[0051] (3) 取吸附材料AB-8树脂,采用50mm×500mm的玻璃层析柱作为吸附柱,称取预处理好的树脂400g,湿法装柱,将步骤(2)得到的预提取液以 $1.5\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速上样至预处理后的大孔吸附树脂柱中,以 $1.7\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速用蒸馏水洗涤杂质,体积浓度为75%的乙醇以 $1.7\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速洗脱,减压浓缩真空干燥得茶皂素。

[0052] 实施例2

[0053] (1) 以1:16的料液比向茶树油粕中加入体积浓度为77%的乙醇在90℃下进行热回流提取2.2小时,得到粗提液;

[0054] (2) 将步骤(1)得到的粗提液过滤减压浓缩去醇,加水稀释至原料12倍体积,采用2mol/L的盐酸或2mol/L的氢氧化钠调节pH至7得到预提取液;

[0055] (3) 取吸附材料AB-8树脂,采用50mm×500mm的玻璃层析柱作为吸附柱,称取预处理好的树脂400g,湿法装柱,将步骤(2)得到的预提取液以2.0BV·h<sup>-1</sup>的流速上样至预处理后的大孔吸附树脂柱中,以2.0BV·h<sup>-1</sup>的流速用蒸馏水洗涤杂质,体积浓度为77%的乙醇以2.0BV·h<sup>-1</sup>的流速洗脱,减压浓缩真空干燥得茶皂素。

[0056] 实施例3

[0057] (1) 以1:12的料液比向茶树油粕中加入体积浓度为73%的乙醇在80℃下进行热回流提取1.7小时,得到粗提液;

[0058] (2) 将步骤(1)得到的粗提液过滤减压浓缩去醇,加水稀释至原料8倍体积,采用2mol/L的盐酸或2mol/L的氢氧化钠调节pH至6得到预提取液;

[0059] (3) 取吸附材料AB-8树脂,采用50mm×500mm的玻璃层析柱作为吸附柱,称取预处理好的树脂400g,湿法装柱,将步骤(2)得到的预提取液以1.0BV·h<sup>-1</sup>的流速上样至预处理后的大孔吸附树脂柱中,以1.5BV·h<sup>-1</sup>的流速用蒸馏水洗涤杂质,体积浓度为72%的乙醇以1.5BV·h<sup>-1</sup>的流速洗脱,减压浓缩真空干燥得茶皂素。

[0060] 实施例4

[0061] (1) 以1:13的料液比向茶树油粕中加入体积浓度为70%的乙醇在83℃下进行热回流提取1.9小时,得到粗提液;

[0062] (2) 将步骤(1)得到的粗提液过滤减压浓缩去醇,加水稀释至原料8倍体积,采用2mol/L的盐酸或2mol/L的氢氧化钠调节pH至6得到预提取液;

[0063] (3) 取吸附材料AB-8树脂,采用50mm×500mm的玻璃层析柱作为吸附柱,称取预处理好的树脂400g,湿法装柱,将步骤(2)得到的预提取液以1.0BV·h<sup>-1</sup>的流速上样至预处理后的大孔吸附树脂柱中,以1.5BV·h<sup>-1</sup>的流速用蒸馏水洗涤杂质,体积浓度为72%的乙醇以1.5BV·h<sup>-1</sup>的流速洗脱,减压浓缩真空干燥得茶皂素。

[0064] 实施例5

[0065] (1) 以1:14的料液比向茶树油粕中加入体积浓度为80%的乙醇在87℃下进行热回流提取2.1小时,得到粗提液;

[0066] (2) 将步骤(1)得到的粗提液过滤减压浓缩去醇,加水稀释至原料8倍体积,采用2mol/L的盐酸或2mol/L的氢氧化钠调节pH至6得到预提取液;

[0067] (3) 取吸附材料AB-8树脂,采用50mm×500mm的玻璃层析柱作为吸附柱,称取预处理好的树脂400g,湿法装柱,将步骤(2)得到的预提取液以1.0BV·h<sup>-1</sup>的流速上样至预处理后的大孔吸附树脂柱中,以1.5BV·h<sup>-1</sup>的流速用蒸馏水洗涤杂质,体积浓度为72%的乙醇以1.5BV·h<sup>-1</sup>的流速洗脱,减压浓缩真空干燥得茶皂素。

[0068] 对比例1

[0069] 与实施例1相比,除了步骤(1)的料液比改为1:8外,其他条件与实施例1相同。

[0070] 对比例2

[0071] 与实施例1相比,除了步骤(1)的料液比改为1:20外,其他条件与实施例1相同。

[0072] 对比例3

[0073] 与实施例1相比,除了步骤(1)的乙醇浓度为65%外,其他条件与实施例1相同。

- [0074] 对比例4
- [0075] 与实施例1相比,除了步骤(1)的乙醇浓度为85%外,其他条件与实施例1相同。
- [0076] 对比例5
- [0077] 与实施例1相比,除了步骤(1)的热回流时间为3小时外,其他条件与实施例1相同。
- [0078] 对比例6
- [0079] 与实施例1相比,除了步骤(1)的热回流时间为1小时外,其他条件与实施例1相同。
- [0080] 对比例7
- [0081] 与实施例1相比,除了步骤(1)的热回流温度为75℃外,其他条件与实施例1相同。
- [0082] 对比例8
- [0083] 与实施例1相比,除了步骤(1)的热回流温度为95℃外,其他条件与实施例1相同。
- [0084] 对比例9
- [0085] 与实施例1相比,除了步骤(2)的稀释倍数为15倍外,其他条件与实施例1相同。
- [0086] 对比例10
- [0087] 与实施例1相比,除了步骤(2)的pH改为5.5外,其他条件与实施例1相同。
- [0088] 对比例11
- [0089] 与实施例1相比,除了步骤(2)的pH改为7.5外,其他条件与实施例1相同。
- [0090] 对比例12
- [0091] 与实施例1相比,除了步骤(3)的上样流速改为 $3.0\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 外,其他条件与实施例1相同。
- [0092] 对比例13
- [0093] 与实施例1相比,除洗脱剂乙醇的浓度为60%外,其他条件与实施例1相同。
- [0094] 茶皂素的含量测定
- [0095] 采用分光光度法测定提取样品中茶皂素的含量:首先将购买的茶皂素标准品用80% (v/v) 乙醇溶液配制成1mg/mL的茶皂素标准品溶液,梯度稀释后,分别加入8%香草醛溶液0.5mL,77%硫酸水溶液(v/v) 4mL,接着60℃水浴加热15min,然后置于冰水中冷却15min终止反应,分光光度计测定其在550nm波长处的吸光度。以茶皂素标准溶液质量浓度C (mg/mL) 为纵坐标,吸光度为横坐标作图,得出线性回归方程为: $C(\text{mg/mL}) = 0.9166 \times A - 0.0032$ ,相关系数 $R^2 = 0.9986$ ;
- [0096] 各提取方法获得的待测样品用80% (v/v) 乙醇水溶液溶解定容后,按上述方法测定其吸光度A值,根据得出的线性回归方程计算得出茶皂素含量,结果见表1;
- [0097] 表1

[0098]

样品	得率	样品	得率
实施例1	13.35	对比例5	8.36
实施例2	13.20	对比例6	9.21
实施例3	13.15	对比例7	8.03
实施例4	13.18	对比例8	7.36
实施例5	13.21	对比例9	10.36
对比例1	11.35	对比例10	11.12

对比例2	11.69	对比例11	10.64
对比例3	9.24	对比例12	11.57
对比例4	7.38	对比例13	11.14

[0099] 由表1可知,实施例1-5按照本发明提供的提取工艺制备茶皂素,得率均在13%以上,其中,实施例1的提取工艺:以75%乙醇作为提取溶剂,采用1:14的料液比,85℃热回流提取2h,茶皂素的得率达到13.35%,而对比例1-13中,提取溶剂乙醇的浓度、热回流时间及温度、料液比等条件超过本发明提供的范围后,茶皂素的得率降低明显,表明本发明提供的提取工艺中,各步骤各条件协同增效,缺一不可,牵一发而动全身,温度、时间、料液比、浓度、流速各条件相互搭配,相互影响,最终实现较高的茶皂素得率。

[0100] 实施例6

[0101] 根据表1得出,乙醇浓度、提取时间、料液比和提取温度对茶皂素得率的影响较大,根据上述因素设定正交实验因素表,采用L9(3<sup>4</sup>)正交实验设计表验证乙醇浓度、提取时间、料液比和提取温度对茶皂素得率的影响,正交实验因素表见表2;

[0102] 表2正交实验因素表

[0103]

	A(溶剂)	B(时间)	C(料液比)	D(温度)
水平1	55%	1.5	18	85℃
水平2	75%	2.0	14	70℃
水平3	95%	2.5	10	55℃

[0104] 根据正交实验因素表设计各因素的L9(3<sup>4</sup>)正交设计表,见表3;

[0105] 表3

[0106]

实验序号	A(溶剂)	B(时间)	C(料液比)	D(温度)	得率(%)
1	1	1	1	1	8.46
2	1	2	2	2	9.18
3	1	3	3	3	10.42
4	2	1	2	3	12.58
5	2	2	3	1	13.12
6	2	3	1	2	13.35
7	3	1	3	2	11.06
8	3	2	1	3	11.62
9	3	3	2	1	11.36

[0107] 表3结果显示,序号为6的试验组合(A2B3C1D2)获得的茶皂素得率最大,为13.35%,茶树油粕中茶皂素的最佳提取工艺为:以75%乙醇作为提取溶剂,采用1:14的料液比,85℃热回流提取2h,茶皂素的得率达到13.35%左右。

[0108] 实施例7

[0109] 制备含药平板:将实施例1-3中任一例得到的茶皂素配制成一定浓度的母液,然后分别定量加入PDA培养基中,配成不同浓度的含药培养基,混合均匀后倒入直径为9cm的培养皿中,每皿大约15mL,冷却后备用,对照组为未加任何药剂的PDA平板。

[0110] 测定抑制效果:供试荔枝霜疫霉菌菌株在PDA平板上培养好后用直径为5mm的打孔器沿菌落边缘打好菌饼,分别移至含不同浓度茶皂素的含药平板中央,有菌丝的一面朝下,每个处理3个重复,28℃培养;培养1周后用十字交叉法测量菌落直径,记录数据,结果如图1所示;

[0111] 按照以下公式计算抑菌率:抑制生长率(%)=(对照菌落净生长量-处理菌落净生长量)/(对照菌落净生长量)×100;其中:净生长量=菌落直径-菌饼直径5mm,结果如图2所示;

[0112] 毒力计算方法:将抑制菌落生长的百分率换算成机率值(Y),提取物的质量浓度以对数表示(X),求取茶皂素对参试菌株的毒力回归方程 $Y=a+bX$ ,其中b是由X和Y拟合的直线回归方程的回归系数,a是基量值,并计算相关系数及EC50值,结果如图3所示;

[0113] 由图(1)-图(3)可知,茶皂素对荔枝霜疫霉菌的抑制作用具有浓度依赖性,茶皂素浓度越高,抑制性越强。当茶皂素浓度大于0.6g/L,抑菌率在85%以上,根据茶皂素对荔枝霜疫霉菌的毒力回归方程计算出EC50为387.3mg/L,茶皂素对其他几种果蔬采后病害致病真菌(炭疽菌、灰霉菌、链格孢、青霉菌和绿霉菌)的抑制作用类似于荔枝霜疫霉菌,但对不同采后病害致病菌的EC50值大小有差异。

[0114] 综上所述,本发明提供的茶皂素的提取工艺,通过合理优化提取工艺,将乙醇热回流提取与大孔树脂纯化相结合,筛选适宜的浓度、温度和时间等提取条件以及流速和试剂等洗脱条件,各步骤各条件协同增效,牵一发而动全身,相互影响,温度、时间、料液比、浓度、流速各条件相互搭配,最终提取得到高得率和高纯度的茶皂素,用于果蔬采后病害致病病菌的防治具有显著效果。

[0115] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法,但本发明并不局限于上述详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

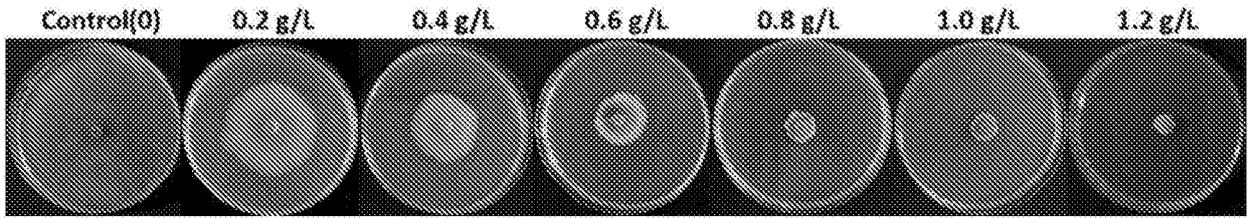


图1

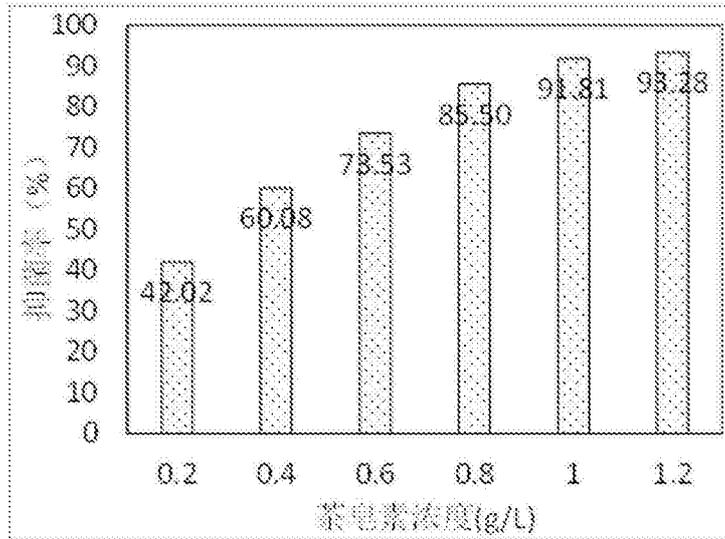


图2

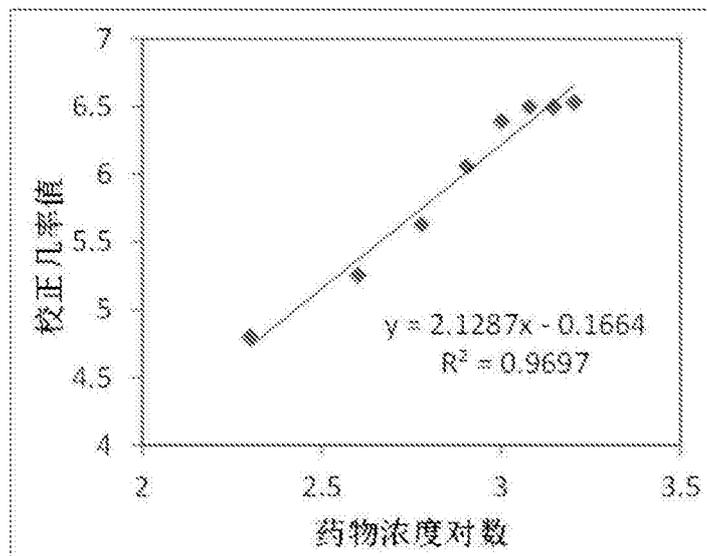


图3