



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114561246 B

(45) 授权公告日 2023.12.01

(21) 申请号 202210149087.3

(22) 申请日 2022.02.18

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114561246 A

(43) 申请公布日 2022.05.31

(73) 专利权人 东莞市农业科学研究中心  
地址 523000 广东省东莞市南城区绿色路  
市现代农业科技园内市农科中心

(72) 发明人 黄皓 胡珊 梁卫驱 徐匆 陈彦  
罗华建 陈仕丽 罗诗

(74) 专利代理机构 广州市深研专利事务所(普  
通合伙) 44229  
专利代理师 姜若天

(51) Int. Cl.  
C11B 9/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105505583 A, 2016.04.20

CN 110150333 A, 2019.08.23

CN 112795429 A, 2021.05.14

US 2010151098 A1, 2010.06.17

US 6458407 B1, 2002.10.01

周海旭等. 亚临界流体萃取樟叶精油及其  
抑菌活性的研究.《中药材》.2016,第39卷(第6  
期),1357-1360.

审查员 聂俊杰

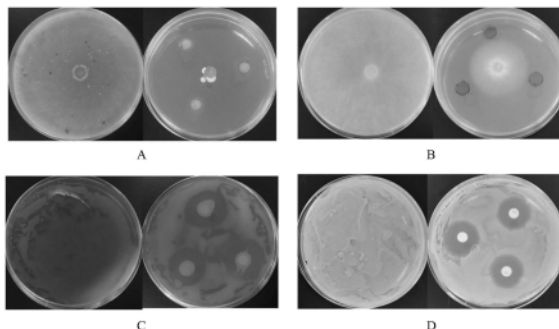
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种樟树精油的制备方法及其抑菌应用

(57) 摘要

本发明公开了一种樟树精油的制备方法及其抑菌应用。本发明采用环保溶剂四氟乙烷作为萃取溶剂,在亚临界条件下萃取制备的樟树精油因其特有的组成成分,使得其对水稻纹枯病菌、辣椒疫霉病菌、青枯病菌或胡萝卜软腐果胶杆菌等植物真菌及细菌病原菌都表现出显著的抑菌活性,可用于农作物生防领域。



1. 一种樟树精油的制备方法,其特征在于由以下步骤组成:

(1) 原料预处理:

将新鲜樟树枝叶在50~60℃干燥至含水率3%~6%,然后粉碎得到樟树枝叶粉;

(2) 亚临界流体萃取:

将樟树枝叶粉置于亚临界萃取设备的萃取罐中,使用真空泵将系统压力调至0.01MPa,然后将液态溶剂从溶剂罐中导入萃取罐,控制樟树枝叶粉和液态溶剂的料液比为1:4~1:7,再采用热水循环系统将萃取罐加热至35~50℃,控制萃取时间30~60min,萃取结束后将萃取液导入分离罐,使用压缩机进行溶剂回收,重复萃取3~5次,合并萃取物,得到樟树粗油;

(3) 樟树粗油的精制:

将樟树粗油,加入20倍无水乙醇后混匀,于-18~-20℃静置后过滤,向滤液中加入1.5~3%活性炭,在40℃条件下搅拌,过滤后在45℃、0.01MPa条件下减压蒸馏回收乙醇,得到樟树精油;

所述液态溶剂为四氟乙烷。

2. 权利要求1所得樟树精油在制备抑制植物真菌或细菌病原菌药物中的应用;所述植物真菌或细菌病原菌为水稻纹枯病菌、辣椒疫霉病菌、青枯病菌或胡萝卜软腐果胶杆菌。

## 一种樟树精油的制备方法及其抑菌应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种具有抑菌活性的樟树精油的制备方法,属于植物油提取、分离和应用领域。

### 背景技术

[0002] 樟树Cinnamomum camphora,又名香樟、乌樟、樟木、芳樟等,为樟科樟属常绿阔叶乔木,原产于我国东南以及西南各地,广东、广西、江西、福建、台湾地区、湖南、湖北、四川、云南等地均有种植。樟树皮、根、茎、叶均可提取精油,其具有抑菌、止痛、抗癌、抗氧化等药用价值,是香料香精、医药卫生等行业的重要原料。

[0003] 樟树精油的提取方法有水蒸气蒸馏法、有机溶剂提取法、超临界二氧化碳萃取法、超声波辅助提取法、同时蒸馏萃取法、微波辅助水蒸馏法等,目前亚临界流体萃取樟树精油的研究甚少。周海旭等以亚临界正丁烷为溶剂,在萃取温度为 65℃、解析温度45℃、提取时间40min的条件下萃取樟树精油的得率为3.54%,该精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、枯草杆菌等细菌均有不同程度的抑制作用。

[0004] 溶剂种类是影响萃取效果的重要因素。根据相似相溶原理,溶剂种类会影响萃取物中化学组成成分,进而影响其应用效果。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种樟树精油的制备方法及其抑菌应用。

[0006] 为实现上述目的,采用如下技术方案:

[0007] 本发明采用环保溶剂四氟乙烷作为萃取溶剂,在亚临界条件下萃取制备的樟树精油因其特有的组成成分,对植物真菌及细菌病原菌都表现出明显的抑制作用。

[0008] 一种樟树精油的制备方法,由以下步骤组成:

[0009] (1) 原料预处理:

[0010] 将新鲜樟树枝叶在50~60℃干燥至含水率3%~6%,然后粉碎得到樟树枝叶粉;

[0011] (2) 亚临界流体萃取:

[0012] 将樟树枝叶粉置于亚临界萃取设备的萃取罐中,使用真空泵将系统压力调至0.01MPa,然后将液态溶剂从溶剂罐中导入萃取罐,控制樟树枝叶粉和液态溶剂的料液比为1:4~1:7(质量体积比kg/L),再采用热水循环系统将萃取罐加热至35~50℃,控制萃取时间30~60min,萃取结束后将萃取液导入分离罐,使用压缩机进行溶剂回收,重复萃取3~5次,合并萃取物,得到樟树粗油;

[0013] (3) 樟树粗油的精制:

[0014] 将樟树粗油,加入20倍(质量体积比g/ml)无水乙醇后混匀,于-18~-20℃静置后过滤,向滤液中加入1.5~3%(质量体积比g/ml)活性炭,在40℃条件下搅拌,过滤后在45℃、0.01MPa条件下减压蒸馏回收乙醇,得到樟树精油。

- [0015] 作为优选的,在上述樟树精油的制备方法中,所述液态溶剂为四氟乙烷 (R134a)。
- [0016] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:
- [0017] (1) 本发明采用亚临界萃取技术,操作工艺简单,易放大生产,相对于传统的水蒸气蒸馏工艺可大大提高萃取效率。
- [0018] (2) 本发明采用环保溶剂四氟乙烷作为萃取溶剂,不易燃,且无毒,相对于烷烃溶剂更加安全,目前采用亚临界四氟乙烷萃取樟树精油的研究还未见报道。
- [0019] (3) 根据相似相溶原理,采用亚临界四氟乙烷萃取的樟树精油因其特有的化学成分组成方式,使得其对水稻纹枯病菌、辣椒疫霉病菌、青枯病菌或胡萝卜软腐果胶杆菌等植物真菌及细菌病原菌都表现出显著的抑菌活性,可用于农作物生防领域。其中水稻纹枯病菌的菌落直径 $10.1 \pm 1.0\text{mm}$ ,樟树精油对其抑制率为 88.65%,辣椒疫霉病菌的菌落直径 $31.2 \pm 1.1\text{mm}$ ,樟树精油对其抑制率为64.94%。樟树精油对青枯病菌的抑菌圈直径为 $27.2 \pm 1.0\text{mm}$ ,属于高抑菌强度,对胡萝卜软腐果胶杆菌的抑菌圈直径为 $23.3 \pm 1.2\text{mm}$ ,属于高抑菌强度。

### 附图说明

[0020] 图1为樟树精油对真菌及细菌病原菌的抑菌效果图。其中,A为水稻纹枯病菌,B为辣椒疫霉病菌,C为青枯病菌,D为胡萝卜软腐果胶杆菌;每幅图左边为空白对照平板,右边为添加精油试剂处理的平板。

### 具体实施方式

- [0021] 以下实施方式为本发明的一些举例,不应被看作是对本发明的限定。
- [0022] 实施例1樟树精油制备
- [0023] 将新鲜樟树枝叶采用热泵烘干机在 $60^{\circ}\text{C}$ 干燥4h至含水率4%,使用粉碎机将干樟树枝叶粉碎过20目筛网得到樟树枝叶粉。
- [0024] 将樟树枝叶粉装入300目滤袋后置于亚临界萃取设备的萃取罐中,使用真空泵将系统压力将至 $0.01\text{MPa}$ ,然后将四氟乙烷从溶剂罐中导入萃取罐,期间采用计量罐控制料液比为1:7(质量体积比 $\text{kg/L}$ ),再采用热水循环系统将萃取罐加热至 $40^{\circ}\text{C}$ ,控制萃取时间40min,萃取结束后将萃取液导入分离罐,使用压缩机回收四氟乙烷,重复萃取4次,合并萃取物,得到樟树粗油。
- [0025] 将樟树粗油加入20倍(质量体积比 $\text{g/ml}$ )无水乙醇后混匀,于 $-18^{\circ}\text{C}$ 静置 24h后过滤,向滤液中加入2%(质量体积比 $\text{g/ml}$ )活性炭,在 $40^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌 30min,过滤后在 $45^{\circ}\text{C}$ 、 $0.01\text{MPa}$ 条件下减压蒸馏回收乙醇,得到樟树精油,相对于原料(樟树枝叶粉)的得率为2.62%(质量比 $\text{g/g}$ )。
- [0026] 实施例2樟树精油制备
- [0027] 将新鲜樟树枝叶采用热泵烘干机在 $55^{\circ}\text{C}$ 干燥5h至含水率4%,使用粉碎机将干樟树枝叶粉碎过20目筛网得到樟树枝叶粉。
- [0028] 将樟树枝叶粉装入300目滤袋后置于亚临界萃取设备的萃取罐中,使用真空泵将系统压力将至 $0.01\text{MPa}$ ,然后将四氟乙烷从溶剂罐中导入萃取罐,期间采用计量罐控制料液比为1:5(质量体积比 $\text{kg/L}$ ),再采用热水循环系统将萃取罐加热至 $45^{\circ}\text{C}$ ,控制萃取时间

40min, 萃取结束后将萃取液导入分离罐, 使用压缩机回收四氟乙烷, 重复萃取4次, 合并萃取物, 得到樟树粗油。

[0029] 将樟树粗油加入20倍(质量体积比g/ml)无水乙醇后混匀, 于-20℃静置24h后过滤, 向滤液中加入2%(质量体积比g/ml)活性炭, 在40℃条件下搅拌30min, 过滤后在45℃、0.01MPa条件下减压蒸馏回收乙醇, 得到樟树精油, 相对于原料(樟树枝叶粉)的得率为2.84%(质量比g/g)。

[0030] 实施例3樟树精油制备

[0031] 将新鲜樟树枝叶采用热泵烘干机在50℃干燥6h至含水率5%, 使用粉碎机将干樟树枝叶粉碎至40目。

[0032] 将樟树枝叶粉装入300目滤袋后置于亚临界萃取设备的萃取罐中, 使用真空泵将系统压力将至0.01MPa, 然后将四氟乙烷从溶剂罐中导入萃取罐, 期间采用计量罐控制料液比为1:6(质量体积比kg/L), 再采用热水循环系统将萃取罐加热至45℃, 控制萃取时间50min, 萃取结束后将萃取液导入分离罐, 使用压缩机回收四氟乙烷, 重复萃取4次, 合并萃取物, 得到樟树粗油。

[0033] 将樟树粗油加入20倍(质量体积比g/ml)无水乙醇后混匀, 于-19℃静置24h后过滤, 向滤液中加入1.5%(质量体积比g/ml)活性炭, 在40℃条件下搅拌30min, 过滤后在45℃、0.01MPa条件下减压蒸馏回收乙醇, 得到樟树精油, 相对于原料(樟树枝叶粉)的得率为3.1%(质量比g/g)。

[0034] 实施例4樟树精油抑菌活性研究

[0035] 采用PDA平板对峙法研究樟树精油对真菌病原菌的抑菌活性, 采用滤纸片琼脂扩散法研究樟树精油对细菌病原菌的抑菌活性, 其中真菌病原菌选用水稻纹枯病菌和辣椒疫霉病菌, 细菌病原菌选用青枯病菌和胡萝卜软腐果胶杆菌。

[0036] 抑菌活性研究用樟树精油试剂配制方法: 无菌条件下, 将樟树精油用一定量的二甲基亚砜(DMSO)溶解配制成100mg/ml溶液。

[0037] PDA平板对峙法: 用6mm打孔器取适量真菌病原菌菌饼置于PDA平板中央, 并在距菌饼约2cm处等距离呈等边三角形的三点位置打孔, 每孔内加入100μl樟树精油试剂, 每处理3个重复, 以不加精油的处理为空白对照。28℃恒温培养至空白对照平板长满菌丝, 测量各处理的菌落直径, 计算抑制率。计算公式如下:

[0038] 抑菌率 = (空白对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 空白对照菌落直径 × 100%

[0039] 滤纸片琼脂扩散法: 向无菌培养皿中倒入约20ml无菌琼脂培养基, 待其凝固后, 加入100μl的细菌病原菌菌液(菌液浓度调整为 $10^8$ CFU/ml), 均匀涂布后于30℃恒温静置1h。在距平板中心点约3cm处呈等边三角形的三点位置放置直径6mm的无菌圆形滤纸片, 用移液器吸取20μl樟树精油试剂弥散于滤纸上, 28℃恒温培养24h后观察精油试剂对胡萝卜软腐果胶杆菌的抑菌效果, 48h后观察精油对青枯病菌的抑菌效果, 用十字交叉法测量抑菌圈直径。抑菌圈直径 > 15mm表示高度抑菌,  $10\text{mm} \leq$  抑菌圈直径  $\leq 15\text{mm}$ 表示中度抑菌,  $0\text{mm} <$  抑菌圈直径  $< 10\text{mm}$ 表示低度抑菌。

[0040] 根据本发明的制备方法, 分别采用四氟乙烷和正丁烷作为萃取溶剂萃取樟树精油, 采用四氟乙烷作为萃取溶剂制得的樟树精油对水稻纹枯病菌的抑制率为88.65%, 对辣椒疫霉病菌的抑制率为64.94%, 采用正丁烷做萃取溶剂制得的樟树精油对水稻纹枯病

菌的抑制率为78.09%，对辣椒疫霉病菌的抑制率为56.97%，四氟乙烷萃取的樟树精油对以上两株真菌病原菌的抑制效果更显著。采用四氟乙烷作为萃取溶剂制得的樟树精油对青枯病菌的抑菌圈直径为 $27.2 \pm 1.0\text{mm}$ ，对胡萝卜软腐果胶杆菌的抑菌圈直径为 $23.3 \pm 1.2\text{mm}$ ，都属于高度抑菌，采用正丁烷做萃取溶剂制得的樟树精油对青枯病菌的抑菌圈直径为 $12.3 \pm 1.2\text{mm}$ ，对胡萝卜软腐果胶杆菌的抑菌圈直径为 $13.3 \pm 1.1\text{mm}$ ，都属于中度抑菌，四氟乙烷萃取的樟树精油对以上两株细菌病原菌的抑制效果更显著。四氟乙烷抑菌效果见图1。四氟乙烷和正丁烷萃取的樟树精油的主要组成成分见表1，因组成成分及比例差异，使其在对不同病原菌的抑菌活性上产生显著差异。

[0041] 表1. 亚临界四氟乙烷与正丁烷萃取的樟树叶精油GC/MS分析结果

类别	序号	保留时间/min	化合物	相对含量/%	
				四氟乙烷	丁烷
[0042]	1	4.449	$\alpha$ -侧柏烯	0.08	0.07
	2	4.643	$\alpha$ -蒎烯	1.31	1.18
	3	5.033	茨烯	0.84	0.73
	4	5.552	桉烯	0.39	0.31
	5	5.720	$\beta$ -蒎烯	0.58	0.48
	6	5.921	$\beta$ -月桂烯	0.7	0.53
	7	6.494	$\beta$ -水芹烯	0.17	0.14
	8	7.238	D-柠檬烯	1.94	1.51
	9	9.347	2-萜烯	-	0.16
	10	9.351	异松油烯	0.18	0.17
	11	14.628	$\alpha$ -松油烯	1.05	0.8
	12	25.120	咕巴烯	0.26	0.14
	13	26.017	$\beta$ -榄香烯	0.18	-
	14	29.108	马兜铃烯	0.27	0.24
	15	29.894	$\alpha$ -石竹烯	3.98	3.25

[0043]

	16	31.476	大根香叶烯 D	3.95	3.07
	17	31.915	$\alpha$ -古芸烯	8.73	7.74
	18	32.365	大根香叶烯 B	2.8	2.41
	19	33.016	$\alpha$ -布藜烯	0.40	-
	20	33.827	$\delta$ -杜松烯	0.21	0.15
	21	36.031	$\alpha$ -愈创烯	-	0.39
	22	36.032	$\gamma$ -榄香烯	0.55	0.79
	23	37.383	氧化石竹烯	0.34	0.28
	24	38.682	$\gamma$ -芹子烯	0.55	0.31
醇类	25	7.353	桉叶油醇	1.56	1.18
	26	8.745	松油醇	0.2	0.15
	27	12.108	樟脑	1.1	0.81
	28	13.417	龙脑	43.85	45.41
	29	13.894	松油烯-4-醇	0.37	0.27
	30	37.173	匙叶桉油烯醇	0.66	0.63
	31	39.884	6-芹子烯-4-醇	14.57	15.26
	32	45.136	喇叭醇	0.81	0.76
	33	50.447	叶绿醇	0.56	4.60
酯类	34	3.02	2-辛基环丙烷十二酸甲酯	-	0.02
	35	19.612	左旋乙酸冰片酯	2.33	0.81
烃类	36	7.066	$\beta$ -伞花烃	0.19	0.12

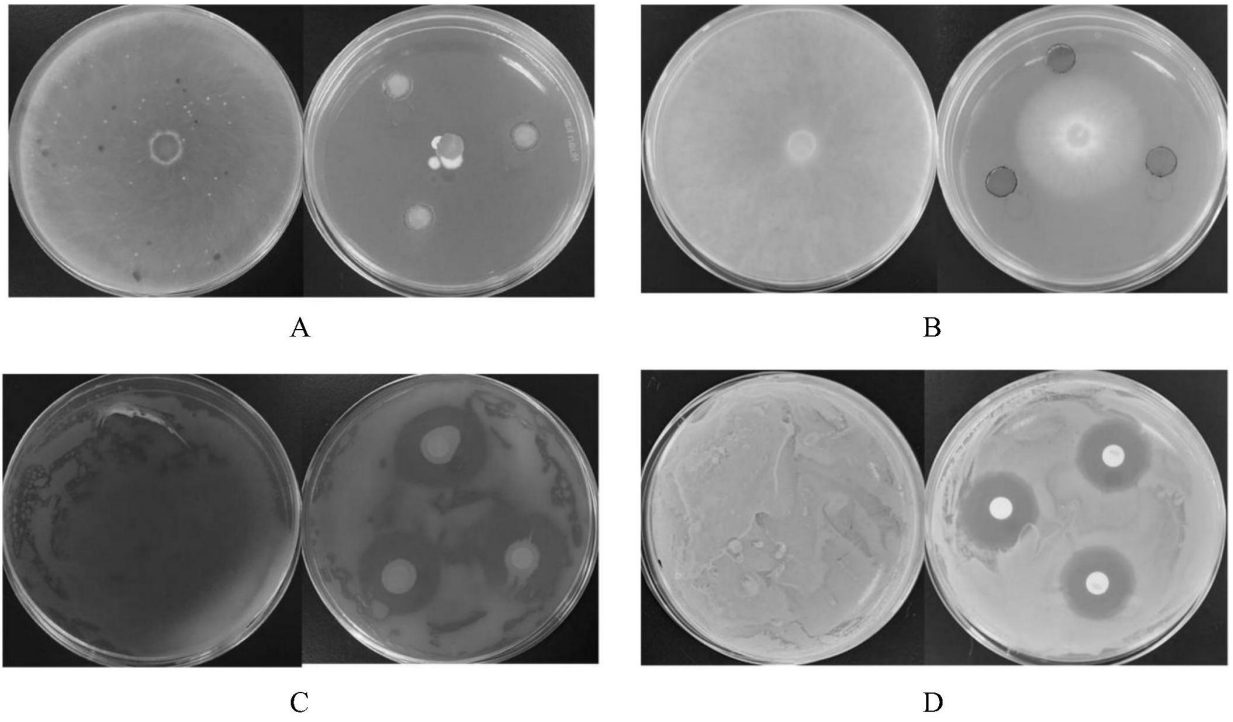


图1