

核桃叶精油提取工艺优化及其抑菌、抗氧化、抗肿瘤、驱杀蜚虫活性研究

戴君昂¹, 张乐菁¹, 赵 晶¹, 邓兴梅^{1,2}, 闫梦阳¹, 韩馨馨¹, 刘雪峰¹, 赵天艺²,
张 旭², 孙志华^{2,3*}, 张 辉^{1,2,3*}
(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000; 2. 新疆生产建设兵团动物疾病防控重点实验室, 新疆 石河子 832000; 3. 动物健康养殖国家国际联合研究中心, 新疆 石河子 832000)

摘要: **目的** 优化核桃叶精油提取工艺, 并评价其抑菌、抗氧化、抗肿瘤、驱杀蜚虫活性。**方法** 在单因素试验基础上, 以料液比、超声时间、超声功率为影响因素, 提取率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺, 通过测定抑菌圈及最低抑菌浓度评价抑菌活性, 测定 DPPH、ABTS 自由基清除能力评价抗氧化活性, MTT 法测定对小鼠乳腺癌 4T1 细胞体外增殖的抑制活性, 滤纸圈法、滤纸包法评价对图兰扇头蜚的驱杀能力。**结果** 最佳条件为提取溶剂石油醚, 料液比 1 : 20, 超声时间 30 min, 超声功率 200 W, 提取率为 0.077%。精油对粪肠球菌、链球菌、库特氏菌、金黄色葡萄球菌、纺锤形赖氨酸芽孢杆菌有抑制作用, 其中链球菌抑菌圈直径最大; 对 DPPH、ABTS 自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.532、0.344 mg/mL; 对 4T1 细胞的 IC₅₀ 值分别为 115.3 (24 h)、49.80 (48 h)、24.00 (96 h) μg/mL; 对图兰扇头蜚的有效驱避时间为 50 min, 触杀 LC₅₀ 值分别为 4.583 0 (幼蜚)、22.442 (若蜚)、45.441 (成蜚) mg/mL。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于提取抗氧化、抗肿瘤、驱杀蜚虫活性较强, 抑菌活性较弱的核桃叶精油。

关键词: 核桃叶; 精油; 提取工艺; Box-Behnken 响应面法; 抑菌活性; 抗氧化活性; 抗肿瘤活性; 驱杀蜚虫活性
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)08-2703-07
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.036

核桃又名胡桃, 属于世界四大干果之一, 具有极高的营养及经济价值^[1]。2020 年我国新疆核桃种植面积为 586.7 万亩, 主要集中在南疆阿克苏、和田及喀什地区, 产量高达 115.4 万吨, 是当地农民的主要收入来源^[2]。目前对核桃的开发利用集中于果实^[3], 叶、青皮、花等核桃副产物的研究较少。这些副产物大多被丢弃在田间, 不仅造成了环境污染, 还导致了巨大的经济损失。已有研究表明, 核桃叶提取物具有良好的抑菌、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、驱杀虫等作用^[4-7], 但有关核桃叶精油的研究较少。

精油作为从植物中提取的次级代谢产物, 含有醇、醛、酚酸、单萜、倍半萜和某些芳香族化合物, 具有抑菌、抗氧化、抗肿瘤、杀虫等活性^[8-9]。随着农药的长期单一使用, 细菌及害虫的耐药性日益增强, 因此从天然植物中寻找有效的抑菌和驱杀害虫成分十分重要^[10]。目前, 已有一些植物被报道具有一定杀虫、抗氧化及抑菌功效^[11-13]。本实验以核桃叶为原料, 采用超声波辅助溶剂提取法提取精油, 通过单因素试验及 Box-BehnkenBox-Behnken 响应面法

优化提取工艺, 采用 HPLC-MS 对核桃叶精油成分进行鉴定和定量分析, 并测定其抑菌、抗氧化、抗肿瘤及驱杀蜚虫能力, 以期对核桃叶精油的进一步研究提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器 JJ324BC 万分之一天平 (常熟市双杰测试仪器厂); Hei-VAP Precision (ML) 旋转蒸发仪 (杭州庚雨仪器有限公司); 酶标仪、二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); 微量分光光度计 (韩国 KLAB 高丽实验室); Agilent 7890A 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)。

1.2 药物与试剂 核桃叶 (由石河子大学副教授孙志华鉴定为正品)、图兰扇头蜚 (经石河子大学硕士戴君昂鉴定为正品) 于 2023 年 5 月采自新疆南疆地区。大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、链球菌 (*Streptococcus*)、库特氏菌 (*Kurthia gibsonii*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureu*)、气球菌 (*Aerococcus*)、纺锤形赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus fusiformis*)、小鼠 4T1 乳腺癌细

收稿日期: 2024-11-07
基金项目: 南疆重点产业创新支撑计划 (2022DB018); 第七师胡杨河市科技计划项目 (2024C13); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202310759001); 石河子大学高层次人才项目 (RCZK201941)
作者简介: 戴君昂 (1997—), 男, 硕士生, 研究方向为天然药物研究与开发利用。Tel: 15764337917, E-mail: 997919828@qq.com
*** 通信作者:** 孙志华 (1989—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为天然药物研究与开发利用。E-mail: zhihuasun918@163.com
张 辉 (1978—), 男, 博士, 教授, 从事传染病的诊断和致病机理研究。E-mail: prof. zhang@foxmail.com

胞均来自石河子大学动物科技学院分子生物学实验室。NaCl、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、正己烷（分析纯，天津市富宇精细化工有限公司）；1，1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）、2，2-联氮-二（3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸）二铵盐（ABTS）、抗坏血酸（Vc）、无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司）；1640 培养基、胎牛血清、PBS 缓冲液（美国 Gibco 公司）；琼脂粉、蛋白胨、酵母提取物（北京索莱宝科技有限公司）。

2 方法与结果

2.1 核桃叶精油提取 取新鲜核桃叶，去除杂质后，用去离子水轻柔冲洗 3 次，以除去叶片表面的灰尘及残留污染物，60 ℃烘干，粉碎，过 40 目标准筛。准确称取 20 g 核桃叶粉末，加入提取溶剂，超声提取，抽滤，收集滤液。滤渣用 5 mL 对应溶剂洗涤 2 次，合并洗涤液与滤液，旋转蒸发至无溶剂馏出，即得深绿色的核桃叶精油。

2.2 统计学分析 通过 SPSS 26.0.0 软件进行处理，组间

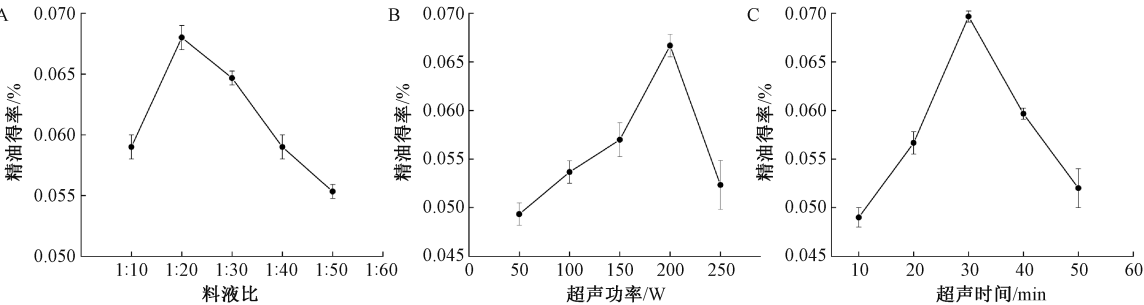


图 1 单因素试验结果

2.3.2 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上，选取料液比（A）、超声时间（B）、超声功率（C）为影响因素，精油得率（Y）为评价指标，进行三因素三水平试验，因素水平见表 1，设计与结果见表 2。采用 Design-Expert 软件对结果进行回归分析，得到二次回归方程为 $Y=0.077+0.009\ 413A+0.001\ 563B-0.002\ 150C+0.001\ 100AB-0.001\ 225AC+0.000\ 325\ 0BC-0.023A^2-0.004\ 250B^2-0.005\ 225C^2$ 。

表 1 Box-Behnken 响应面法因素水平			
水平	A 料液比	B 超声时间/min	C 超声功率/W
1	1：30	40	250
0	1：20	30	200
-1	1：10	20	150

方差分析见表 3，可知因素 A、B、C 及二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对核桃叶精油提取率有极显著影响（ $P<0.01$ ），交互项 AC 对核桃叶精油提取率有显著影响（ $P<0.05$ ），其余项不显著；由回归模型 F 值得出，因素 A 对精油得率的影响最大。

根据回归方程，采用 Design Expert 10.0 软件绘制响应面图和等高线图，见图 2。响应曲面越陡峭说明其对精油提取率的影响越显著，等高线图则是越接近椭圆说明双因素交互作用对精油的影响越显著。由此可知，图 2a 对应的曲

比较采用单因素方差分析，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.3 核桃叶精油提取工艺优化 通过单因素试验及 Box-Behnken 响应面法优化精油提取工艺，确定最佳的溶剂、料液比、超声功率及超声时间。精油得率计算公式为精油得率=精油质量/核桃叶干粉重×100%。

2.3.1 单因素试验 固定其他条件，分别以 2% NaCl 水溶液、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇为溶剂，提取核桃叶精油，确定最佳提取溶剂。以石油醚为溶剂，在不同料液比（1：10、1：20、1：30、1：40、1：50）、不同超声功率（50、100、150、200、250 W）、不同提取时间（10、20、30、40、50 min）条件下提取核桃叶精油，探究最佳料液比、超声功率及超声时间。由图 1 可知，提取核桃叶精油的最佳料液比为 1：20，最佳超声功率为 200 W，最佳超声时间为 30 min。

表 2 Box-Behnken 响应面法设计与结果

试验号	A	B	C	精油得率/%
1	-1	-1	0	0.039
2	1	-1	0	0.057
3	-1	1	0	0.040
4	1	1	0	0.062
5	-1	0	-1	0.041
6	1	0	-1	0.061
7	-1	0	1	0.038
8	1	0	1	0.054
9	0	-1	-1	0.068
10	0	1	-1	0.071
11	0	-1	1	0.064
12	0	1	1	0.067
13	0	0	0	0.076
14	0	0	0	0.078
15	0	0	0	0.077
16	0	0	0	0.076
17	0	0	0	0.077

线有较大的弧度，其次为图 2b，表明交互项 AB 对核桃叶精油的提取率有显著影响，与表 3 结果一致。

根据响应面优化结果，得最佳精油提取工艺为液料比 1：23.410、超声功率 188.06 W、超声时间 32.191 min，预测最大精油得率为 0.078%。结合实际将其调整为料液比

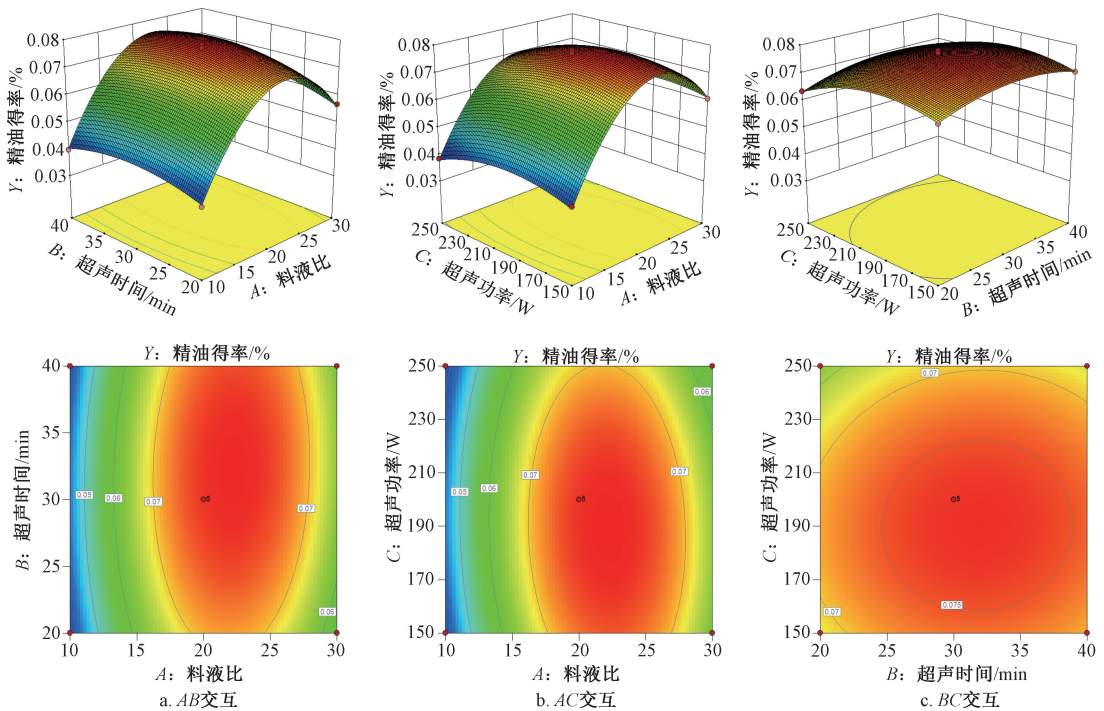


图 2 各因素响应面图

1 : 20、超声功率 200 W、超声时间 30 min，重复实验 3 次， 提取得率为 0.077%，与预测值接近。

表 3 方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	3.352×10 ⁻³	9	3.725×10 ⁻⁴	403.75	<0.000 1
A	7.088×10 ⁻⁴	1	7.088×10 ⁻⁴	768.30	<0.000 1
B	1.953×10 ⁻⁵	1	1.953×10 ⁻⁵	21.17	0.002 5
C	3.698×10 ⁻⁵	1	3.698×10 ⁻⁵	40.09	0.000 4
AB	4.840×10 ⁻⁶	1	4.840×10 ⁻⁶	5.25	0.055 8
AC	6.002×10 ⁻⁶	1	6.002×10 ⁻⁶	6.51	0.038 1
BC	4.225×10 ⁻⁷	1	4.225×10 ⁻⁷	0.46	0.520 3
A ²	2.257×10 ⁻³	1	2.257×10 ⁻³	2 446.09	<0.000 1
B ²	7.605×10 ⁻⁵	1	7.605×10 ⁻⁵	82.44	<0.000 1
C ²	1.149×10 ⁻⁴	1	1.149×10 ⁻⁴	124.61	<0.000 1
残差	6.458×10 ⁻⁶	7	9.225×10 ⁻⁷	—	—
失拟项	3.658×10 ⁻⁶	3	1.219×10 ⁻⁶	1.74	0.296 5
纯误差	2.800×10 ⁻⁶	4	7.000×10 ⁻⁷	—	—
总值	3.359×10 ⁻³	16	—	—	—

2.4 核桃叶精油成分分析 将 100 mg 核桃叶精油溶于 1 mL 正己烷中，采用 HPLC-MS 分析精油成分。

色谱条件：HP-5MS 弹性毛细管柱色谱柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）；程序升温（50 ℃，6 min；50~150 ℃，4 ℃/min；150 ℃，1 min；150~250 ℃，5 ℃/min；250 ℃，15 min）；载气高纯氦气，体积流量 1.0 mL/min；进样口温度 250 ℃；进样量 0.5 μL；分流比 50 : 1。

质谱条件：电子轰击源离子源；离子源温度 230 ℃；四级杆温度 150 ℃；电子能量 70 eV；接口温度 250 ℃；质量扫描范围 50~500 amu。通过与标准质谱数据库数据比对定性，采用峰面积归一化法计算各组分的相对含量。

检测得到 135 种化合物，使用峰面积归一法计算各成

分含量，含量排名前 30 的化合物信息见表 4。

2.5 体外抑菌活性研究

2.5.1 抑菌圈测定 参照临床实验室标准化研究所（CLSI）发布的标准及李秋香等^[14]研究结果，采用滤纸片法。用无菌生理盐水将菌液稀释至 10⁸ CFU/mL，吸取 100 μL 菌液均匀涂布于培养基表面。取 20 μL 精油滴于无菌滤纸片（直径 6 mm），以无菌水为空白对照，待纸片充分吸收后贴在培养基表面，置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h，每个菌进行 3 次重复。培养结束后，采用十字交叉法测量抑菌圈直径，取平均值。抑菌圈直径>15 mm 表示高度抑菌，10~15 mm 为中度抑菌，<10 mm 为低度抑菌，无抑菌圈则为不抑菌。

表 4 核桃叶精油化学成分及其相对含量测定结果

编号	名称	分子式	相对含量/%	CAS 号
1	植物醇	C ₂₀ H ₄₀ O	9. 11	150-86-7
2	β-桉叶醇	C ₁₅ H ₂₆ O	4. 81	473-15-4
3	邻苯二甲酸二异丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	4. 62	84-69-5
4	邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	4. 53	84-74-2
5	α-桉叶醇	C ₁₅ H ₂₆ O	4. 46	473-16-5
6	植酮	C ₁₈ H ₃₆ O	3. 54	502-69-2
7	(3S)-1,2,3,4,5,6,7,8-八氢化-3,8-四甲基-5-奥甲醇乙酸酯	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	3. 12	134-28-1
8	2-(6,10-dimethyl-2-spiro[4.5]dec-9-enyl)propan-2-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	2. 77	1460-73-7
9	2-(4a,8-dimethyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-naphthalen-2-yl)prop-2-en-1-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	2. 67	1000411-50-1
10	1H-cycloprop[c]indene-2,3(1aH,3aH)-dione, tetrahydro-3a,7,7-trimethyl-	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	2. 13	96678-99-8
11	(-)-桃金娘烯醇	C ₁₀ H ₁₆ O	2. 08	19894-97-4
12	(-)-菊酯 D	C ₁₅ H ₂₄	2. 04	23986-74-5
13	6,6-二甲基-2-亚甲基二环[3.1.1]-3-庚醇	C ₁₀ H ₁₆ O	2. 03	5947-36-4
14	3,5,11,15-四甲基-1-十六烷基-3-醇	C ₂₀ H ₄₀ O	1. 99	649699-11-6
15	石竹素	C ₁₅ H ₂₄ O	1. 92	1139-30-6
16	法尼基丙酮	C ₁₈ H ₃₀ O	1. 86	1117-52-8
17	抗氧化剂 264	C ₁₅ H ₂₄ O	1. 84	128-37-0
18	(E)-β-金合欢烯	C ₁₅ H ₂₄	1. 84	18794-84-8
19	桉油烯醇	C ₁₅ H ₂₄ O	1. 83	6750-60-3
20	棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1. 64	112-39-0
21	丁香酚	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1. 56	97-53-0
22	苯乙酮	C ₈ H ₈ O	1. 44	98-86-2
23	3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲醛	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1. 39	1620-98-0
24	1-methyl-6-(3-methylbuta-1,3-dienyl)-7-xabicyclo[4.1.0]heptane	C ₁₂ H ₁₈ O	1. 19	1000185-67-2
25	亚麻酸甲酯	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	1. 09	301-00-8
26	2,6-二(叔丁基)-4-羟基-4-甲基-2,5-环己烯-1-酮	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	1. 08	10396-80-2
27	Δ-杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	1. 07	483-76-1
28	新植二烯	C ₂₀ H ₃₈	0. 97	504-96-1
29	β-紫罗酮	C ₁₃ H ₂₀ O	0. 94	79-77-6
30	马苳烯酮	C ₁₀ H ₁₄ O	0. 85	80-57-9

2.5.2 最低抑菌浓度（MIC）测定 采用微量二倍稀释法^[15]。以 Tween-80 为增溶剂，将核桃叶精油稀释至 200.0、100.0、50.00、25.00、12.50、6.250、3.125、1.563、0.782 0、0.391 0 mg/mL。将 10⁶ CFU/mL 菌液接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，再分别加入 100 μL 上述精油，最终每孔菌液浓度为 5×10⁵ CFU/mL，以无菌水为阴性对照，无菌液体培养基为空白对照。每个浓度的每个供试菌种设置 3 个复孔。在 37 ℃ 恒温培养箱培养 24 h，观察培养基的浑浊度，清澈透明的培养基所对应的最低精油质量浓度为 MIC。

2.5.3 最低杀菌浓度（MBC）测定 吸取 8、4、2、1、

0.5 倍 MIC 浓度混合菌液各 100 μL，均匀涂布于无菌固体培养基表面，37 ℃ 恒温培养 24 h 后观察培养基表面，无明显菌落生长的培养基所对应的精油质量浓度为 MBC^[16]。

本研究以大肠杆菌、粪肠球菌、肺炎克雷伯菌、链球菌、库特氏菌、金黄色葡萄球菌、气球菌、纺锤形赖氨酸芽孢杆菌为供试菌，核桃叶精油对供试菌种的抑菌圈、MIC 及 MBC 见表 5。由此可知，所有菌种对照组均无抑菌圈；由抑菌圈判定核桃叶精油对粪肠球菌、链球菌、库特氏菌、金黄色葡萄球菌、纺锤形赖氨酸芽孢杆菌具有抑菌作用，对其余菌种无抑制作用。

表 5 核桃叶精油抑菌活性测定结果

菌种	抑菌圈直径/cm	MIC/(mg·g ⁻¹)	MBC/(mg·g ⁻¹)	对照组
大肠杆菌	0	—	—	+
粪肠球菌	8.33	12.5	25.0	+
肺炎克雷伯菌	0	—	—	+
链球菌	9.77	3.06	6.13	+
库特氏菌	8.65	12.5	12.5	+
金黄色葡萄球菌	8.83	12.5	50.0	+
气球菌	0	—	—	+
纺锤形赖氨酸芽孢杆菌	9.43	6.13	12.5	+

注：+表示菌落正常生长，无抑制效果。

2.6 体外抗氧化活性研究

2.6.1 DPPH 自由基清除能力测定 参照 Zhu 等^[15] 方法并稍作改进。称取 0.039 4 g DPPH，加入 10 mL 无水乙醇，超声 2 min 使其完全溶解，配制成 10 mmol/L 的 DPPH 母液，避光密封保存于 4 ℃ 冰箱。DPPH 母液用无水乙醇稀释，得到 0.1 mmol/L DPPH 工作液。将核桃叶精油稀释成 32.0、16.0、8.00、4.00、2.00、1.00、0.500、0.250、0.125、0.062 5、0.031 3 mg/mL 的溶液。吸取 2 mL 各质量浓度精油，加入 2 mL DPPH 工作液，充分混匀，室温避光静置 30 min，分光光度计测定 517 nm 波长处的吸光度值。以 Vc 作为阳性对照，无水乙醇为空白对照，各质量浓度精油和对照均重复 3 次，取平均值，计算核桃叶精油 DPPH 清除率，公式为 $DPPH \text{ 自由基清除率} = [1 - (a - b) / c] \times 100\%$ ，式中 a 为待测精油+DPPH 工作液的吸光度， b 为待测精油+无水乙醇的吸光度， c 为无水乙醇+DPPH 工作液的吸光度。

由图 3A 可知，当质量浓度为 32.0 mg/mL 时，核桃叶精油对 DPPH 自由基清除率最高，达到 99.81%，效果优于 Vc，IC₅₀ 值为 0.532 mg/mL，表明核桃叶精油对 DPPH 自由

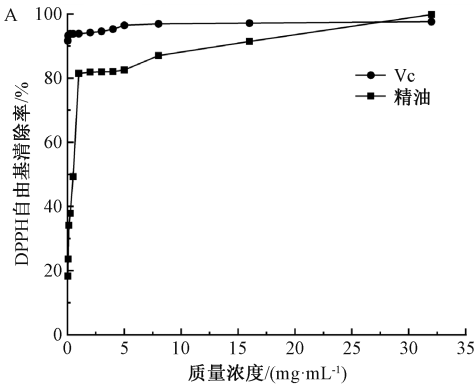


图 3 核桃叶精油质量浓度对自由基清除率的影响

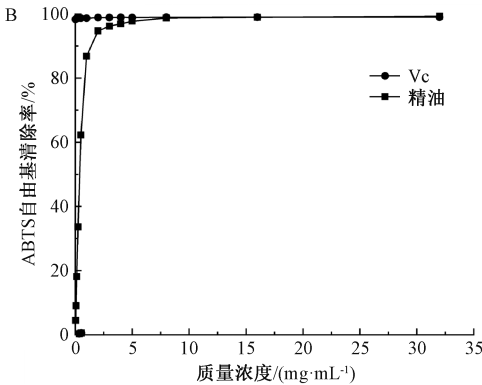
2.7 体外抗肿瘤活性研究 参照 Cao 等^[17] 方法，采用 MTT 法测定核桃叶精油对 4T1 细胞体外增殖的抑制作用。4T1 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素的 1640 培养基培养，至对数生长期时，用 0.25% 胰蛋白酶消化，制成 5×10^4 /mL 密度的细胞悬液，接种于 96 孔板，每孔 100 μ L，37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h 至细胞贴壁。以 DMSO 将精油溶解于无菌培养基中，精油质量浓度分别为 300、150、75.0、37.5、18.7、9.38、4.69、2.35 μ g/mL，并用 0.25 μ m 滤膜过滤，取 100 μ L 加入 96 孔板中，作用 24、48、96 h 后，每孔加入 10 μ L MTT (5 mg/mL)，37 ℃ 孵育 4 h，弃去上清，加入 150 μ L DMSO，平板震荡 10 min 后使用酶标仪在 490 nm 波长处测定光密度 (OD) 值，每组设置 6 个复孔，以 DMSO+细胞悬液为阴性对照，DMSO+培养基为空白对照。计算精油对 4T1 细胞的增殖抑制率，公式为 $细胞抑制率 = (阴性对照组平均 OD 值 - 精油处理组平均 OD 值) / (阴性对照组平均 OD 值 - 空白对照平均 OD 值) \times 100\%$ 。

由图 4 可知，核桃叶精油对 4T1 细胞的 IC₅₀ 分别为

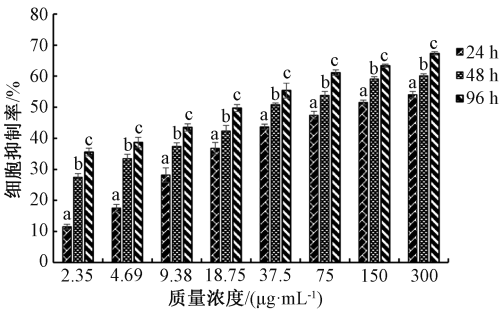
基具有较强的清除能力。

2.6.2 ABTS 自由基清除能力测定 参照 Jena 等^[16] 方法并稍作修改。称取 0.20 g ABTS 和 0.034 g 过硫酸钾，加入 50 mL 蒸馏水，混匀后室温避光静置 24 h，用无水乙醇将上述混合溶液稀释至在 734 nm 波长下吸光度为 0.70 ± 0.020 ，得到 ABTS 工作液。核桃叶精油稀释方法及质量浓度同“2.6.1”项。吸取各质量浓度精油 1 mL，加入 4 mL ABTS 工作液，混匀后在室温下避光反应 30 min，在 734 nm 波长处测其吸光度值，以 Vc 作为阳性对照，无水乙醇为空白对照，各浓度精油和对照均重复 3 次，取平均值，计算 ABTS 自由基清除率，公式为 $ABTS \text{ 自由基清除率} = [1 - (A_a - A_b) / A_c] \times 100\%$ ，式中 A_a 为精油+ABTS 工作液的吸光度， A_b 为精油+无水乙醇的吸光度， A_c 为无水乙醇+ABTS 工作液的吸光度。

由图 3B 可知，当浓度达到 32.00 mg/mL 时，ABTS 自由基清除率最高，达到 99.31%；精油浓度为 8.00 mg/mL 时，ABTS 自由基的清除率与 Vc 相同，其 IC₅₀ 值为 0.344 mg/mL，表明核桃叶精油对 ABTS 自由基具有较强的清除能力。



115.3 (24 h)、49.80 (48 h)、24.00 (96 h) μ g/mL，表明核桃叶精油对小鼠鼠腺癌 4T1 细胞具有较好的体外增殖抑制活性。



注：同指标中不同字母表示同一浓度不同时间样品间具有显著差异 ($P < 0.05$)。

图 4 核桃叶精油对 4T1 细胞体外增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

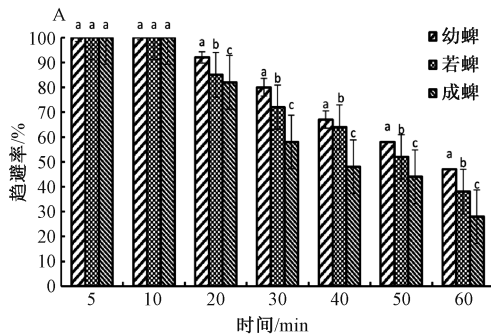
2.8 驱杀蟑螂活性研究

2.8.1 核桃叶精油对图兰扇头蟑的驱避作用 幼蟑采用滤

纸圈法,参考赵聪等^[18]方法并进行适当修改。取直径 7 cm 的定性滤纸,使用打孔器制作内径 5 cm 的同心圆,形成宽度 1 cm 的环形区域(即滤纸外周区域),取 20 μL 精油均匀滴加于滤纸外周环带区,(25 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 至溶剂完全挥发。以等体积无菌水作为阴性对照,平行处理 3 次。取 50 只图兰扇头蚧幼蚧放于滤纸中央,于 5、10、20、30、40、50、60 min 记录蚧在滤纸上的位置,统计中心区的蚧数量,爬出药剂圈不计数,以无菌水为阴性对照,每组重复 3 次,计算蚧虫驱避率,公式为驱避率=(对照组中心区域蚧数-精油组中心区域蚧数)/对照组中心区域蚧数 $\times$ 100%。

结合蚧虫向上攀爬的特点,采用“Y”形嗅觉仪^[19]测定精油对若蚧、成蚧的驱避效果。取 20 只蚧虫装入口径与 Y 形管底部管径相同的管中,连接到 Y 形管底端,密封,Y 形管两顶端各放置加入 15 μL 纯精油或无菌水的直径 1 cm 的圆形滤纸。为避免方位影响,左右管分别为处理组,每组重复 3 次,计算驱避率,公式为驱避率=(通过对照管口蚧数量-通过试验管口蚧数量)/通过对照管口蚧数量 $\times$ 100%。

驱避率<50% 视为无效。由图 5A 可知,当时间在 40 min 内时,精油对各虫体阶段均有驱避效果,当时间超过



注:不同字母表示同一质量浓度不同时间样品之间具有显著差异($P<0.05$)。

图 5 核桃叶精油对图兰扇头蚧的驱避、触杀作用

3 讨论

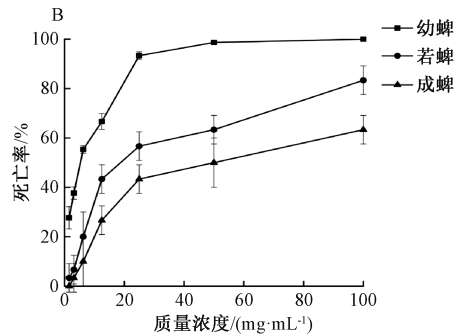
目前,精油提取工艺繁多,有研究表明料液比对精油得率影响最大^[21]。本研究以超声波辅助溶剂法提取核桃叶精油,发现精油得率与各因素在一定范围内呈线性增加,料液比影响居首。本研究结果表明,液料比小于 1:20 时,溶剂增加,核桃叶与石油醚充分接触,精油提取率增大,为 1:20 时得率最高,为 0.068 0%;溶剂继续增加,其他物质浸出增多及旋蒸时间延长导致精油得率下降。超声功率小于 200 W 时,功率越高细胞破碎效果越强,精油得率随之增多,200 W 时达最大,为 0.066 0%;功率继续加大,不稳定物质被破坏,得率降低。超声时间在 30 min 前,精油得率随时间增加而升高,30 min 时达最大,为 0.069 0%;当超声时间继续增加,得率下降,因为超声时间过长会破坏精油分子结构。经优化,本实验核桃叶精油得率 0.077 0%,高于文献报道的 0.047 5%。

植物中的成分决定植物的生物活性,采用 HPLC-MS 对

40 min,精油对成蚧失去驱避效果。综合分析得出,在 30 min 以内精油对图兰扇头蚧各虫体均有良好的驱避效果。

2.8.2 精油对图兰扇头蚧的触杀作用 用无水乙醇将精油梯度稀释,使最终质量浓度分别为 100、50.0、25.0、12.5、6.25、3.13、1.57 mg/mL,选取图兰扇头蚧饥饿幼蚧、若蚧及成蚧。幼蚧采用滤纸包法(LPT)^[20],将 100 只幼蚧放于 4 cm $\times$ 4 cm 滤纸包中,四边夹紧,取 800 μL 待测样品浸渍滤纸包,5 min 后将滤纸包内蚧虫置于干燥滤纸包中封口,置于培养箱中[温度(27 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $\geq$ 80%]培养 24 h 后,在体视显微镜下用镊子触碰蚧虫,不动则为死亡,统计蚧死亡数量。若蚧、成蚧采用体外浸渍法(AIT),用镊子取 10 只饥饿若蚧/成蚧放于 5 mL EP 管中,取 1 mL 各浓度精油分别注入到不同管内,将蚧浸没于各溶液中,实验 5 min 后将蚧移出,置于滤纸上,将体表药液完全擦干后,置于干净试管中,置于培养箱中[(27 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $\geq$ 80%]培养 24 h 后,统计死亡数量,计算 LC₅₀ 值,无水乙醇为对照组,每组实验重复 3 次。

如图 5B 所示,当精油质量浓度为 100.00 mg/mL 时,对 3 种虫体的触杀作用最强,对幼蚧的触杀率为 100%,对若蚧及成蚧触杀率分别为 83.33%、63.33%;对幼蚧、若蚧及成蚧的 LC₅₀ 值分别为 4.583 0、22.442、45.441 mg/mL。



核桃叶精油成分进行分析,结果发现以萜类等为主,与王茹等^[22]检测结果一致,表明核桃叶中挥发性物质可通过提取精油获得。本实验结果显示,核桃叶精油具有一定抑菌能力,但弱于核桃叶乙醇、乙酸乙酯等提取物^[23],可为天然杀菌剂的研发提供参考。DPPH 和 ABTS 自由基清除实验结果表明,核桃叶精油具较强抗氧化能力,但弱于核桃壳、分心木^[24]。王宗芳等^[25]研究证明野核桃叶对不同肿瘤细胞有不同程度的抑制活性,且对正常细胞无抑制作用。植物醇、桃金娘烯醇、 α -桉叶醇等作为核桃叶精油中主要成分,在精油发挥各种功能起到关键作用。

4 结论

本研究通过优化核桃叶精油的提取工艺,提高核桃叶精油得率,并明确其组分,其具有较弱的抑菌活性及良好的抗氧化、抗肿瘤及驱杀图兰扇头蚧活性,可为后续核桃叶的深度开发和应用提供重要的理论依据。

参考文献:

[1] 张翰生, 昌秦湘, 康建忠, 等. 核桃的营养价值及其开发利用研究进展[J]. 浙江农业学报, 2024, 36(4): 905-919.

[2] 孟 佳, 方晓璞, 史宣明, 等. 我国核桃产业发展现状、问题与建议[J]. 中国油脂, 2023, 48(1): 84-86; 103.

[3] 吕泓霖, 张 凤, 杨婧娟, 等. 基于文献分析核桃健脑研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(6): 1571-1576.

[4] 何佳丽, 胡恩明, 王纪辉, 等. 核桃叶及其乙醇提取物化学成分分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(6): 164-169.

[5] Zurek N, Pycia K, Pawlowska A, *et al.* Chemical profiling, bioactive properties, and anticancer and antimicrobial potential of *Juglans regia* L. leaves[J]. *Molecules*, 2023 28(4): 1989.

[6] Bourais I, Elmarkechy S, Taha D, *et al.* Comparative investigation of chemical constituents of kernels, leaves, husk, and bark of *Juglans regia* L., using HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis and evaluation of their antioxidant, antidiabetic, and anti-inflammatory activities[J]. *Molecules*, 2022, 27(24): 8989.

[7] 王 茹, 杨梦思, 张 萍, 等. 核桃叶片挥发性成分提取及其驱蚊活性的研究[J]. 中国农业科技导报, 2024, 26(3): 223-233.

[8] Ancuceanu R, Anghel A I, Hovaneț M V, *et al.* Antioxidant activity of essential oils from *Pinaceae* species[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(3): 286.

[9] Zhang L Y, Liang X X, Ou Z R, *et al.* Screening of chemical composition, anti-arthritis, antitumor and antioxidant capacities of essential oils from four *Zingiberaceae* herbs[J]. *Ind Crop Prod*, 2020, 149: 112342.

[10] Maillard J Y. Resistance of bacteria to biocides[J]. *Microbiol Spectr*, 2018, 6(2): 10.

[11] 臧二欢, 崔卉芸, 毕雅琼, 等. 马勃类药材化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药, 2024, 46(3): 889-899.

[12] 陆 远, 张 研, 王 莹, 等. 金银花化学成分及其抗氧化活性研究[J]. 中成药, 2024, 46(8): 2638-2644.

[13] 宝 钢, 图诺木拉, 朝格巴达拉夫, 等. 龙胆属秦艽组植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药, 2024, 46(8): 2689-2697.

[14] 李秋香, 董 伟, 赵国巍, 等. 香薷精油成分及其抗氧化、抗菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(7): 1154-1162.

[15] Zhu J J, Yang J J, Wu G J, *et al.* Comparative antioxidant, anticancer and antimicrobial activities of essential oils from *Semen Platycladi* by different extraction methods[J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 146: 112206.

[16] Jena S, Ray A, Sahoo A, *et al.* Deeper insight into the volatile profile of essential oil of two *Curcuma* species and their antioxidant and antimicrobial activities[J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 155: 112830.

[17] Cao Y, Feng Y H, Gao L W, *et al.* Artemisinin enhances the anti-tumor immune response in 4T1 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70: 110-116.

[18] 赵 聪, 岳治光, 宁晓冬, 等. 一种节肢动物体外驱避试验装置的研制及初步应用[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2022, 33(4): 573-579.

[19] 季桂梅, 周勇志, 曹 杰, 等. 中国肉桂油纳米乳液的制备及其对蜚的驱避效果[J/OL]. 中国动物传染病学报, 1-9. (2023-09-11) [2025-06-18]. <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20230908.002>.

[20] 朱琪琪. 六种植物精油对镰形扇头蜚的作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.

[21] 吴秋月, 王 帅, 孙英新, 等. 细辛精油提取工艺优化、成分分析及其抑菌效力研究[J]. 中成药, 2024, 46(4): 1307-1312.

[22] 王 茹, 罗莎莎, 王如月, 等. 不同生长时期核桃叶片中挥发性有机物的 GC-IMS 分析[J]. 林业科学, 2023, 59(6): 57-73.

[23] 叶申怡, 阮夏云, 樊 莹, 等. 美国山核桃叶的抗菌作用[J]. 浙江农林大学学报, 2014, 31(4): 658-662.

[24] 郭育涛. 核桃各部位体外抗氧化性、抑菌活性比较及分心木在中式香肠的防腐保鲜作用研究[D]. 成都: 成都大学, 2023.

[25] 王宗芳. 野核桃叶化学成分及抗肿瘤活性的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.