

行政院農業委員會林務局委託研究計畫系列 97-00-5-20

桉樹葉子精油之分析與應用

Analysis and application of the leaf essential oils
from different Eucalyptus



委託機關：行政院農業委員會林務局

執行機關：國立臺灣大學 森林環境暨資源學系

中華民國 97 年 12 月

【摘要】本研究目的為評估三種桉樹葉子精油及其成分的抗病媒蚊幼蟲活性。利用水蒸餾法萃取赤桉 (*Eucalyptus camaldulensis*)、垂尾桉 (*Eucalyptus urophylla*) 及檸檬桉 (*Eucalyptus citriodora*) 三種葉子精油，其收率以垂尾桉最高。比較三種桉樹葉子精油的抗病媒蚊幼蟲活性得知，赤桉葉子精油對埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 幼蟲和白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 幼蟲具有極佳的毒殺作用，其 LC₅₀ 值分別為 31.0 µg/mL 和 55.3 µg/mL。進一步利用 GC-FID 和 GC-MS 分析三種葉子精油中之成分，並評估三種葉子精油中 14 種成分的抗病媒蚊幼蟲活性，證實活性較佳之成分為 α -Phellandrene、Limonene、*p*-Cymene、 γ -Terpinene、Terpinolene 和 α -Terpinene，對埃及斑蚊幼蟲和白線斑蚊幼蟲的半數致死濃度均低於 50.0 µg/mL，其中，以 α -Terpinene 的抗病媒蚊幼蟲活性最強，半數致死濃度僅為 14.7 µg/mL 和 25.2 µg/mL。綜合試驗結果顯示，赤桉葉子精油本身以及 6 種精油成分均有潛力成為抗病媒蚊之天然殺蟲劑。

【關鍵詞】白線斑蚊幼蟲、埃及斑蚊幼蟲、精油、赤桉、葉子、抗病媒蚊幼蟲活性。

【Abstract】 The objectives of this paper were to evaluate the mosquito larvicidal activity of leaf essential oils and their constituents from three eucalyptus species (*Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus citriodora*) against two mosquito species, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Essential oils were prepared by water distillation, and the highest oil yield was obtained from *E. urophylla* leaves. Among these oils, leaf essential oil of *E. camaldulensis* had an excellent inhibitory effect against both *A. aegypti* and *A. albopictus* larvae, with LC₅₀ values of 31.0 µg/mL and 55.3 µg/mL, respectively. In addition, the chemical compositions of the three eucalyptus leaf essential oils were analyzed using Gas Chromatography-Flame Ionization Detection (GC-FID) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The 14 pure constituents extracted from the three eucalyptus leaf essential oils were also tested individually against two mosquito larvae. According to the results of mosquito larvicidal assays, the effective constituents in leaf essential oil were α-phellandrene, limonene, *p*-cymene, γ-terpinene, terpinolene and α-terpinene. The LC₅₀ values of these constituents against two mosquito larvae were below 50 µg/mL. Among the six effective constituents, α-terpinene exhibits the best larvicidal effect against both *A. aegypti* and *A. albopictus* larvae with LC₅₀ of 14.7 µg/mL and 25.2 µg/mL. Results of this study show that the leaf essential oil of *E. camaldulensis* and its effective constituents might be considered as a potent source for the production of fine natural larvicides.

【 Keywords 】 *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, Essential oils, *Eucalyptus camaldulensis*, Leaf, Mosquito larvicidal activity

行政院農業委員會林務局暨所屬機關 九十七年度委託研究計畫報告書

I、計畫序號、名稱

- (I) 計畫編號：97-00-5-20
- (II) 計畫名稱：桉樹葉子精油之分析與應用
- (III) 執行機關：國立臺灣大學森林環境暨資源學系
- (IV) 計畫主持人：張上鎮教授、鄭森松助理研究員（共同主持人）

II、前言

近年來，由於快速都市化、交通便捷以及病媒防治失措等因素影響，導致登革熱有全球流行的趨勢，目前已成為東南亞國家十大兒童死亡原因之一。登革熱的傳播媒介主要為埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 及白線斑蚊 (*Aedes albopictus*)。雖然目前病媒蚊防治的方法很多，其中最重要且最有效之方法即是使用環境衛生用藥，但環境衛生用藥種類繁多，且多為高毒性之合成藥劑，長期使用後，除了對吾人健康及環境品質造成嚴重傷害之外，亦常使病媒蚊產生抗藥性而失去殺蟲劑之效用。現今由於環保意識的覺醒，故尋找「天然殺蟲劑」是目前國際研究之趨勢及重要課題。

國外已有許多學者進行天然殺蟲劑的研究與開發 (Ioset *et al.*, 2000a; 2000b; Ho *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2003; Knio *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2007)，例如取 Lebanon 地區常用的藥草植物及其成分對 *Ochlerotatus caspius* 幼蟲進行抗病媒蚊幼蟲活性評估，經 24 h 與 48 h 試驗後，發現 Eugenol 之活性最佳， LC_{50} 分別為 7.53 $\mu\text{g/mL}$ 及 5.57 $\mu\text{g/mL}$ ，其次則為 Thymol (24 h 之 $LC_{50}=33.65 \mu\text{g/mL}$ ，48 h 之 $LC_{50}=33.31 \mu\text{g/mL}$) 與 Carvacrol (24 h 之 $LC_{50}=35.48 \mu\text{g/mL}$ ，48 h 之 $LC_{50}=34.55 \mu\text{g/mL}$) (Knio *et al.*, 2008)。另外，Silva 等人 (2007) 曾針對多種植物精油及其化合物對埃及斑蚊四齡幼蟲 24 h 之毒殺活性進行研究，結果發現 7 種化合物中以 R-Limonene 之抑制效果最好， LC_{50} 為 37 $\mu\text{g/mL}$ ，其次則為 Carvacrol ($LC_{50}=70 \mu\text{g/mL}$)、Thymol ($LC_{50}=79 \mu\text{g/mL}$) 和 γ -Terpinene (LC_{50}

=95 µg/mL)。然國內此方面的相關報告較少，直到最近才由本研究室開始進行這一類試驗，目前發現臺灣肖楠葉子精油具有極強的抗病媒蚊活性，其中，臺灣肖楠葉子精油成分中 Limonene 對埃及斑蚊幼蟲的半數致死濃度為 9.5 µg/mL，顯示 Limonene 頗具潛力成為天然抗病媒蚊幼蟲活性成分（張惠婷等，2003）；另外土肉桂葉子精油中的四種化合物 Cinnamaldehyde、Cinnamyl acetate、Eugenol 及 Anethole 等對埃及斑蚊幼蟲均具有毒殺效果，其半數致死濃度均低於 50 µg/mL（Cheng *et al.*, 2004）；而由柳杉葉子精油所分離出的化合物亦具有相當的活性，如 α -Terpinene、 γ -Terpinene、*p*-Cymene、3-Carene、Terpinolene 和 β -Myrcene 6 種化合物對病媒蚊幼蟲之 LC₅₀ 值均低於 50 µg/mL（Cheng *et al.*, 2008a）；此外，國內造林地所生產的紅心柳杉邊材中 Tectoquinone 對埃及斑蚊及白線斑蚊幼蟲也具有極佳之抑制效果，LC₅₀ 值分別為 3.3 及 5.4 µg/mL（Cheng *et al.*, 2008b）。

桉樹為桃金娘科（Myrtaceae），桉樹屬（*Eucalyptus*），全世界共約有 700 餘種（Menut *et al.*, 1995），其木材可供建築、家具、燃料、紙漿及纖維等工業用材；枝葉可提煉精油，供作醫藥之用。由於生長快速、環境適應力強，因此臺灣自 80 年代引進栽植，主要做為紙漿工業用材，但是葉子則一直未能善加利用，十分可惜。根據前人的研究發現桉樹精油可抵抗細菌（Cimanga *et al.*, 2002）、真菌（蘇裕昌等，2006），且有治療肺結核、低血糖、燙傷、黏膜炎、感冒、喉頭炎、氣喘、風濕症等功效（Silva *et al.*, 2003; Siramon and Ohtani, 2007），然而卻無研究探討其抗蟲之功效，因此，本計畫評估三種桉樹葉子精油及其成分作為天然殺蟲藥劑之可行性。

III、材料與方法

（I）試驗材料

1. 桉樹

本試驗所使用之試材為赤桉（*Eucalyptus camaldulensis*）和垂尾桉（*Eucalyptus urophylla*）之葉子，由花蓮中華紙漿廠提供，伐採自花蓮吉安鄉光華段造林地，土地為石礫地，土壤偏鹼性，pH 值介於 7.6-7.8。兩種桉樹為平地綠化樹種，於民國 87 年栽植，樹齡為 10 年；檸檬桉（*Eucalyptus citriodora*）之葉子，伐採自南投縣臺大實驗林下坪宿舍區，土地為砂質壤土，土壤偏酸性，pH 值介於 6.2-6.6，樹齡為 10 年，伐採後立即進行精油之萃取。

2. 病媒蚊幼蟲

本試驗使用的病媒蚊幼蟲種類，主要是以傳播登革熱病毒為主的第四齡埃及斑蚊幼蟲 (*Aedes aegypti* larvae) 及白線斑蚊幼蟲 (*Aedes albopictus* larvae)，這些病媒蚊的來源均由長庚大學基礎醫學研究所公共衛生暨寄生蟲學科陳維鈞教授研究室所提供。

(II) 試驗方法

1. 精油之萃取

本試驗以傳統的水蒸餾法萃取精油，首先，將約200 g的三種桉樹老葉，裝入圓底燒瓶中，加入1000 mL的蒸餾水，萃取時間為6 h。另外，取部分試樣測其含水率，並計算精油收率，每組試樣重複4次。

2. 精油成分及含量之鑑定

(1) 氣相層析分析

三種桉樹葉子精油成分組成化合物定量之分析，採用Thermo Trace GC Ultra 氣相層析儀，分離管柱為DB-5MS (Crossbond 5% phenyl methylpolysiloxane)，長度為30 m，內徑為0.25 mm，膜厚為0.25 μ m，載送氣體氦氣的流速為1 mL/min，分流比 (Splitting ratio) 為1:60，注射孔 (Injection port) 溫度為250 $^{\circ}$ C，檢測器為氫焰離子檢測器 (Flame ionization detector, FID)。三種桉樹葉子精油所使用的起始溫度為40 $^{\circ}$ C，持溫2 min後，以3 $^{\circ}$ C/min的升溫速度至140 $^{\circ}$ C，再以10 $^{\circ}$ C/min的升溫速度至250 $^{\circ}$ C。由氣相層析圖波峰面積計算各精油成分之含量。

(2) 氣相層析-質譜分析

三種桉樹葉子精油成分之分析係利用Thermo公司之Trace GC Ultra 氣相層析儀配合PoLaris Q MSD質譜儀進行鑑定。首先，將三種桉樹葉子精油以乙酸乙酯稀釋 (1%) 及過濾後注入氣相層析儀中，所使用之分離管柱為DB-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m)，載送氣體氦氣的流速為1 mL/min，注射孔溫度為250 $^{\circ}$ C，離子化電壓為70 eV，質譜範圍 (Mass range) m/z 為50-650 a.m.u.，分析條件與上述之氣相層析儀相同。成分鑑定上使用National Institute of Standards and

Technology (NIST) 2.0和Wiley 7資料庫的質譜比對，並使用標準品進行共注射 (Co-injection) 確定之。此外，也使用Kovats indices (KI) 進行比對 (Adams, 2001; Giamakis *et al.*, 2001; 蘇裕昌等, 2006)，KI值的計算公式如下所示：

$$KI = 100 N + 100 n \frac{\text{Log}t'_{R(x)} - \text{Log}t'_{R(N)}}{\text{Log}t'_{R(N+n)} - \text{Log}t'_{R(N)}}$$

$t'_{R(N)}$ 和 $t'_{R(N+n)}$ ：為碳數 N 及 $N + n$ 之同質系的 n -Alkanes 修正留滯時間，但未知化合物 X 之留滯時間必須介於碳數 N 及 $N + n$ 之 n -Alkanes 之留滯時間。

$t'_{R(x)}$ ：為未知化合物 X 之修正留滯時間。

3. 抗病媒蚊幼蟲活性

本試驗使用病媒蚊之種類為埃及斑蚊幼蟲和白線斑蚊幼蟲。首先，將精油或成分以二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解，再加入25 mL之蒸餾水中，精油配製成400、200、100、50、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；抽出成分配製成50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等不同樣品濃度，每一樣品瓶置入第四齡埃及斑蚊幼蟲和白線斑蚊幼蟲各10隻，將含有精油及病媒蚊幼蟲之樣品瓶置於室溫環境中，分別記錄病媒蚊幼蟲於24 h後的死亡數目，以24 h後病媒蚊幼蟲的死亡數目計算致死率，並由不同濃度之精油對病媒蚊幼蟲致死率之關係式，求得各精油成分的半數致死濃度 (Lethal concentration, LC_{50})，以及病媒蚊幼蟲致死率為90%時所需之精油濃度數值 (LC_{90})，試驗重複數為4。

IV、結果與討論

(I) 三種桉樹葉子精油之含量

利用水蒸餾法萃取新鮮之三種桉樹葉子精油，並分別測定其精油含量，由結果得知赤桉葉子精油收率為0.57% (10.41 mL/kg)；垂尾桉葉子精油收率為

2.19% (30.11 mL/kg)；檸檬桉葉子精油收率為2.15% (25.64 mL/kg)，由此結果顯示，垂尾桉葉子精油收率最高，其次是檸檬桉葉子精油，而赤桉葉子精油收率則是最低。本試驗結果與前人研究結果有所差異，根據謝瑞忠 (1996；1998) 曾分析不同季節採集之赤桉及垂尾桉葉子精油收率，結果顯示赤桉葉子精油收率為2.28% (春季)~3.05% (冬季)；而垂尾桉葉子精油收率則為1.10% (冬季)~2.82% (夏季)，推論此差異可能由於採集季節、樹齡或生育地的不同造成的。

(II) 三種桉樹葉子精油之抗病媒蚊幼蟲活性

為了評估三種桉樹葉子精油之抗病媒蚊幼蟲活性，所使用的病媒蚊種類為埃及斑蚊和白線斑蚊。經由24 h後的抗病媒蚊幼蟲試驗後，不同濃度之垂尾桉、赤桉和檸檬桉葉子精油對埃及斑蚊幼蟲之致死率如圖1所示，使用濃度為200 $\mu\text{g/mL}$ 時，垂尾桉和赤桉二種葉子精油可以全部殺死埃及斑蚊幼蟲，而檸檬桉葉子精油對埃及斑蚊之致死率則為97.5%，當使用濃度降到100 $\mu\text{g/mL}$ 時，垂尾桉和檸檬桉二種葉子精油對埃及斑蚊幼蟲的致死率分別降至66%和45%，但赤桉葉子精油則還能將埃及斑蚊幼蟲全部殺死，由此顯示赤桉葉子精油對埃及斑蚊幼蟲有不錯的抑制效能。圖2為試驗24 h後不同濃度之垂尾桉、赤桉和檸檬桉葉子精油對白線斑蚊幼蟲的致死率，使用濃度為400 $\mu\text{g/mL}$ 時，赤桉和檸檬桉葉子精油可以全部殺死白線斑蚊幼蟲，但垂尾桉葉子精油對白線斑蚊幼蟲的致死率則為75.0%，而當使用濃度降為100 $\mu\text{g/mL}$ 時，赤桉葉子精油對白線斑蚊幼蟲的致死率還可以維持在75.0%，由此顯示赤桉葉子精油對二種病媒蚊幼蟲均有不錯的毒殺效果。另外，為了求得三種桉樹葉子精油對埃及斑蚊幼蟲和白線斑蚊幼蟲之半數致死濃度 (Median lethal concentration, LC_{50})，以及病媒蚊幼蟲致死率為90%時所需之精油濃度數值 (LC_{90})，因此，將三種不同濃度之葉子精油對埃及斑蚊幼蟲和白線斑蚊幼蟲的致死率結果予以迴歸分析，且以商業殺蚊子幼蟲劑陶斯松 (*O,O*-diethyl *O*-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate，俗稱Chlorpyrifos) 作為對照組 (使用濃度為6.25、3.125、1.56、0.78、0.39 $\mu\text{g/mL}$)，其結果如表1所示，垂尾桉葉子精油對埃及斑蚊幼蟲試驗24 h後的 LC_{50} 和 LC_{90} 值為95.5 $\mu\text{g/mL}$ 和166.3 $\mu\text{g/mL}$ ，對白線斑蚊幼蟲的 LC_{50} 和 LC_{90} 值為285.8 $\mu\text{g/mL}$ 和 > 400 $\mu\text{g/mL}$ ；而赤桉葉子精油對埃及斑蚊幼蟲試驗24 h後的 LC_{50} 和 LC_{90} 值為31.0 $\mu\text{g/mL}$ 和71.8 $\mu\text{g/mL}$ ，對白線斑蚊幼蟲的 LC_{50} 和 LC_{90} 值為55.3 $\mu\text{g/mL}$ 和192.4 $\mu\text{g/mL}$ ；而檸檬桉

葉子精油對埃及斑蚊幼蟲試驗 24 h 後的 LC₅₀ 和 LC₉₀ 值為 112.8 µg/mL 和 252.0 µg/mL，對白線斑蚊幼蟲的 LC₅₀ 和 LC₉₀ 值為 103.3 µg/mL 和 247.4 µg/mL。由以上結果得知，赤桉葉子精油對埃及斑蚊和白線斑蚊幼蟲有很好的毒殺效果，且對埃及斑蚊幼蟲的毒殺效果比對白線斑蚊幼蟲更好。

根據 Dharmagadda 等人 (2005) 萃取孔雀草 (*Tagetes patula*) 精油，並對埃及斑蚊、熱帶家蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 及瘧蚊 (*Anopheles stephensi*) 三種幼蟲進行抗病媒蚊幼蟲活性評估，結果顯示孔雀草精油對埃及斑蚊幼蟲的毒殺效果最強，其 LC₅₀ 和 LC₉₀ 值分別為 13.6 和 37.9 µg/mL；對瘧蚊幼蟲 (LC₅₀ 和 LC₉₀ 值分別為 12.1 和 57.6 µg/mL) 的毒殺效果居次，而對熱帶家蚊幼蟲的毒殺效果就沒有那麼強了，其 LC₅₀ 和 LC₉₀ 值分別為 22.3 和 71.9 µg/mL。Cheng 等人 (2004) 和劉如芸 (2006) 曾評估不同化學品系土肉桂葉子精油之抗病媒蚊幼蟲活性，發現在使用濃度為 100 µg/mL 時，桂皮醛型和桂皮醛-桂皮乙酸酯型土肉桂葉子精油經過 24 h 試驗後，對埃及斑蚊和白線斑蚊幼蟲二者的致死率均可達到 100%；至於桂皮醛型土肉桂葉子精油的 LC₅₀ 值分別為 36.2 和 40.8 µg/mL，而桂皮醛-桂皮乙酸酯型土肉桂葉子精油的 LC₅₀ 值分別為 43.3 和 46.5 µg/mL。此外，張惠婷等人 (2003) 萃取臺灣肖楠葉子精油，並對埃及斑蚊幼蟲進行試驗，結果發現經由 48 h 試驗後，使用濃度為 100 µg/mL 時，葉子精油對埃及斑蚊幼蟲之致死率可達到 100%，其 LC₅₀ 值為 47.3 µg/mL。綜合以上結果顯示，赤桉葉子精油具有良好的抗病媒蚊幼蟲活性，低濃度的葉子精油即可抑制病媒蚊幼蟲的生長。

(III) 三種桉樹葉子精油成分之分析

由於赤桉葉子精油對二種病媒蚊幼蟲具有不錯的毒殺效果。為了尋找出葉子精油中具抗病媒蚊幼蟲活性成分，因此，利用 GC-FID 和 GC-MS 來分析鑑定三種桉樹葉子精油中的成分及含量，表 2 為三種桉樹葉子精油之組成分種類與相對含量。由表 2 得知，赤桉葉子精油經由 GC-MS 分析鑑定後，總共鑑定、比對出 20 種化合物，總含量為 97.58%。依化學結構可以區分為 4 大類 (表 2)，包括 9 個單萜類碳氫化合物 (81.41%)、5 個單萜類含氧化合物 (12.55%)、1 個倍半萜類碳氫化合物 (0.50%) 以及 5 個倍半萜類含氧化合物 (3.12%)，其中，以單萜類碳氫化合物的 α -Pinene 所佔之比例最高，含量為 22.52%，其次是 *p*-Cymene (21.69%) 和 α -Phellandrene (20.08%)，此結果與謝瑞忠 (1996)、Tsiri 等人 (2003)

及蘇裕昌等人(2006)所分析的赤桉葉子精油成分不同，其原因可能是赤桉有多種化學品系或採集季節不同所造成的。

至於垂尾桉葉子精油經由 GC-MS 分析鑑定後，總共鑑定、比對出 25 種化合物，總含量為 95.78%。依化學結構可以區分為 4 大類(表 2)，包括 9 個單萜類碳氫化合物(13.80%)、7 個單萜類含氧化合物(77.38%)、5 個倍半萜類碳氫化合物(3.02%)以及 4 個倍半萜類含氧化合物(1.58%)，其中，以單萜類含氧化合物的 1,8-Cineole 所佔之比例最高，含量為 58.34%，其次是 α -Terpinyl acetate (14.87%)和 α -Pinene(6.25%)，此結果與謝瑞忠(1998)和 Cimanga 等人(2002)相同，但與 Singh 等人(1988)所分析的垂尾桉葉子精油成分不同，其原因可能是垂尾桉具有不同化學品系或採集季節不同所造成的。

檸檬桉葉子精油經由 GC-MS 分析鑑定後，總共鑑定、比對出 15 種化合物，總含量為 97.51%。依化學結構可以區分為 4 大類(表 2)，包括 4 個單萜類碳氫化合物(1.10%)、8 個單萜類含氧化合物(92.79%)、1 個倍半萜類碳氫化合物(3.20%)以及 2 個倍半萜類含氧化合物(0.40%)，其中，以單萜類含氧化合物的 Citronellal 所佔之比例最高，含量為 62.36%，其次是 *neo*-Isopulegol (11.33%) 和 Citronellol (9.75%)，此結果與 Bignell 等人(1991)、Dagne 等人(2000)、Rao 等人(2003)相同，均以 Citronellal 為主成分。

(IV) 三種桉樹葉子精油成分之抗病媒蚊幼蟲活性

由上述三種桉樹葉子精油抗病媒蚊幼蟲活性的結果得知，赤桉葉子精油具有良好的抗病媒蚊幼蟲活性，因此將赤桉葉子精油中經 GC-MS 分析鑑定得知之 12 個化合物 (α -Pinene、 α -Phellandrene、 α -Terpinene、*p*-Cymene、Limonene、 γ -Terpinene、Terpinolene、1,8-Cineole、(-)-Terpinen-4-ol、 α -Terpineol、 α -Terpinyl acetate、 β -Eudesmol)，及檸檬桉葉子精油中之 Citronellal 和 Citronellol 2 個化合物，共計 14 個化合物進行埃及斑蚊與白線斑蚊幼蟲之抗病媒蚊試驗。

以商業殺蚊子幼蟲劑陶斯松作為對照組，抗病媒蚊試驗結果如表 3 所示。由表 3 的結果得知，經過 24 h 試驗後， α -Pinene、1,8-Cineole、(-)-Terpinen-4-ol、 α -Terpineol、 α -Terpinyl acetate、 β -Eudesmol、Citronellal 和 Citronellol 8 種化合物對埃及斑蚊幼蟲並不具有毒殺效果，其 LC_{50} 值均大於 50 μ g/mL。至於其餘 6 種化合物之 LC_{50} 值之高低順序依序為 γ -Terpinene (30.7 μ g/mL) > Terpinolene (28.4

$\mu\text{g/mL}$) > *p*-Cymene (19.2 $\mu\text{g/mL}$) > Limonene (18.1 $\mu\text{g/mL}$) > α -Phellandrene (16.6 $\mu\text{g/mL}$) > α -Terpinene (14.7 $\mu\text{g/mL}$)，顯示 α -Terpinene 的抑制效果最好，其次則為 α -Phellandrene、Limonene 及 *p*-Cymene。

14 種成分對白線斑蚊幼蟲的 LC_{50} 和 LC_{90} 值如表 3 所示，經試驗 24 h 後， α -Pinene、1,8-Cineole、(-)-Terpinen-4-ol、 α -Terpineol、 α -Terpinyl acetate、 β -Eudesmol、Citronellal 和 Citronellol 8 種化合物對白線斑蚊幼蟲並不具有毒殺效果，其 LC_{50} 值均大於 50 $\mu\text{g/mL}$ 。至於其他 6 種化合物其 LC_{50} 值之高低順序為 *p*-Cymene (46.7 $\mu\text{g/mL}$) > α -Phellandrene (39.9 $\mu\text{g/mL}$) > Terpinolene (35.6 $\mu\text{g/mL}$) > Limonene (32.7 $\mu\text{g/mL}$) > γ -Terpinene (29.8 $\mu\text{g/mL}$) > α -Terpinene (25.2 $\mu\text{g/mL}$)，結果顯示 α -Terpinene 對白線斑蚊幼蟲的抑制效果最好，其次則為 γ -Terpinene 和 Limonene。

綜合以上結果得知，赤桉葉子精油中萜類碳氫化合物對二種病媒蚊幼蟲的毒殺效果較萜類含氧化合物好，顯示赤桉葉子精油具有不錯的抗病媒蚊幼蟲之活性是由這些萜類碳氫化合物所造成的。

V、結論

林木精油具有許多高生物活性之成分，如能善加利用與開發，將可使林產利用領域更加寬廣，並提高森林的經濟效益。因此，本試驗利用水蒸餾法萃取新鮮之垂尾桉、赤桉和檸檬桉葉子精油，並分別測定其精油含量，由結果得知赤桉葉子精油收率為 0.57% (10.41 mL/kg)；垂尾桉葉子精油收率為 2.19% (30.11 mL/kg) 及檸檬桉葉子精油收率為 2.15% (25.64 mL/kg)。經由抗病媒蚊幼蟲活性評估結果得知，垂尾桉葉子精油對埃及斑蚊和白線斑蚊幼蟲之半數致死濃度 (LC_{50}) 分別為 95.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 285.8 $\mu\text{g/mL}$ ；赤桉葉子精油對埃及斑蚊和白線斑蚊幼蟲的 LC_{50} 值分別為 31.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 55.3 $\mu\text{g/mL}$ ；而檸檬桉葉子精油對埃及斑蚊和白線斑蚊幼蟲的 LC_{50} 值分別為 112.8 $\mu\text{g/mL}$ 和 103.3 $\mu\text{g/mL}$ ，顯示赤桉葉子精油具有良好的抗病媒蚊幼蟲活性，在低濃度時可以有效抑制埃及斑蚊和白線斑蚊幼蟲的存活。另外，進一步經由 GC-FID 和 GC-MS 分析結果得知，赤桉葉子精油含量最多的化合物為單萜類碳氫化合物 (81.41%)，其主要成分為 α -Pinene (22.52%)、*p*-Cymene (21.69%) 及 α -Phellandrene (20.08%)；垂尾桉葉子精油含量最多的化合物為單萜類含氧化合物 (77.38%)，其主要成分為 1,8-Cineole

(58.34%)；檸檬桉葉子精油含量最多的化合物為單萜類含氧化合物(92.79%)，其主要成分為 Citronellal (62.36%)。比較三種桉樹葉子精油中 14 種化合物對 2 種病媒蚊之效果，證實 α -Terpinene 對埃及斑蚊之抑制效果最好 (LC_{50} 值為 14.7 $\mu\text{g/mL}$)，其次則為 α -Phellandrene (LC_{50} 值為 16.6 $\mu\text{g/mL}$)、Limonene (LC_{50} 值為 18.1 $\mu\text{g/mL}$)及 *p*-Cymene (LC_{50} 值為 19.2 $\mu\text{g/mL}$)；至於抑制白線斑蚊之效果，則以 α -Terpinene 最好 (LC_{50} 值為 25.2 $\mu\text{g/mL}$)，其次是 γ -Terpinene (LC_{50} 值為 29.8 $\mu\text{g/mL}$) 和 Limonene (LC_{50} 值為 32.7 $\mu\text{g/mL}$)，顯示赤桉葉子精油具有不錯的抗病媒蚊幼蟲之活性是由這些萜類碳氫化合物所造成的。

試驗結果證實桉樹葉子精油及其成分具有不錯的抗病媒蚊幼蟲活性，若能將具有生物活性之桉樹葉子精油及其成分研製成天然的殺蟲藥劑，不僅能擴展林產物的利用領域及提高其經濟價值，對人體健康亦有助益，同時，桉樹屬植物之開發利用，只要採收「葉子」，不需要剝皮或伐木，亦符合「森林永續經營利用」的目標。如能推廣利用，那麼可在環境保護與善用資源的前提下，開發桉樹生物活性成分應用之潛能，發揮多目標利用的功效，增進林農之收益。

VI、致謝

本研究承蒙農委會林務局提供研究經費 (97-00-5-20)，國立台灣大學生物資源暨農學院實驗林管理處和花蓮中華紙漿廠提供試材，長庚大學基礎醫學研究所公共衛生暨寄生蟲學科陳維鈞教授和台灣大學昆蟲系黃旌集博士提供病媒蚊幼蟲，在此敬上十二萬分的謝意。

VI、引用文獻

張惠婷、鄭森松、張上鎮、蘇裕昌、蔡坤憲、陳維鈞 (2003) 台灣肖楠葉部精油及其成分之抗病媒蚊活性。中華林學季刊 36：73-79。

謝瑞忠 (1996) 赤桉葉精油含量及化學成分研究。台灣林業科學 11(2)：149-157。

謝瑞忠 (1998) 垂尾葉精油含量及化學成分研究。台灣林業科學 13(4)：291-300。

蘇裕昌、何振隆、王益真、張上鎮 (2006) 四種桉樹葉精油組成分及抗真菌活性之測定。台灣林業科學 21(1)：49-61。

劉如芸 (2006) 六種化學品系土肉桂葉子精油抗細菌、腐朽菌、病媒蚊幼蟲及室

塵蟎活性。國立臺灣大學森林環境暨資源學研究所碩士論文。79 頁。

- Adams, R. P. (2001) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured, Illinois.
- Araujo, E. C. C., E. R. Silveira, M. A. S. Lima, M. A. Neto, I. L. D. Andrade and M. A. A. Lima (2003) Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. J. Agric. Food Chem. 51(13): 3760-3762.
- Bignell, C. M., P. J. Dunlop and J. J. Brophy (1997) Volatile leaf oils of some Queensland and northern Australian species of the genus *Eucalyptus* (Series II) Part II. Subgenera (a) *Blakella*, (b) *Corymbia*, (c) Unnamed, (d) *Idiogenes*, (e) *Monocalyptus* and (f) *Symphomyrtus*. Flav Fragr J 12: 277-284.
- Cheng, S. S., J. Y. Liu, K. H. Tsai, W. J. Chen and S. T. Chang (2004) Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. J. Agric. Food Chem. 52: 4395-4400.
- Cheng, S. S., C. G. Huang, W. J. Chen, Y. H. Kuo and S. T. Chang (2008a) Larvicidal activity of tectoquinone isolated from red heartwood-type *Cryptomeria japonica* against two mosquito species. Bioresour. Technol. 99: 3617-3622.
- Cheng, S. S., M. T. Chua, E. H. Chang, C. G. Huang, W. J. Chen and S. T. Chang (2008b) Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. Bioresour. Technol. In press.
- Cimanga, K., K. L. Kambu, S. Tona, T. Apers, N. De Bruyne, L. Hermans, J. Totté, L. Pieters and A. J. Vlietinck (2002) Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. J. Ethnopharmacol. 79: 213-220.
- Dagne E, Bisrat D, Alemayehu M, Worku T. (2000) Essential oils of twelve *Eucalyptus* species from Ethiopia. J Essent Oil Res 12:467-70.
- Dharmagadda, V. S. S., S. N. Naik, P. K. Mittal and P. Vasudevan (2005) Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. Bioresour. Technol. 96: 1235-1240.
- Giamakis, A., O. Kretsi, I. Chinou and C. G. Spyropoulos, (2001) *Eucalyptus camaldulensis*: volatiles from immature flowers and high production of 1,8-cineole and β -pinene by in vitro cultures. Phytochemistry 58: 351-355.

- Ho, S. H., J. Wang, K. Y. Sim, G. C. L. Ee, Z. Imiyabir, K. F. Yap, K. Shaari and S. H. Goh (2003) Metlternatin: a feeding deterrent and larvicidal polyoxygenated flavone from *Melicope subunifoliolata*. *Phytochemistry* 62: 1121-1124.
- Ioset, J. R., A. Marston, M. P. Gupta and K. Hostettmann (2000a) Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. *Phytochemistry* 53: 613-617.
- Ioset, J. R., A. Marston, M. P. Gupta and K. Hostettmann (2000b) Antifungal and larvicidal compounds from the root bark of *Cordia alliodora*. *J. Nat. Prod.* 63: 424-426.
- Knio, K. M., J. Usta, S. Dagher, H. Zournajian and S. Kreydiyyeh (2008) Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. *Bioresour. Technol.* 99: 763-768.
- Menut, C., T. Molangui, G. E. Lamaty, J. M. Bessiere and J. B. Habibamana (1995) Aromatic plants of tropical central Africa. 23. Chemical composition of leaf of *Eucalyptus goniocalyx* F. Muell. and *Eucalyptus patens* Beth. grown in Rwanda. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1267-1271.
- Rao B. R. R., Kaul P. N., Syamasundar K. V. and Ramesh S. (2003) Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Flav Fragr J* 18: 133-135.
- Singh, A. K., J. J. Brophy and K. C. Gupta (1988) The essential oil of *Eucalyptus urophylla*: a rich source of *p*-cymene. *Indian Perfumer* 32: 201-204.
- Silva, W. J., G. A. A. Doria, R. T. Maia, R. S. Nunes, G. A. Carvalho, A. F. Blank, P. B. Alves, R. M. Marcal and S. C. H. Cavalcanti (2007) Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresour. Technol.* 99: 3251-3255.
- Siramon, P. and Y. Ohtani (2007) Antioxidative and antiradical activities of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand. *J. Wood Sci.* 53: 498-504.
- Tsiri, D., O. Kretsi, I. B. Chinou and C. G. Spyropoulos (2003) Composition of fruit volatiles and annual changes in the volatiles of leaves of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. growing in Greece. *Flav. Fragr. J.* 18: 244-247.

表 1 垂尾桉、赤桉及檸檬桉葉子精油對埃及斑蚊和白線斑蚊幼蟲經 24 h 試驗後之有效致死濃度 (µg/mL)

Table 1 Lethal concentrations (µg/mL) of leaf essential oils from *E. urophylla*, *E. camaldulensis* and *E. citriodora* against fourth-instar larvae of *A. aegypti* and *A. albopictus* in 24 h

Specimens	<i>A. aegypti</i>		<i>A. albopictus</i>	
	LC ₅₀	LC ₉₀	LC ₅₀	LC ₉₀
<i>E. urophylla</i>	95.5	166.3	285.8	> 400.0
<i>E. camaldulensis</i>	31.0	71.8	55.3	192.4
<i>E. citriodora</i>	112.8	252.0	103.3	247.4
Chlorpyrifos*	1.1	2.4	1.4	3.6

* Positive control.

表 2 垂尾桉、赤桉及檸檬桉葉子精油之化學成分

Table 2 Chemical constituents of leaf essential oils from *E. urophylla* (EULO), *E. camaldulensis* (ECaLO) and *E. citriodora* (ECiLO)

NO	KI ^a	Constituents	Concentration (%)			Identification ^b
			ECaLO	EULO	ECiLO	
<i>Monoterpene hydrocarbons</i>			81.41	13.80	1.10	
1	939	α -Pinene	22.52	6.25	0.13	MS, KI, ST
2	978	β -Pinene	0.35	0.72	0.55	MS, KI, ST
3	991	β -Myrcene	0.45	0.33	-	MS, KI, ST
4	1005	α -Phellandrene	20.08	- ^c	-	MS, KI, ST
5	1017	α -Terpinene	1.24	-	-	MS, KI, ST
6	1025	<i>p</i> -Cymene	21.69	0.40	-	MS, KI, ST
7	1030	Limonene	4.56	-	0.13	MS, KI, ST
8	1039	<i>cis</i> -Ocimene	-	3.55	-	MS, KI
9	1050	<i>trans</i> -Ocimene	-	0.64	-	MS, KI
10	1060	γ -Terpinene	9.36	0.50	0.29	MS, KI, ST
11	1085	Terpinolene	1.16	0.87	-	MS, KI, ST
12	1129	<i>allo</i> -Ocimene	-	0.54	-	MS, KI
<i>Oxygenated monoterpenes</i>			12.55	77.38	92.79	
13	1034	1,8-Cineole	9.48	58.34	0.27	MS, KI, ST
14	1099	Linalool	-	0.10	0.13	MS, KI, ST
15	1148	<i>neo</i> -Isopulegol	-	-	11.33	MS, KI
16	1154	Citronellal	-	-	62.36	MS, KI, ST
17	1158	<i>iso</i> -Isopulegol	-	-	6.60	MS, KI
18	1171	Borneol	0.34	0.24	-	MS, KI, ST
19	1180	(-)-Terpinen-4-ol	1.21	0.60	-	MS, KI, ST
20	1194	α -Terpineol	0.99	3.04	0.13	MS, KI, ST
	1227	Citronellol	-	-	9.75	MS, KI, ST
21	1290	Thymol	0.53	-	-	MS, KI, ST
22	1347	α -Terpinyl acetate	-	14.87	-	MS, KI, ST
23	1350	Citronellyl acetate	-	-	2.22	MS, KI
24	1379	Geranyl acetate	-	0.19	-	MS, KI, ST
<i>Sesquiterpene hydrocarbons</i>			0.50	3.02	3.20	
25	1373	α -Copaene	-	0.18	-	MS, KI
26	1414	β -Caryophyllene	-	1.24	3.20	MS, KI, ST
27	1434	β -Gurjunene	0.50	0.19	-	MS, KI
28	1518	γ -Cadinene	-	1.02	-	MS, KI
29	1521	δ -Cadinene	-	0.39	-	MS, KI

Oxygenated sesquiterpenes		3.12	1.58	0.40	
30	1566 <i>E</i> -Nerolidol	0.11	0.33	-	MS, KI, ST
31	1577 Spathulenol	-	0.23	0.17	MS, KI
32	1584 Globulol	0.91	0.92	0.23	MS, KI
33	1623 10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	0.13	0.10	-	MS, KI
34	1632 γ -Eudesmol	0.78	-	-	MS, KI, ST
35	1651 β -Eudesmol	1.19	-	-	MS, KI, ST
Total (%)		97.58	95.78	97.51	
Oil yield (% w/wt)		0.57	2.19	2.15	

^a Kovats index relative to *n*-alkanes (C₉-C₁₇) on a DB-5MS column.

^b MS, NIST and Wiley libraries spectra and the literature; KI, Kovats index on a DB-5MS column in reference (Adams, 2001); ST, co-injection with authentic standard compounds.

^c Not detected.

表 3 垂尾桉、赤桉及檸檬桉葉子精油中 14 種成分對埃及斑蚊和白線斑蚊幼蟲經 24 h 試驗後之有效致死濃度 (µg/mL)

Table 3 Lethal concentrations (µg/mL) of 14 compounds from *E. urophylla*, *E. camaldulensis* and *E. citriodora* leaf essential oils against fourth-instar larvae of *A. aegypti* and *A. albopictus* in 24 h

Compounds	<i>A. aegypti</i>		<i>A. albopictus</i>	
	LC ₅₀	LC ₉₀	LC ₅₀	LC ₉₀
α -Phellandrene	16.6	36.9	39.9	> 50.0
1,8-Cineole	> 50.0	> 50.0	> 50.0	> 50.0
Limonene	18.1	41.0	32.7	50.0
<i>p</i> -Cymene	19.2	41.3	46.7	> 50.0
γ -Terpinene	30.7	> 50.0	29.8	47.5
Terpinolene	28.4	46.0	35.6	> 50.0
α -Terpinyl acetate	> 50.0	> 50.0	> 50.0	> 50.0
α -Terpinene	14.7	39.3	25.2	> 50.0
α -Pinene	> 50.0	> 50.0	> 50.0	> 50.0
α -Terpineol	> 50.0	> 50.0	> 50.0	> 50.0
(-)-Terpinen-4-ol	> 50.0	> 50.0	> 50.0	> 50.0
β -Eudesmol	> 50.0	> 50.0	> 50.0	> 50.0
Citronellal	> 50.0	> 50.0	> 50.0	> 50.0
Citronellol	> 50.0	> 50.0	> 50.0	> 50.0
Chlorpyrifos*	1.1	2.4	1.4	3.6

* Positive control.

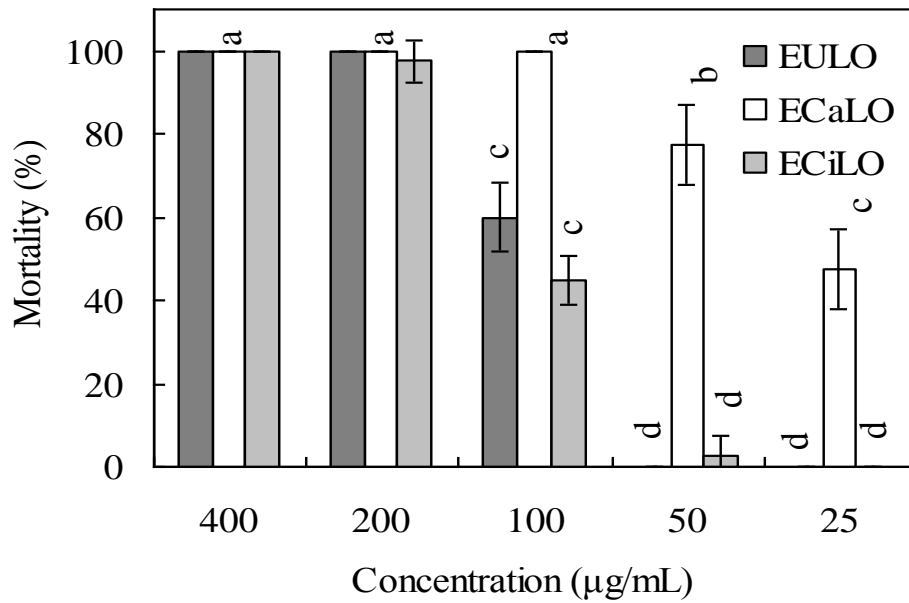


圖 1 垂尾桉、赤桉及檸檬桉葉子精油於不同濃度下對埃及斑蚊幼蟲經 24 h 試驗後之致死率

Fig. 1 Mosquito larvicidal activities of leaf essential oils from *E. urophylla* (EULO), *E. camaldulensis* (ECaLO) and *E. citriodora* (ECiLO) at different concentrations against fourth-instar larvae of *A. aegypti* in 24 h. Each experiment was performed four times and the data averaged ($n = 4$).

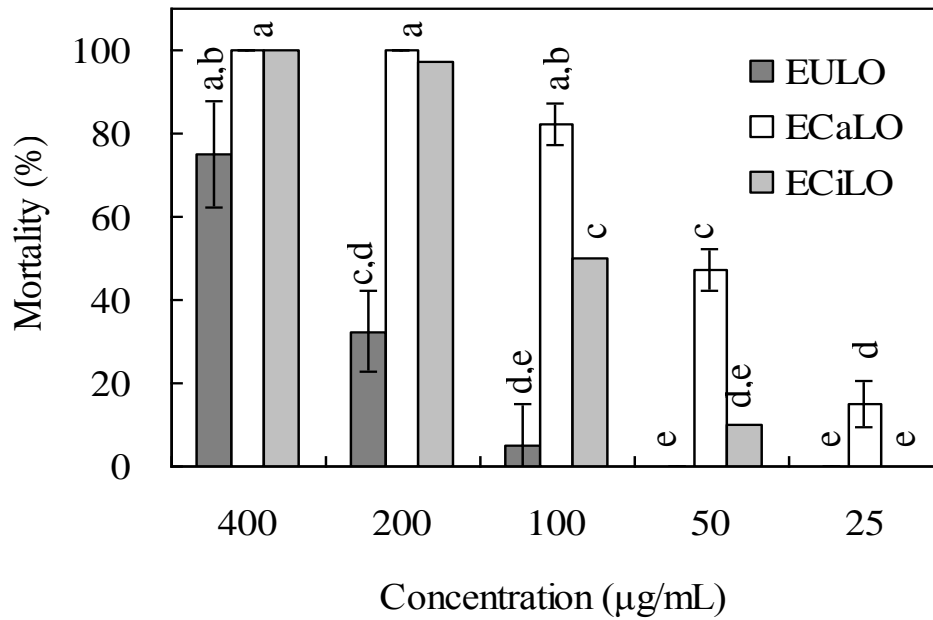


圖 2 垂尾桉、赤桉及檸檬桉葉子精油於不同濃度下對白線斑蚊幼蟲經 24 h 試驗後之致死率

Fig. 2 Mosquito larvicidal activities of leaf essential oils from *E. urophylla* (EULO), *E. camaldulensis* (ECaLO) and *E. citriodora* (ECiLO) at different concentrations against fourth-instar larvae of *A. albopictus* in 24 h. Each experiment was performed four times and the data averaged ($n = 4$).

桉樹葉子精油之分析與應用期末報告委員審查意見辦理情形表

審 查 委 員 意 見	辦 理 情 形
<p>汪委員准</p> <ol style="list-style-type: none"> 赤桉、垂尾桉採自中華紙漿公司，應提出樹齡，而檸檬桉採自臺大實驗林之下坪植物園，未提出 pH 值。 陶斯松 (Chlorpyrifos) 之化學成分為何？ 赤桉所測定之精油含量，與謝瑞忠等專家所測定者，有所不同，除品系及採集季節因子之外，可能與土壤之礦物質及樹齡亦有關係。 	<ol style="list-style-type: none"> 赤桉、垂尾桉樹齡均為 10 年，而臺大實驗林之下坪植物園之土壤 pH 值介於 6.2-6.6 之間，偏微酸，以上資料均已補充在期末結案報告書中。 它的化學名稱為 <i>O,O</i>-diethyl <i>O</i>-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate，是一種有機磷殺蟲劑。 土壤之礦物質及樹齡的確會影響到精油的含量及成分，因此本試驗所使用試材之樹齡及土壤條件已補充於期末結案報告書中。
<p>藍委員浩繁</p> <ol style="list-style-type: none"> 桉樹種類繁多，取用三種桉樹葉子精油收率即有顯著差異，赤桉葉子精油收率偏低 (0.57%)，但前人研究則又有很大差異 (2.28%-3.05%)，如何因應材料選取差異性。 	<ol style="list-style-type: none"> 精油收率的确會受採取季節、葉子成熟度等因子的影響，選取材料時，如有需要，可將老葉或幼葉區分，此外，如也考慮採收季節，則可以減少材料選取差異性。
<p>王委員松永</p> <ol style="list-style-type: none"> 樹葉之樹齡，如幼葉、壯葉、老葉，其精油之含量或質是否有不同？ 精油在水中或空氣中使用時，所需要的界面活性劑請註明。 	<ol style="list-style-type: none"> 樹齡的确會影響到精油的含量及成分，幼葉之精油之含量會比老葉來的少。但考慮實際應用，故本試驗所使用之葉子並未幼葉、壯葉、老葉分開。 若要將精油在水中使用可以使用 Tween 80 或 Tween 60 乳化劑，若在空氣中使用可以用乙醇。

