

國立臺灣大學生物資源暨農學院昆蟲學系

碩士論文

Department of Entomology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

植物精油對貓蚤的忌避活性與應用

Repellent activity and application of plant essential oils

against cat flea (*Ctenocephalides felis*)

蘇立中

Li-Chung Su

指導教授：吳文哲 博士

黃榮南 博士

Advisors: Wen-Jer Wu, Ph.D.

Rong-Nan Huang, Ph.D.

中華民國 101 年 6 月

June 2012

誌謝

回溯當時只知道跳蚤咬人很癢的我，是吳文哲老師讓我有機會在這裡盡情地跟跳蚤搏感情，而且也從老師龐大的經驗中挖掘到很多衛生昆蟲的相關知識，真是受用無窮；而黃榮南老師則是帶我進入芳香世界的推手，除了指導我進行天然物驅蚤的研究外，也讓我一窺這迷人的精油世界。在這兩年的研究所生涯中，特別感謝我的兩位指導老師指引我實驗的方向以及對實驗內容的指正，才有今日這本論文的誕生。也要感謝張上鎮老師、張念台老師、許如君老師及徐孟豪學長在口試時提出的寶貴建議，讓此作品更加完善。此外，我還要感謝實驗室的黃旌集學長和徐雅均學姊，不論在處事或是實驗上提供了無限的建議與叮嚀，讓我腦袋的神經連結更加緊密。感謝邱名鐘學長及黃祥庭學長對於統計問題及天然物萃取的指導與討論。

在此，要感謝張上鎮老師及鄭森松老師提供多種植物精油來當作我實驗的材料，讓實驗得以順利進行，且張老師也願意聽我分享實驗內容並適時的給予鼓勵，學生銘記在心。包埋劑型的合作則是要感謝徐善慧老師及林大強學長，與他們討論實驗可以碰撞出許多實驗與應用上的靈感，且有了他們幫忙得以讓此實驗更具有應用價值。此外，也感謝蔡坤憲老師的協助與指導，讓我有機會知道大地遊戲的進攻防守之道。

‘把實驗室當家’就是在台大這兩年的寫照，有大部分的吃喝拉撒只差沒有睡都是在這裡度過，感謝陪伴我在生態室的成員可以一起 meeting、一起喇賽、一起開趴、一起看魚排和邱哥的決鬥，讓生態室更有家的感覺。在這裡要特別感謝欣頤學妹可以幫我分擔事務及清理貓房，有她的幫忙才可以讓我在周末去照耀世界黑暗的角落。也感謝貓房的貓咪們，提供了無數的歡樂和便便，實驗所用的跳蚤也都仰賴貓咪們的增產報國，雖然要感謝的人無法一一列舉，但我都會銘記在心。最後要謝謝我的家人及女朋友一路陪我走過這段求學過程。

摘要

跳蚤的叮咬不僅騷擾人或寵物，還會傳播一些疾病，如鼠疫。在有跳蚤出現的區域，使用忌避劑來保護個人不受跳蚤叮咬是最普遍的方式。市面上多以合成的忌避劑為主，但考慮到人的健康及環境安全，開發以植物資材為主的忌避劑商品有其必要性。本研究目標在發展一種快速篩檢方法來篩選對貓蚤 (*Ctenocephalides felis*) 具有忌避功效的植物性精油，其方法為將兩條同樣尺寸的濾紙條 (長 9 cm，寬 0.7 cm) 分別滴上待測物及酒精，待乾燥後，再將兩條濾紙的長邊以雙面膠帶黏合，而形成一濾紙條，然後置入放有 30 隻未吸血貓蚤的圓底長玻璃試管中 (長 25 cm、直徑 1.4 cm)，靜置 30 分鐘後，記錄貓蚤在每一濾紙條半邊分布情況，並計算其忌避率。結果顯示，桂皮醛型土肉桂 (*Cinnamomum osmophloeum*, cinnamaldehyde type) 葉子精油在使用濃度為 2%、1% 及 0.5% 時，對貓蚤顯現的忌避效果分別為 97.5%、97.7% 及 73.3%，其主成分 *trans*-cinnamaldehyde 2% 濃度對貓蚤的忌避率為 97.6%；臺灣杉 (*Taiwania cryptomerioides*) 心材精油在使用濃度為 2% 的忌避效果為 89.6%；左手香 (*Plectranthus amboinicus*) 葉子精油在使用濃度 2% 的忌避效果為 83.8%，左手香主成分為 thymol，thymol 0.5% 濃度對貓蚤的忌避率為 90.6%。其中以濃度為 2% 之 *trans*-cinnamaldehyde 的忌避持續活性最為持久，晾乾 8 小時後還可達到 95.3% 的忌避效果。貓蚤吸血後的試驗結果顯示，0.5% thymol 與 2% *trans*-cinnamaldehyde 對於吸血 24 小時的貓蚤都有相當高的忌避率。另外在比較以 diblock copolymers 包埋主成分的溶液忌避效果測試中，*trans*-cinnamaldehyde 溶液對於貓蚤成蟲的忌避效果都高於 thymol 溶液；且在持續性測試上，包埋的比未包埋的 2% *trans*-cinnamaldehyde 溶液對於貓蚤成蟲的忌避效果來得更持久。

關鍵詞：貓蚤、忌避劑、植物精油、土肉桂、臺灣杉、左手香、肉桂醛、百里香酚

Abstract

Flea bites not only cause nuisance to humans and pets but also transmit diseases such as plague. Insect repellent is commonly recommended for personal protection in areas where fleas are present. Although synthetic repellents remain prevailing on the market, the development of plant material as flea repellents is increasingly important when considering human health and environmental safety. This study therefore aims to study the activity of numerous plant-based flea repellents by using an improved technique that speeds up the screen of repellents. Two pieces of long-stripped filter paper with the same size (0.7 by 9 cm) were impregnated with test compound and vehicle, respectively. After drying, the two filter papers were glued along the long side and inserted into the glass test tube (1.4 cm diameter, 25 cm long) where harbor 30 non-blood-fed cat fleas (*Ctenocephalides felis*). The distribution of cat fleas in each side of the filter paper was recorded after 30 min for the indication of repellency. The results showed that leaf essential oil of *Cinnamomum osmophloeum* (cinnamaldehyde type) exhibits 97.5%, 97.7% and 73.3% repellent activity against cat fleas when the concentration is 2%, 1% and 0.5%, respectively. Also, the *trans*-cinnamaldehyde, a main component of leaf essential oil of *Cinnamomum osmophloeum*, displays 97.6% repellent activity when the concentration is 2%. The heartwood essential oil of *Taiwania cryptomerioides* exhibits 89.6% repellent activity against cat fleas when the concentration is 2%. The leaf essential oil of *Plectranthus amboinicus* exhibits 83.8% repellent activity against cat fleas when the concentration is 2%, and the main component of which, thymol, displays 90.6% repellent activity against cat fleas when concentration is 0.5%. Particularly, the repellent activity of 2% *trans*-cinnamaldehyde remains its repellency property (up to 95.3%) even after 8 hours. Furthermore, the fed cat fleas were highly repelled by 0.5% of thymol and 2% of *trans*-cinnamaldehyde. The repellent test of diblock-encapsulated main components revealed that the repellent activity of diblock solution of 2% *trans*-cinnamaldehyde against adult cat fleas is higher and more stable than thymol. Moreover, the diblock solution of 2% *trans*-cinnamaldehyde exhibits better and longer repellent activity than un-encapsulated 2% *trans*-cinnamaldehyde.

Key words: cat flea, repellent, plant essential oil, *Cinnamomum osmophloeum*, *Taiwania cryptomerioides*, *Plectranthus amboinicus*, *trans*-cinnamaldehyde, thymol

目 錄

誌謝	I
摘要	II
Abstract.....	III
目錄	IV
壹、緒言	1
貳、往昔研究	3
一、跳蚤之防治	3
二、吸血性節肢動物的忌避劑測試	3
三、抗蟲植物精油	5
四、土肉桂精油及成分之抗蟲活性	9
五、臺灣杉精油及成分之抗蟲活性	10
六、左手香精油及成分之抗蟲活性	11
七、植物萃取物及成分之防治跳蚤活性	12
八、兩性團聯共聚物技術與應用	13
參、材料與方法	15
一、貓蚤飼養	15
二、試驗貓蚤成蟲的蒐集	15
三、忌避劑簡易篩選方法	16
四、供試精油和稀釋方法	18
五、精油及其主成分之忌避活性試驗	20
肆、結果	24
一、忌避劑簡易篩選方法	24
二、精油對貓蚤成蟲之忌避活性	25
三、有效精油之成分分析	27
四、精油主成分對貓蚤成蟲之忌避活性	30
伍、討論	39
一、新型的跳蚤忌避劑篩選模型	39
二、植物精油及主成分對貓蚤成蟲的忌避活性	41
三、以 diblock 包埋主成分之忌避試驗	42
陸、結論	45

柒、參考文獻	47
捌、附錄	56
附錄一、每種精油植物之來源與萃取方法	56
附錄二、植物精油之鑑定圖譜與化學成分	57
附錄三、跳蚤忌避劑簡易測試法的試驗圖	65



壹、緒言

跳蚤 (flea) 屬於蚤目 (Siphonaptera)，為完全變態類昆蟲，生活史分為卵、幼蟲、蛹及成蟲四個階段，只有成蟲的階段會寄生在宿主身上吸血。跳蚤在歷史上曾扮演了傳播鼠疫 (黑死病) 的重要角色，鼠疫主要是由鼠蚤所傳播，曾在第六、十四及十九世紀末和二十世紀初造成全世界人類族群三次大流行及重大傷亡 (McElroy *et al.*, 2010)。除了傳播疾病外，寵物及居家環境的跳蚤危害也常發生，而滅除跳蚤的成本昂貴且耗時。貓蚤 (*Ctenocephalides felis*) 是家屋環境最主要的騷擾性害蟲，會引發或傳播數種人類及寵物的疾病 (Dryden and Rust, 1994)。跳蚤過敏性皮膚炎 (flea allergy dermatitis, FAD) 或是跳蚤叮咬過敏症是家庭的寵物狗很常見的皮膚病；貓也常受 FAD 折磨，這也是貓粟疹皮膚病的主因之一 (Dryden, 2009)。

跳蚤之綜合防治中以化學防治為最普遍使用，市面上防蚤商品種類及型式多樣，多施用在寵物的皮膚上或是地板，使用的藥劑以含芬普尼 (fipronil) 為有效成分的蚤不到 (Frontline) 在臺灣最廣受使用。但使用殺蟲劑防治跳蚤卻存在一些問題，有些場所或時機並不適合使用殺蟲劑，例如托兒所房間的地板，如噴灑殺蟲劑，嬰幼兒在爬行時很容易就會接觸、甚至食入這些藥劑；或是在昆蟲專業的實驗室也不適合噴灑殺蟲劑來防治跳蚤，因為許多昆蟲專業的實驗室會飼養感性品系的昆蟲供做試驗的材料，如施用殺蟲劑，很容易造成試驗用昆蟲接觸到藥劑而死亡，且過度使用合成殺蟲劑會導致許多未預料到的問題，例如施藥者及消費者的急性和慢性毒性，魚、鳥及其他野生生物的毒害，有益生物的衰竭和汙染，廣泛地下水的汙染對人類健康及環境造成潛在的威脅，害蟲族群對殺蟲劑抗藥性的演化等 (Isman, 2006)，因此勢必改變防治策略，以免除跳蚤的叮咬騷擾。

忌避劑 (repellent) 在一些需要排除合成殺蟲劑的區域中越顯其重要性，例如學校、醫院和食物準備區，且天然的產品，例如精油 (essential oil) 在開發新忌避劑的技術裡，將會扮演重要的角色 (Peterson and Coats, 2001)。除了忌避劑使用的時機外，使用忌避劑也有許多好處，例如比起殺蟲劑，對哺

乳動物毒性更低；忌避劑通常都是用一些小瓶子裝著，在旅行或外出時，攜帶不占空間，且使用時只需適量噴灑或塗抹於衣物或身體部位即可，無需做稀釋的動作；旅行者（平民和軍人）在熱帶地區使用忌避劑可以避免發生當地疾病的意外，例如在肯亞，旅遊業是主要的自然資源收入，忌避劑的使用可以增加旅遊者的舒適和愉悅 (Peterson and Coats, 2001)；由於忌避劑只是驅趕跳蚤，並非殺死，所以抗藥性產生的機率相當低，且忌避劑較不易在環境殘留，對環境較無害。

目前在臺灣可以有效防治跳蚤的忌避測商品只有歐護（含有 15% DEET）及含有藥劑或是香茅油的除蚤項圈，許多藥商以 DEET (N,N-diethyl-*meta*-toluamide) 為主成分，發展出許多有效的商品，提供蚊子及蠅類叮咬的個人防護。儘管過去五十年有許多相關研究，也沒有發現其他化學物質對抗蚊子叮咬及持久的功效可勝過 DEET (Peterson and Coats, 2001)。雖然 DEET 是被廣泛使用的蚊子忌避劑，且一般都認為 DEET 是安全的，但卻也有記錄到一些毒性影響，例如小孩的腦病、蕁麻疹併發症、過敏性反應、低血壓及心律降低等 (Peterson and Coats, 2001)。因此，為了考慮到 DEET 的安全性，特別是在孩童及孕婦，而逐漸開發許多植物油當作天然替代品。在美國市面上，有許多個人的忌避劑商品已經包含了例如香茅、桉樹或柏木油等的活性成分；花生油中的一種成分，2-phenethylpropionate 及從特定的薄荷物種中獲得的 *p*-menthane-3,8-diol 也都已經被使用在消費者的產品中 (Isman, 2006)。

本研究除了設計出新的跳蚤忌避測試方法外，也篩選出數種對跳蚤具有忌避活性的植物精油，並分析鑑定出有效成分以進行進一步的忌避活性試驗，且與目前市面上最有效之忌避劑 DEET 來進行忌避活性的比較。此外，也試著往商品開發運用的方向來設計有效成分的劑型測試，以提供往後藥廠開發跳蚤天然忌避劑商品的指引與參考。

貳、往昔研究

一、跳蚤之防治

由於跳蚤屬於完全變態類之外寄生蟲，會經歷卵、幼蟲、蛹及成蟲四個時期，而只有成蟲期會在宿主身上吸血，其他時期則是在宿主所棲息之環境發育成長。因此，跳蚤的防治策略會隨著不同生長階段而有所差異，但基本上，跳蚤之綜合防治法可大略分為三個主要方向：(1) 環境管理-清理、清除犬、貓、鼠藏身之處，及戶外雜草、垃圾堆等，以清除跳蚤可孳生之處。(2) 機械防治-裝置柵網於牆上之通氣孔，以阻止貓、犬、鼠等進入房舍。(3) 化學防治-噴灑殺蟲劑或使用忌避性液劑 (周等，2005)。由於化學防治快速且簡便，目前大多以化學防治為主要選擇。早期使用含有機磷劑、合成除蟲菊精或天然植物萃取物的除蚤項圈 (flea collar) 及洗毛精 (shampoo) 等除蚤商品，此外，也會利用塗抹粉劑與浸泡藥水等方式，使藥劑均勻分布而達寵物全身除蚤。目前獸醫師多建議使用系統性或局部性藥劑，藉由皮膚吸收及血液循環而達到全身除蚤之功效 (陳，2010)，其中最普遍使用為含有芬普尼的各類劑型商品，例如蚤不到噴劑或滴劑。

先前研究顯示，芬普尼、益達胺 (imidacloprid)、metaflumizone、selamectin 和賜諾殺 (spinosad) 雖然可以有效的降低跳蚤過敏性皮膚炎的發生，但從質和量的研究資料顯示，這些化合物既不能阻擋跳蚤的叮咬，也無法完全地阻止跳蚤的取食 (Dryden, 2009)，為解決此問題，勢必挑選對跳蚤具有驅避能力的產品。但現今市面上跳蚤的忌避產品，大都缺少適當的試驗證實其忌避效果，卻大多宣稱對於包括跳蚤在內之吸血性昆蟲具有忌避效果。因此，透過適當的忌避劑測試方法以及後續之產品研發，才得以確認此產品對於跳蚤之忌避功效。

二、吸血性節肢動物的忌避劑測試

如果要開發新的忌避劑，測試方法則相當重要，因為這關係到未來發展成商品時，使用的忌避劑效果是否顯著持久以及副作用的有無。而忌避劑測試方法大致上分成活體測試及非活體測試兩大部分。

(一) 活體測試

1. 飛行吸血性節肢動物

飛行吸血性節肢動物如蚊子，其活體測試方法世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 已經有制訂標準的忌避劑檢測法 (WHO, 1996)，因此往後之研究大部分多以此標準方法進行。如 Chang *et al.* (2006) 將待測物稀釋後均勻滴在紗布上，受測者左手帶橡膠手套，手套背後挖一個圓型的洞再將紗布放上去，另一手則是滴上溶劑當作控制組，然後將手放入每面覆有紗網的籠子 ($35 \times 35 \times 35$ cm)，籠子內放入 200 隻埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*)，每隔 10 分鐘觀察蚊子停在紗布上的數量並記錄。相似的方法也可用來測試不同的化學物質對甘比亞瘧蚊 (*Anopheles gambiae*)、白線斑蚊 (*Ae. albopictus*)、庫蚊 (*Culex nigripalpus*) 等的忌避效果 (Barnard and Xue, 2004; Birkett *et al.*, 2011)。

2. 爬行吸血性節肢動物

爬行吸血性節肢動物如蜱、跳蚤、蟲子等，在早期多以人或動物等活體為試驗對象，例如 Bar-Zeev and Gothilf (1972) 利用天竺鼠為試驗對象，他們將天竺鼠腹部的毛剃除，而裸露出兩個圓形的皮膚區域，之後一邊塗上待測物，另一邊則塗上溶劑當作控制組；接著在此兩處皮膚裝上自製的模型，在模型的兩根玻璃管內放入同等數量的跳蚤，固定一段時間並記錄跳蚤在每一皮膚區域的吸血情形。另一個例子是 Rutledge *et al.* (1982) 將小老鼠浸入不同種的待測物中，然後放入有跳蚤的燒杯內，觀察跳蚤在老鼠身上吸血的情況。Mehlhorn *et al.* (2005) 是利用貓和狗來做為忌避劑測試對象，他們將貓和狗後頸部的毛剃除形成一圓型區域，然後在一半圓的皮膚均勻塗上忌避劑，另一半圓則塗上溶劑，接著放上跳蚤，然後蓋上玻璃培養皿，開始觀察跳蚤在兩個半圓區域內的分布情形。Feldmeier *et al.* (2006) 則是將忌避藥物 Zanzarin[®] 塗抹於未被潛蚤 (*Tunga penetrans*) 寄生的居民足部，以此觀察對潛蚤的忌避率與持久性。

Schreck *et al.* (1995) 則是用左手的食指做為測試蜱忌避率的對象，將食指以指尖向下，然後將三個指節分成三個部分，最下面為第一區，往上為第

二及第三區，然後在第二及第三區塗有忌避劑，接著再把食指放入有 10 隻蟬的塑膠培養皿內，當蟬向上爬而通過第二及第三區到達指節的頂端時，即代表此忌避劑無忌避效果；反之，如果蟬到達忌避劑區域則停止繼續前進，甚至調頭或者掉下來，即代表此忌避劑有忌避效果。

(二) 非活體測試

非活體檢測法一般可分成兩類：簡易篩檢法及動物刺激篩檢法。簡易篩檢法的試驗模型簡單且容易操作，可以快速且大量地篩檢待測物的忌避性；此外，有些同一種篩檢模型也可以用來測試吸血與非吸血性的節肢動物。以爬行性節肢動物為例，Bissinger *et al.* (2009) 使用圓型濾紙檢測法來篩檢忌避劑對蟬的忌避活性，他們將圓型濾紙裁成兩半圓，其中一半均勻的滴上忌避劑，另一半滴上溶劑當成是控制組，晾乾之後，將兩片半圓濾紙的直徑對著直徑靠攏，然後放入塑膠培養皿中，放入蟬後蓋上蓋子，每隔一段時間記錄蟬在濾紙上兩半圓的分布情形。也有人使用此方法來測試植物精油對騷擾錐椿 (*Triatoma infestans*)、擬穀盜 (*Tribolium castaneum*)、德國蟑螂 (*Blattella germanica*) 的忌避活性 (Islam *et al.*, 2009; Caballero-Gallardo *et al.*, 2011; Karina *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011)。動物刺激篩檢法則是在測試模型中，加入動物特性的刺激，例如 CO_2 、寄主氣味或熱來吸引測試的吸血性昆蟲，以此方法可以作為模擬在活體動物上所得到的結果。

三、抗蟲植物精油

(一) 植物精油

植物精油 (plant essential oil) 是植物的二次代謝物，為植物產生之小分子產物，具有引誘昆蟲幫助授粉、調節生理機能以及保護植物不受有害生物之侵襲的功用 (葉, 2008; 謝, 2012)。精油成分相當複雜，但大部分以揮發性的萜類 (terpenoids) 以及芳香的化學物質為主。萜類屬於不飽和碳氫化合物，與簡單的異戊二烯在結構上與化學上具有相關性 (Hussain, 2009)。自古至今，含精油的植物與植物精油被人類廣泛使用於幾個主要的用途，包括食用、藥用、化妝品用和農業及環境衛生用等 (Bakkali *et al.*, 2008)。

1. 食用

印度藏茴香 (*Trachyspermum ammi*) 的種子與肉桂皮 (*Cinnamomum cassia*) 被廣泛當作烹飪的辛香料使用，亦可當作食品及飲料的添加物。肉桂皮精油及印度藏茴香種子所包含的主要成分分別為桂皮醛 (*trans-cinnamaldehyde*) 及百里香酚 (thymol)，且桂皮醛被認為是安全的食品添加物 (Chang *et al.*, 2001a; Pandey *et al.*, 2009)。另外，有研究指出某些植物精油或精油的成分具有抑制食物內有害微生物的活性，如錫蘭肉桂 (*Cinnamomum zeylanicum*) 精油具有抑制使肉腐敗的微生物的生長，或是香芹酚 (carvacrol) 及百里香酚具有抑制大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 及鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 生長的功效 (Ouattara *et al.*, 1997; Helander *et al.*, 1998)。

2. 藥用

植物精油有益於人體，且在保健和疾病預防方面應用廣泛，主要歸因於精油內所含的多種活性成分，大致上可分類成：萜類- 滋養、抗感染、抗發炎、鎮靜；醛類- 鎮靜、防腐、抗炎；酮類- 抗充血、助黏液流動、復原療傷；醇類- 制菌、血管收縮；酚類- 制菌、散熱；酯類- 制菌、鎮靜 (陳, 2012)。例如梨花木 (*Aniba rosaeodora*) 精油中的主成分伽羅木醇 (linalool) 與胡椒薄荷 (*Mentha piperita*) 葉子精油中的薄荷酮 (menthol)，在老鼠上的研究顯示具有鎮靜與止痛的作用 (Galeotti *et al.*, 2002; De Almeida *et al.*, 2009)。

3. 化妝品用

時下保養品使用非常普遍，並因應健康與追求自然的觀念，天然植物萃取物的應用也大為增加，由於植物精油的天然味道使人著迷，且精油的分子量小，可經由皮膚吸收進入人體，進而活化細胞且恢復肌膚彈性與光澤，因此植物精油具有相當的美容與保養價值。例如左手香精油護手乳可以保護雙手皮膚免於乾裂，或是牛蒡精油潤膚霜可促進油性肌膚新陳代謝及血液循環，使皮脂腺通暢等 (陳, 2012)。

4. 農業及環境衛生用

有些植物種類傳統上已經被用來保護作物、儲藏的日用品以及自身生活上的使用，多數人對這些植物的精油可施用於廣範圍有害生物上，具有燻蒸、毒殺或忌避的活性而感興趣。主要歸因於植物精油揮發性高，且成分複雜，因此多半具有天然的強烈氣味及對某些生物具有特定的生理活性 (Isman, 2000; Stefanazzi *et al.*, 2011)。例如埃及的老農夫會將百里香和芸香屬 (*Ruta*) 的植物種植在重要的作物之間，以藉由忌避害蟲來達到保護作物的效果 (El-Gengaihi *et al.*, 1996)。

(二) 植物精油之抗蟲活性

很多陸生植物通常都具有藥學或其他有用的特性，例如植物的萃取物、精油、餾分和一些分離的化合物可用在防治節肢動物上 (Pohlit *et al.*, 2011)。主要是因為這些植物精油所含的天然物質，如生物鹼、萜類、皂素、酚類、黃酮類、毒蛋白等，作用在害蟲的神經系統或是生理生化功能上，而造成毒殺或行為上的干擾 (余，2005)。植物精油或其中的化學成分在抗蟲方面主要用於防治環境衛生害蟲上，但也可以用於防治農業及倉儲害蟲。

1. 環境衛生害蟲

早期在化學殺蟲劑未普及時，人們經常利用有香氣的植物或是燃燒這些植物來驅趕蚊蟲。例如住在哥倫比亞河旁的部落會用花土當歸 (*Heracleum maximum*) 的花來擦身體或是燃燒，以驅避當地密度極高的蚊子 (Moore and Debboun, 2007)。隨著精油萃取技術的發展，以植物精油來進行驅避或毒殺騷擾性昆蟲的實例和研究也逐漸增加。例如在 1901 年，有人發現香茅油具有殺蟲的效果，而用來浸洗頭髮以達到殺死跳蚤和頭蟲的功效 (Peterson and Coats, 2001)；北美翠柏 (*Calocedrus decurrens*) 心材精油、美國檜木 (*Chamaecyparis lawsoniana*) 精油及北美西部圓柏 (*Juniperus occidentalis*) 心材精油對具有醫學重要性的印度鼠蚤 (*Xenopsylla cheopis*)、全溝硬蜱 (*Ixodes*

scapularis) 及埃及斑蚊有很好的致死效果 (Dolan *et al.*, 2007); 也有研究指出，中國藥用植物中的香附子 (*Cyperus rotundus*) 和大葉桉 (*Eucalyptus robusta*) 精油濃度為 5 ppm 時，在 1 小時內對時常出現於家屋，且容易造成食物汙染的德國蟑螂的忌避率為 80~100% (Liu *et al.*, 2011)。

2. 農業害蟲

植物的二次代謝物在自然界中，具有保護自身與抵抗病蟲害之功能。因此，科學家對其中所含的化學成分可用來防治農業害蟲而感興趣。早期研究發現香茅油對於桃實蠅 (*Bactrocera zonata* = *Dacus zonatus*) 的雄蟲有很好的誘引效果 (Howlett, 1912)，經之後的分析測試而發現其主要成分為現今廣泛用於防治東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis*) 的甲基丁香油 (methyl eugenol)。藏茴香子 (*Carum carvi*)、土肉桂葉 (*Cinnamomum osmophloeum*)、酸橙皮 (*Citrus aurantium*)、小茴香子 (*Foeniculum vulgare*)、薰衣草 (*Lavandula angustifolia*)、薄荷 (*Mentha arvensis*)、貓薄荷 (*Nepeta cataria*)、九層塔 (*Ocimum basilicum*) 和百里香 (*Thymus vulgaris*) 的精油可抑制並驅趕歐洲油菜的重要害蟲花粉甲蟲 (*Meligethes aeneus*)，其中又以藏茴香子和百里香的精油效果最好 (Pavela, 2011)；也有人利用植物精油的成分來做蜂箱的燻蒸，以防治經濟重要性的蜜蜂寄生蟲，蜂蟹蠅 (*Varroa jacobsoni*) 及氣管寄生蠅 (*Acarapis woodi*) (Delaplane, 1992)。

3. 倉儲害蟲

現今防治倉儲害蟲多以燻蒸式的化學合成殺蟲劑為主，但考量到藥劑直接接觸人類的食物，所以需要積極的尋找合適的天然殺蟲物質來製成燻蒸劑。由於植物精油富含揮發性的萜類物質，且多半都具有生物活性，而使其成為被廣泛研究於防治倉儲害蟲的資材 (Shaaya *et al.*, 1997)。多種植物精油與其成分經研究顯示可抑制多種倉儲害蟲，如芫荽 (*Coriandrum sativum*)、檸檬香茅 (*Cymbopogon citratus*)、白馬鞭草 (*Lippia alba*)、香水樹 (*Cananga odorata*)、

蒜頭 (*Allium sativum*)、迷迭香 (*Rosmarinus officinalis*) 的精油與迷迭香所含的 1,8-cineole 可對擬穀盜產生忌避及致死的功效 (Lee *et al.*, 2002; Islam *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Stefanazzi *et al.*, 2011; Karina *et al.*, 2011)。

四、土肉桂精油及成分之抗蟲活性

土肉桂 (*Cinnamomum osmophloeum*) 為臺灣特產的樟科 (Lauraceae) 常綠木本植物，幹皮平滑，富肉桂香味，枝條纖細，葉互生，薄革質，卵形或卵狀長橢圓形，先端漸尖或銳尖，葉脈三出。土肉桂生長於 400 至 1200 公尺之中低海拔天然闊葉林中，主要分布於中部埔里、蓮華池、日月潭、谷關、白鹿、白冷、松鶴、佳保台、阿冷杉與南部武威山、扇平及東部、歸田、達仁、玉里、和平、三民等地，在南投、苗栗、新竹等境內也有發現 (王等, 2009；楊等, 2010)。土肉桂葉子精油含量及成分與中國菌桂皮油 (*C. cassia*) 比例相似而受到重視，桂皮油極具商業價值，每年用於飲料及食品添加劑的消耗量相當可觀 (陳, 2000)。

經胡大維等人的分析研究，臺灣中、南及東部地區的土肉桂葉子精油主成分可以被鑑定出九種型式：菌桂型 (cassia type)、肉桂醛型 (cinnamaldehyde type)、香豆素型 (coumarin type)、伽羅木醇型 (linalool type)、丁香酚型 (eugenol type)、樟腦型 (camphor type)、4-萜品醇型 (4-terpineol type)、伽羅木醇-松油醇型 (linalool-terpineol type) 和混合型 (mixed type) (Hu *et al.*, 1985)。其中臺灣中部土肉桂葉子精油的收率為 1%，且精油內的肉桂醛含量平均值高達 88.5% (王等, 2009)，近年來被廣泛用於生物活性與抗蟲測試。

在抗蟲部分，土肉桂葉子精油的肉桂醛型及桂皮醛-桂皮乙酸酯型對埃及斑蚊與白線斑蚊的四齡幼蟲具有極佳的毒殺效果，24 小時的殺蚊子幼蟲測試結果，顯示葉子中的殺蟲有效成分有肉桂醛、丁香酚、茴香腦和桂皮乙酸酯 (Cheng *et al.*, 2004, 2009)；此外，土肉桂葉子精油及肉桂醛測試對八

侵紅火蟻 (*Solenopsis invicta*) 的毒殺效果評估，結果得知兩者對入侵紅火蟻有很好的毒殺效果 (Cheng *et al.*, 2008)。另外，也有以中國菌桂皮革取出的精油與肉桂醛及一些市售的忌避劑商品對埃及斑蚊的忌避試驗，雖然忌避效果最好的還是 DEET 及含有 DEET 的產品，但是中國菌桂皮的甲醇萃取物在使用量為 0.102 mg/cm^2 且施用後 30 分鐘，對於雌性的埃及斑蚊都還有 87% 的忌避效果 (Chang *et al.*, 2006)。

五、臺灣杉精油及成分之抗蟲活性

臺灣杉 (*Taiwania cryptomerioides*) 隸屬於杉科 (Taxodiaceae)、臺灣杉屬 (*Taiwania*)，不但是臺灣特產之珍貴本土樹種，亦為臺灣重要經濟造林樹種之一，再加上臺灣杉木理通直且細緻，材質輕軟且加工性質極為良好，木材本身香氣獨特與耐腐抗蛀性強的這些特性，而使其備受研究人員所重視 (張等，2005)。

近年來相關的研究報告指出，臺灣杉心材精油的成分之一 α -cadinol，不管是在 24 或是 48 小時對歐洲室塵蟎 (*Dermatophagoides pteronyssinus*) 和美洲塵蟎 (*Dermatophagoides farina*) 的致死率都達到 100%，精油內含有四種化學物質效果分別為 α -cadinol $>$ T-muurolol $>$ ferruginol $>$ T-cadinol (Chang *et al.*, 2001c)。有鑑於臺灣杉木材有抗蟲蛀的特性，有研究報告指出，臺灣杉心材精油中的化學成分 cedrol 具有抗臺灣家白蟻 (*Coptotermes formosanus*) 的功效 (Chang *et al.*, 2001b)。臺灣杉心材精油除對於室塵蟎和臺灣家白蟻有生物活性外，對於白腐菌、褐腐菌、糞腸球菌及金黃色葡萄球菌都具有相當的生物活性，使得臺灣杉木材成為裝潢建材的重要材料 (陳，2000)。

六、左手香精油及成分之抗蟲活性

左手香 (*Plectranthus amboinicus*)，隸屬於唇形花科 (Labiatae)，民間別稱有排香草、洋薄荷、過手香、到手香等。葉片為對生狀、軟圓形、尖端為鈍圓形，葉邊為齒狀，全草密佈細毛，香味濃郁。左手香屬於南洋植物，多分布在印度、菲律賓和馬來西亞等地 (洪及楊，2007)。在熱帶或亞熱帶地區都會大量栽培左手香，用於一些傳統上的醫療用途，例如感冒、噁心、腹瀉、頭痛或是發燒等。此外，左手香精油也被用在化妝品、口腔保健的產品等。也有試驗證實左手香精油具有止痛及抗過敏的功效 (Lu *et al.*, 2011)。

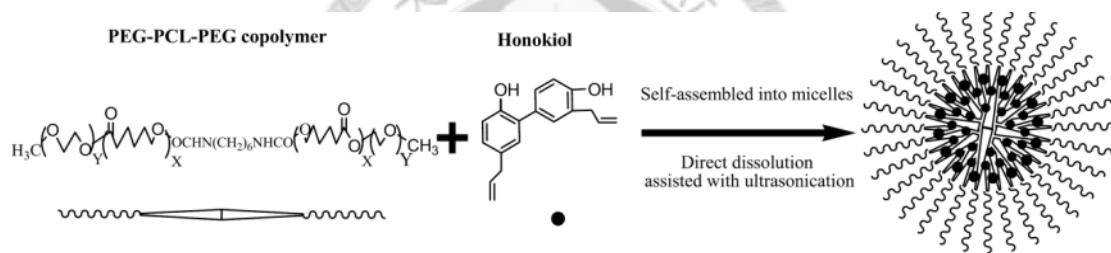
近年研究報告分析在中國南部 16 個左手香族群的精油成分，主要有廣藿香醇 (patchouli alcohol)、廣藿香酮 (pogostone)、 α, β -藿香萜烯 (α, β -patchoulene)、丁香烯 (caryophyllene)、 α, β, δ -愈創木烯 (α, β, δ -guaiene) 和 seychellene 等 9 個化學物質 (Wu *et al.*, 2011)；而臺灣也有研究報告分析四種左手香品種，左手香、薄荷廣藿香 (*Plectranthus spreng*)、鑲邊到手香 (*Plectranthus amboinicus variegata*) 和古巴奧勒岡 (*Plectranthus socotranum*) 的化學成分有 α -側柏烯 (α -thujene)、 α -松油萜 (α -pinene)、 β -月桂油烯 (β -myrcene)、 α -水芹烯 (α -phellandrene)、 p -對傘花烯 (p -cymene)、D-檸檬烯 (D-limonene)、 γ -萜品烯 (γ -terpinene)、 α -萜品醇 (α -terpineol)、 α -萜品油烯 (α -terpinolene)、枷櫟木醇 (linalool)、4-萜品醇 (terpinol-4)、癸醛 (decanal)、乙酸莢酯 (bornyl acetate)、扣 α -巴烯 (α -copaene)、 β -丁香烯 (β -caryophyllene)、大根香葉烯 D (germacrene D)、 β -葎草烯 (β -humulene)、 α -衣蘭油烯 (α -muurolene)、 α -金合歡烯 (α -farnesene)、香芹酚 (carvacrol)、 γ -杜松烯 (γ -cadinene) 和丁香烯氧化物 (caryophyllene oxide) 等化學物質 (蘇，2005)。有研究指出左手香葉子精油對於史蒂芬塞瘧蚊 (*Anopheles stephensi*) 的幼蟲具有強烈的毒殺作用 (Senthilkumar and Venkatesalu, 2010)。

七、植物萃取物及成分之防治跳蚤活性

雖然現今防治跳蚤的方法大多還是使用化學合成的殺蟲劑，但有研究人員為了找出可替代之方法，而逐漸以天然植物萃取物與成分來進行防治跳蚤活性的研究。如 Guerrini and Kriticos (1998) 利用甲醇 (methanol) 萃取印度棟樹 (*Azadirachta indica*) 種子內的印棟素 (azadirachtin) 並噴灑於貓和狗的身上，以測試對貓蚤 (*C. felis* (Bouché)) 的致死與抑制產卵效果；除了印度棟樹外，黃荊 (*Vitex agnus castus*) 的種子萃取物對於保護人類和狗免於貓蚤吸血的功效可達到 6 小時 (Mehlhorn *et al.*, 2005)；北美翠柏 (*Ca. decurrens*) 心材精油、美國檜木 (*Ch. lawsoniana*) 精油、北美西部圓柏 (*J. occidentalis*) 心材精油以及阿拉斯加黃杉 (*Chamaecyparis nootkatensis*) 心材精油對於印度鼠蚤 (*X. cheopis*) 有很好的抑制效果 (Dolan *et al.*, 2007; Panella *et al.*, 2005)；此外，也有人使用具忌避性的植物來防治跳蚤，如在愛沙尼亞 (Old Estonia) 調查報告指出，當地居民會使用菖蒲 (*Acorus calamus*)、苦艾 (*Artemisia absinthium*)、杜香 (*Rhododendron tomentosum*)、大蕁麻 (*Urtica dioica*)、虎杖 (*Polygonum cuspidatum*)、歐洲鱗毛蕨 (*Dryopteris filix-mas*)、菸草 (*Nicotiana* ssp.)、匍匐柳 (*Salix repens*)、毛茛 (*Ranunculus acris*)、薄荷 (*Mentha* ssp.)、白首蓿草 (*Trifolium arvense*) 和小判草 (*Briza media*) 等的植物來驅避人蚤 (*Pulex irritans*) (Soukand *et al.*, 2010)；Feldmeier *et al.* (2006) 則是在位於巴西東北邊一個被潛蚤 (*T. penetrans*) 危害的村落內，以忌避劑商品 Zanzarin[®]，內含有椰子油 (*Cocos nucifera*)、荷荷芭油 (*Simmondsia chinensis*) 和蘆薈 (*Aloe vera*) 等成分噴灑於當地居民的足部，此商品對於忌避潛蚤具有很好的忌避功效。

八、兩性團聯共聚物技術與應用

兩性團聯共聚物 (amphiphilic block copolymers) 是由具有可溶性之雙性的分子鏈段所組成，一端帶有親水鏈段，另一端則是帶有疏水鏈段，而當這些雙性高分子材料溶解於溶液中，且濃度超過臨界微胞濃度時，這些雙性高分子材料的疏水端會因凡得瓦爾力互相作用而自組裝 (self-assembly) 成一親水端在外，疏水端在內的微胞構造 (圖一) (Discher *et al.*, 1999)。所謂自組裝即是系統之構成元素在不受外力介入下，自行聚集、組織成規則結構的現象。此現象在自然界中經常發生，如生物體細胞是由各種生物分子自組裝而成，而運用各種分子自組裝亦是建構奈米材料非常重要的方法 (陳，2004)。



圖一、藉由雙性分子鏈段自組裝的 Honokiol 微胞製備過程。(Gong *et al.*, 2010)

Fig. 1. Preparation scheme of honokiol-micelles by amphiphilic block copolymers self-assembly.

由於聚合的微胞同時包含了親水端鏈及疏水端鏈，疏水端鏈的核可攜帶疏水性之物質於微胞內，而親水端鏈則可溶於水溶液，此方法已廣泛應用於人體醫學中；而疏水端材料多選用生物可分解性高分子，如單甲基聚己內酯 (poly ϵ -caprolactone, PCL)，親水端部分通常會選用聚乙二醇 (poly ethylene glycol, PEG)，將這些材料鍵結成 PEG-PCL-PEG 的 triblock 結構或是只有 PEG-PCL 的 diblock 結構。當用於人體內藥物釋放時，核中裝載疏水性藥物或其他物質可藉由血液運輸，並到達預期治療之標靶區域，而親水性之外殼可確保微胞溶於水溶液中，保護藥物不受外界因素而干擾其效用。

(楊，2004)。例如在治療癌症上，因為腫瘤細胞發展出多藥形的抗藥性，其機制為細胞內的 P-glycoprotein 會將治療藥物運送出細胞外，而使得藥物無法發揮預期作用，因此便使用 PEG-PCL 的微胞來包覆一些抗腫瘤的藥物，以避免 P-glycoprotein 的偵測，而可以在細胞內累積藥物發揮效用 (Diao *et al.*, 2011)。



參、材料與方法

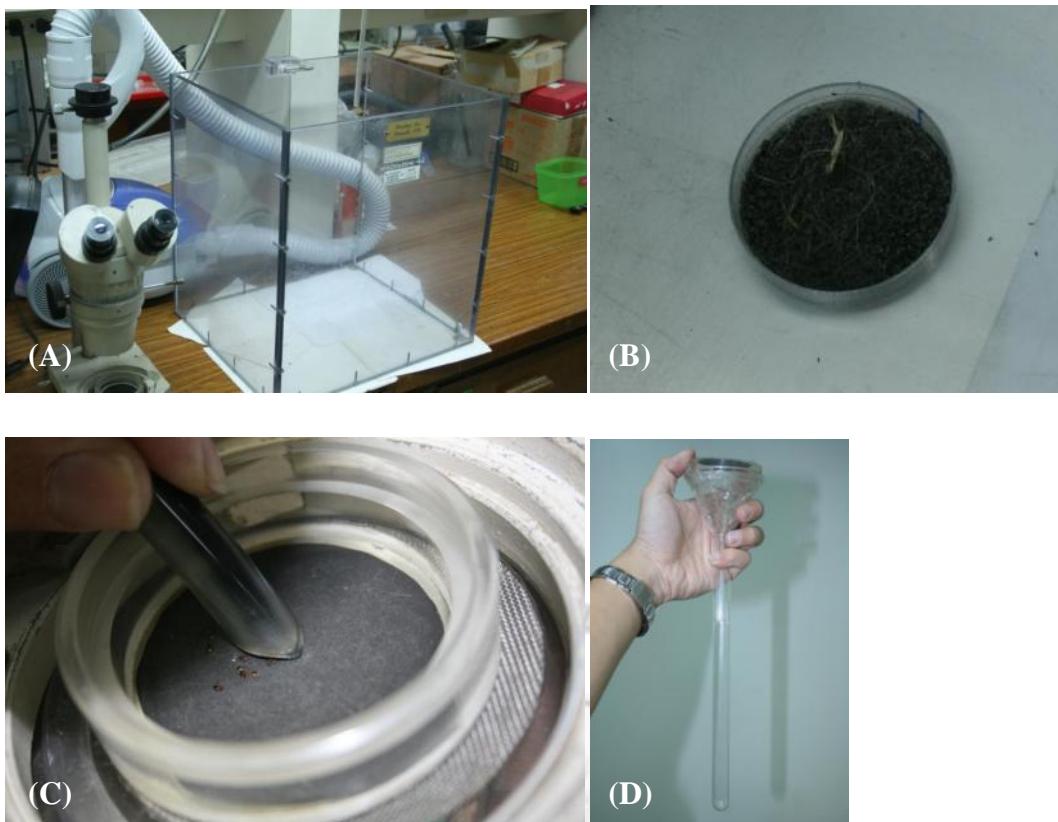
一、貓蚤飼養

實驗室所建立的貓蚤族群是於 1990 年底在臺北市 5 隻野貓身上採集的貓蚤，累代飼養至今已逾百代，於飼養期間從未接觸到殺蟲劑，因此稱之實驗室品系。將貓蚤成蟲飼養於臺大昆蟲館動物試驗房內的短毛貓上。貓隻分別飼養於 $75 \times 60 \times 60$ cm 的不鏽鋼籠中，每日換水餵食及清理便盆，並依貓房例行工作標準作業程序表，確實記錄動物房每日溫濕度和貓隻健康狀況，調控溫度於 $20-27^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度低於 90%，光週期 12D : 12L。

提供試驗的貓蚤來自貓身上的成蟲所產下的蚤卵，因蚤卵會由貓身上掉落，所以每天於貓籠下的 75×60 cm 鐵盤，以小刷子蒐集蚤卵與混合物，內含蚤卵、成蟲血便、貓毛及皮屑等物質，之後將混合物置於直徑 5.5 cm 的塑膠培養皿中，並記錄每天每隻貓身上的貓蚤產卵量，再依卵的數量添加一定比例的自製豬血粉飼料 (徐，2000) 及讓老熟幼蟲吐絲作繭的細沙，之後用石蠟膜將培養皿封住並放於 27°C 、相對濕度 75% 的生長箱中。每週將 50 隻羽化之成蟲回接寄生於貓身上，以穩定族群之品系。

二、試驗貓蚤成蟲的蒐集

試驗所需的成蟲來自每天所蒐集的蚤卵，經 20-25 天可發育為成蟲。飼養在培養皿的幼蟲，等待其結繭羽化後，再利用跳蚤分離器 (flea separator，為 J. R. Georgi 設計，FleaData 公司生產之人工餵血器飼養系統之部分設備) 收集出繭 3 日內的成蟲 (圖二)。吸取步驟首先將培養皿放入壓克力缸內，打開培養皿蓋子後，於培養皿上方吹氣，即可使跳蚤跳出培養皿，接著使用塑膠軟管一頭壓按於解剖顯微鏡下，解剖顯微鏡後端裝有一台吸塵器，當吸塵器打開後便可由按壓端的塑膠軟管產生吸力，另一端則可於缸內吸取所需的跳蚤數量，之後再將跳蚤移入玻璃試管內以供當日試驗時所用。



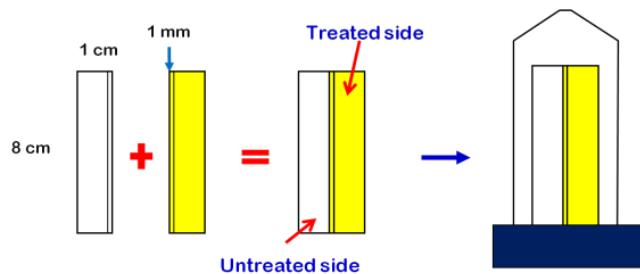
圖二、貓蚤成蟲蒐集流程圖。(A) 跳蚤分離器；(B) 打開培養皿使成蚤跳出；(C) 用吸管吸取所要的成蚤數目；(D) 將 30 隻成蟲移入長試管準備進行試驗。

Fig. 2. The collection process of adult fleas. (A) flea separator; (B) open the dish to allow the adult flea to jump out; (C) suction tube to collect appropriate number of fleas; (D) transfer 30 adult fleas into the long test tube for testing.

三、忌避劑簡易篩選方法

(一) 離心管的濾紙條測試法

此方法是將濾紙裁剪成兩片寬為 1 cm、長為 8 cm 的濾紙條，每一濾紙條的長邊各有 1 mm 的區域作為黏合用。首先將待測物均勻地滴在一濾紙條上，另一濾紙條則不滴任何物質當作控制組，待晾乾 30 分鐘後，將兩片濾紙依著黏合區黏合，然後放入有 20 隻貓蚤的 50 mL 離心管，再將離心管以蓋子朝下平放於桌面上，經過 30 分鐘後開始記錄貓蚤在濾紙上的分布情形（圖三）。

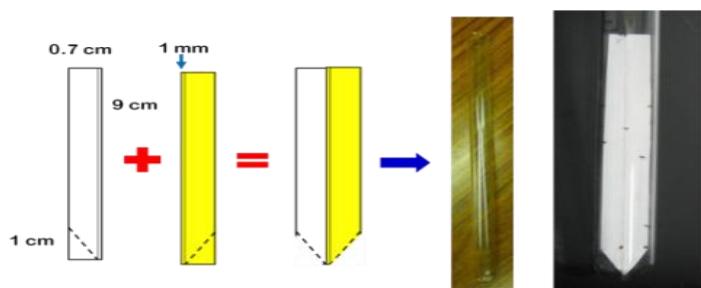


圖三、在離心管的濾紙條測試法示意圖。

Fig. 3. The diagram of tested method of the filter paper strip in a centrifuge tube.

(二) 圓底玻璃試管的濾紙條測試法

將離心管替換成長的圓底玻璃試管（長 25 cm，管口直徑 1.4 cm），同樣是使用長濾紙條（長 9 cm，寬 0.7 cm），但在每片濾紙條的一端會剪去一個三角型，這可以使兩條濾紙黏合之後，其中一端可以呈現尖型，其他試驗步驟則與（一）相同（圖四）。此方法結合了兩個測試方法的概念，包括世界衛生組織（World Health Organization, WHO）認可的圓底試管濾紙條法（WHO, 1981）及圓型濾紙忌避劑測試法。我們利用上述兩方法測試了三種待測物，分別是 75% 的酒精、小博士天然防蚊液（含有天然成分防蚊劑、抗紫外線保護成分、蘆薈萃取物、葵花油脂萃取物、護膚保濕劑、乳化劑、食用級酒精、防腐劑、香精、去離子水）及歐護（OFF!，含有 15% 的 DEET）。貓蚤分布結果的紀錄分三部分，處理邊、無處理邊及試管底部。



圖四、在圓底玻璃試管的濾紙條測試法示意圖。

Fig. 4. The diagram of tested method of the filter paper strip in a round bottom glass tube.

四、供試精油和稀釋方法

(一) 精油種類

試驗精油由臺灣大學森林環境暨資源學系教授張上鎮老師提供 10 種植物精油，其中的土肉桂葉子有兩種型式，分別為肉桂醛型 (cinnamaldehyde type) 及伽櫟木醇型 (linalool type)，臺灣大學昆蟲學系教授黃榮南老師提供左手香葉子精油及紅藜葉子水層萃取物，昆言企業股份有限公司黃協理提供 2 種薰衣草精油，共 14 種 (表一)。由臺灣大學森林環境暨資源學系教授張上鎮老師提供的每種植物精油來源及萃取方式如附錄一。

表一、十四種植物精油的物種及部位列表

Table 1. The plant species and parts of fourteen essential oils used in this study

Plant family	Plant species	Part
Rutaceae 芸香科	<i>Clausena excavate</i> 過山香	Leaf
	<i>Citrus tachibana</i> 柑橘	Leaf
	<i>Citrus taiwanica</i> 南庄橙	Leaf
Taxodiaceae 杉科	<i>Taiwania cryptomerioides</i> 臺灣杉	Heartwood
	<i>Cunninghamia konishii</i> 香杉	Wood
	<i>Cryptomeria japonica</i> 柳杉	Leaf
	<i>Cinnamomum brevipedunculatum</i> 小葉樟	Leaf
Lauraceae 樟科	<i>Cinnamomum osmophloeum</i> 土肉桂 (Cinnamaldehyde Type) (Linalool Type)	Leaf
	<i>Gaultheria cumingiana</i> 白珠樹	Leaf
Chenopodiaceae 藜科	<i>Chenopodium formosanum</i> 紅藜	Leaf
Labiatae 唇形花科	<i>Plectranthus amboinicus</i> 左手香	Leaf
	Lavender 薰衣草 022238/022298	

(二) 化學試藥

本試驗所使用的乙醇 (ethanol, 95%) 溶劑、正對照組使用的 DEET (N,N-diethyl-*meta*-toluamide, 97%) 及百里香酚都購買自 Sigma (St. Louis, U. S. A.)。99% 的 *trans*-cinnamaldehyde 則是由臺灣大學森林環境暨資源學系教授張上鎮老師提供。

(三) 包埋劑型

包埋劑型方面，則是提供純品之 *trans-cinnamaldehyde* 及 thymol 級臺灣大學高分子科學及工程學研究所的徐善慧教授進行包埋的操作，其包埋之材料為 PEG-PCL 結構的 diblock，而主成分濃度是依照試驗所需的濃度而進行調整。取得包埋過的溶液後，使用鋁箔紙容器包覆，以阻隔光線對溶液內有效成分之影響，並且保存於 4°C 之冰箱。因使用 diblock 包埋的溶液會有沉澱之現象，所以在試驗前需先將此溶液充分振盪過以確保溶液之濃度正確。溶液製作完後，需存放在 4°C 之低溫環境下，並於兩週內完成試驗，以免溶液內有效成分之揮發。因包埋主成分的 diblock 濃度為 10 mg/mL，所以在包埋劑型試驗中的控制組為 10 mg/mL 未包埋任何物質的 diblock 溶液。

(四) 氣相層析質譜儀鑑定 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)

將肉桂醛型、伽櫟木醇型土肉桂葉子精油及左手香葉子精油，以 95% 乙醇稀釋至 0.01%，利用氣相層析質譜儀進行成分分析。儀器分析條件如下：毛細層析管為 DB-5MS (內徑 0.25 mm，長 30 m，內層嵌附 0.25 mm 的 (5%-phenyl)-methylpolysiloxane)、樣品注射量為 1 μ L、注射口溫度 250°C、管柱升溫條件：起始溫度 50°C、持續 3 分鐘，以每分鐘 10°C 的升溫速率升高至 250°C，最後持溫 3 分鐘、載送氮氣之流速為每分鐘 1.5 mL，分流比 (split ratio) 為 1 : 10、檢出器為離子阱質譜偵測儀 (ion trap mass spectrometer)，transfer line 溫度為 300°C、自動質譜掃描範圍為 50~650 m/z 。最後經由 Wiley 7.0 資料庫比對分析鑑定成分。

臺灣杉心材精油的氣相層析質譜儀鑑定則是由臺灣大學森林環境暨資源學系教授張上鎮老師所提供之分析條件：

臺灣杉心材精油成分之分析係利用 Thermo 公司之 Trace GC 氣相層析儀配合 PoLaris Q MSD 質譜儀進行鑑定。首先將臺灣杉心材精油以乙酸

乙酯稀釋 (1%)，過濾後注入氣相層析儀，所使用之分離管柱為 DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)，載送氣體氮氣的流速為每分鐘 1.5 mL，注射孔溫度 270°C，離子化電壓 70 eV，質譜範圍 (mass range) m/z 為 50-650 a.m.u.。起始溫度 50°C、持溫 2 分鐘，第一段升溫以每分鐘 3°C 的速率升高至 200 °C 後，持溫 1 分鐘，第二段升溫以每分鐘 10°C 的速率升高至 250°C 後，持溫 5 分鐘。成分鑑定使用 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。

(五) 稀釋方法

首先使用 pipette 吸取 392 μL 的 95% 乙醇將 8 μL 的試驗精油稀釋成體積百分濃度 2%，接著再用 95% 乙醇依序稀釋成 1%、0.5%、0.25% 及 0.125% 的濃度以供試驗。*trans-cinnamaldehyde* 的稀釋方法與精油相同，由於 thymol 為結晶狀固體，密度為 0.97 g/cm³ 相當接近 1 g/cm³，經由所需濃度的體積和重量計算後接近 8 mg，因此以 392 μL 的 95% 乙醇將 8 mg 的 thymol 稀釋成體積百分濃度 2%，接著再用 95% 乙醇依序稀釋成 1%、0.5%、0.25% 及 0.125% 等四個濃度。包埋過主成分之 diblock 溶液已無需稀釋，直接用 pipette 吸取所需的量即可。

五、精油及其主成分之忌避活性試驗

(一) 精油與主成分之忌避活性試驗

1. 精油忌避活性測試

忌避活性試驗方法則是採用先前所設計出的新型濾紙條測試法，首先在試驗前 3 天將所有跳蚤取出，以確保試驗當日所使用的跳蚤為出繭後 3 日內的成蚤，接著使用跳蚤分離器吸取 30 隻未吸血的成蚤於圓底玻璃試管中以供測試。將處理邊與控制邊的濾紙條分別放於一張半徑 15 cm 的半圓形濾紙上，接著以 pipette 吸取 80 μL 稀釋的精油後，平均滴於處理邊的濾紙條上當做處理組，控制邊則是平均滴上等量的 95% 乙醇當作控制組，空白組

則是一邊只滴等量的 95% 乙醇，另一邊不滴任何東西，之後晾乾 30 分鐘，再將兩片濾紙黏合後放入玻璃試管，管口用紗布封住以防止跳蚤逃離與避免氣味被封在試管內。再將試管放置於 27°C 的生長箱，等待 30 分鐘後開始記錄跳蚤在濾紙上的分佈情形，每一處理重複 3 次。

2. 主成分忌避活性測試

稀釋後的 *trans-cinnamaldehyde* 與 thymol 測試方法與精油測試法相似，但增加一組正對照組 DEET。正對照組需先將 50 μL 之 97% DEET 以 273 μL 的 95% 乙醇稀釋成體積百分濃度 15%，再進一步系列稀釋成 7.5%、3.75%、1.875% 及 0.9375% 等不同濃度，以挑選出對成蚤忌避效果最佳的濃度，提供做正對照組使用。因與精油相同濃度之純物質對於跳蚤毒性較高，會導致跳蚤死亡或是躁動而影響試驗結果，所以最後置於生長箱內等待的時間縮短為 10 分鐘再開始記錄，每一處理重複 3 次。

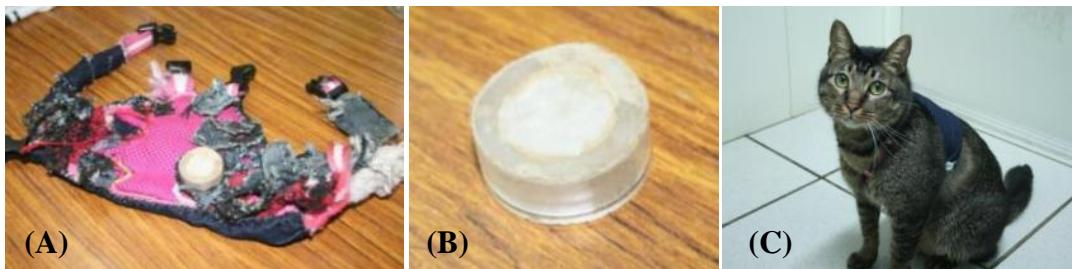
3. 主成分持續忌避活性測試

首先將肉桂醛、百里香酚與 DEET 分別稀釋成體積百分濃度 2%、0.5% 與 15%，稀釋方法與上述相同，接著將稀釋的待測物以 pipette 吸取 80 μL ，平均滴於 6 條處理邊的濾紙條上，控制邊則是滴上等量的 95% 乙醇，之後分別放置於不同的 27°C 生長箱中，以免受不同的氣味干擾，接著分別晾乾 30 分鐘、1 小時、2 小時、4 小時、6 小時與 8 小時。每晾乾一個時段，便取出並與控制邊的濾紙黏合，之後放入有 30 隻出繭 3 日內的成蚤，以紗布封口後放置於 27°C 生長箱中等待 10 分鐘，才記錄跳蚤在濾紙上的分佈情況，每一處理重複 3 次。

(二) 吸血之成蚤的忌避活性試驗

首先以跳蚤分離器取出 50 隻出繭後 3 日內之成蚤，平均放入 2 個 microcell，接著將 microcell 放入貓專用背心的圓型束帶後，再將背心穿戴於貓身上，貓身體側邊的毛剃掉以利於成蚤可以順利的從 microcell 吸取到

貓血（圖五）。成蚤吸血 24 小時後再將 microcell 取出，用跳蚤分離器吸取 40 隻成蚤，平均放於 2 支圓底玻璃試管中以供測試。另外，再吸取出繭後 3 日內之未吸血成蚤 40 隻，平均放於 2 支圓底玻璃試管中以供與吸血之成蚤做比較測試用。



圖五、貓專用背心裝置圖。(A) 放置 microcell 之背心；(B) microcell；(C) 將背心穿戴於貓身上。

Fig. 5. Installation picture of vest. (A) the vest installed with microcell; (B) microcell; (C) the cat was wearing the vest.

試驗物質為體積百分濃度 2% *trans-cinnamaldehyde* 及 0.5% thymol，並以 15% DEET 做為正對照組，稀釋與測試方法如同前面所述。

（三）包埋主成分的忌避活性試驗

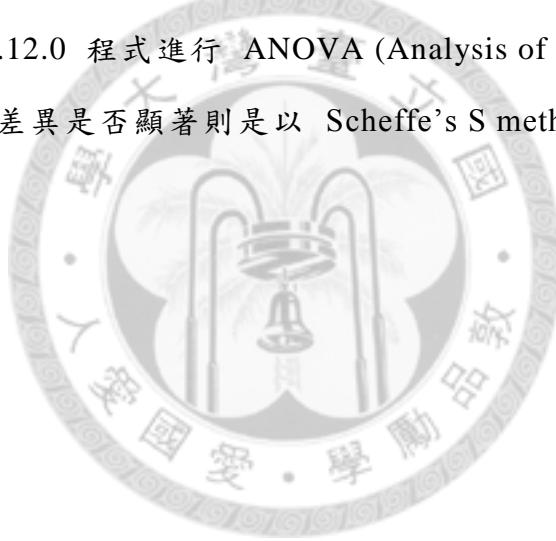
將包埋過濃度 10%、5%、2%、0.5% *trans-cinnamaldehyde* 與 5%、2%、0.5% thymol 的 diblock 溶液，分別以 pipette 吸取 80 μ L 均勻滴上處理邊的濾紙條當作處理組，控制邊的濾紙條則是滴上 10 mg/mL 濃度，且無包覆任何測試物質的 diblock 當作是控制組。空白組則是在處理邊滴上 10 mg/mL 濃度無包覆任何測試物質的 diblock，控制邊則不處理，以測試 diblock 對成蚤是否有影響。之後晾乾 30 分鐘再將兩邊的濾紙黏合，放入有 30 隻成蚤的圓底玻璃試管，管口用紗布封住，置於 27°C 生長箱中等待 10 分鐘，之後開始記錄成蚤在濾紙上分布的情形。

在持續性試驗方面，將滴完 15% DEET、2% *trans-cinnamaldehyde* 未包埋之溶液和 2% *trans-cinnamaldehyde* 的 diblock 包埋溶液之濾紙各別

放置於不同的 27°C 生長箱中，以免受不同的氣味干擾，接著分別晾乾 4 小時、8 小時、12 小時、24 小時、48 小時與 72 小時等 6 個時段。每晾乾一個時段，便取出並與控制邊的濾紙黏合，之後放入有 30 隻出繭 3 日內的成蚤，以紗布封口後放置於 27°C 生長箱中等待 10 分鐘，才記錄跳蚤在濾紙上的分佈情況，每一處理重複 3 次，並與 15% 之 DEET 做比較。

(四) 忌避率計算與分析

貓蚤成蟲的忌避率是使用公式 $PR(%) = [(NC - NT) / (NC + NT)] \times 100$ 來計算；PR 代表忌避百分率，NC 代表在控制組的濾紙上貓蚤的數量，NT 代表在處理組的濾紙上貓蚤的數量 (Caballero-Gallardo *et al.*, 2011)。試驗所得的資料採用 R-2.12.0 程式進行 ANOVA (Analysis of variance) 統計與分析。辨別各處理之差異是否顯著則是以 Scheffe's S method 檢測。



肆、結果

一、忌避劑簡易篩選方法

忌避劑簡易篩選方法的每個處理總共 20 隻貓蚤並重複 3 次，試驗結果記錄在處理邊 (treat)、控制邊 (control) 以及底部 (B) 的貓蚤隻數並呈現如表二。初期試驗以離心管濾紙條測試法檢視忌避活性，結果顯示，有較多的貓蚤停留在離心管的底部，而改成圓底玻璃試管時，在底部的貓蚤數量下降許多。此外，濾紙條測試法可看出忌避劑對於貓蚤的忌避效率，尤其以圓底玻璃試管為試驗裝置的效果較佳。

表二、貓蚤忌避劑前測驗之結果。B 代表停留在試管底部的跳蚤隻數。Rep. 代表重複數。Ave. 代表平均

Table 2. Pretest results of cat flea repellents. B means the number of cat flea stayed on the bottom of test tube. Rep. means replicate. Ave. means average

Rep.	75% ethanol			小博士天然防蚊液			OFF! (15% deet)		
	Treat	Control	B	Treat	Control	B	Treat	Control	B
Centrifugal tube test (flat bottom)									
(1)	6	10	4	3	9	8	0	13	7
(2)	10	8	2	3	10	7	0	8	12
(3)	11	6	3	0	16	4	0	19	1
Ave.	9	8	3	2	11.6	6.3	0	13.3	6.6
SD	2.6	2	1	1.7	3.7	2	0	5.5	5.5
Glass tube test (round bottom)									
(1)	8	10	2	3	15	2	0	19	1
(2)	9	9	2	2	17	1	0	18	2
(3)	11	9	0	1	19	0	2	15	3
Ave.	9.3	9.3	1.3	2	17	1	0.6	17.3	2
SD	1.5	0.5	1.1	1	2	1	1.1	2	1

因上述的初步試驗證實，圓底玻璃試管濾紙條測試法可以顯現出忌避物質對貓蚤成蟲忌避效果之特性，因此再以 75% 酒精及歐護 (OFF!, 15% DEET) 的處理並進行 10 次重複來測定對貓蚤成蟲忌避效果之穩並性。試驗結果如表三，75% 酒精的處理不論在處理邊或是控制邊上，貓蚤數量的平均都是 9.8 隻，而歐護處理的處理邊上及控制邊上的貓蚤數量平均分別為 0.3 隻和 19 隻。雖然貓蚤在 75%

酒精處理組別上看似無規則之隨機分布，但若是將兩邊的結果平均則可得到相同的結果，也就是無忌避的現象，而歐護處理的組別則呈現出 10 次重複的相似結果。由此試驗證實，以圓底玻璃試管濾紙條測試法進行貓蚤成蟲忌避測試的結果穩定，所以往後的貓蚤忌避劑簡易測試即以圓底玻璃試管濾紙條測試法進行。

表三、圓底玻璃試管濾紙條測試法之穩定性試驗結果。B 代表停留在試管底部的跳蚤隻數

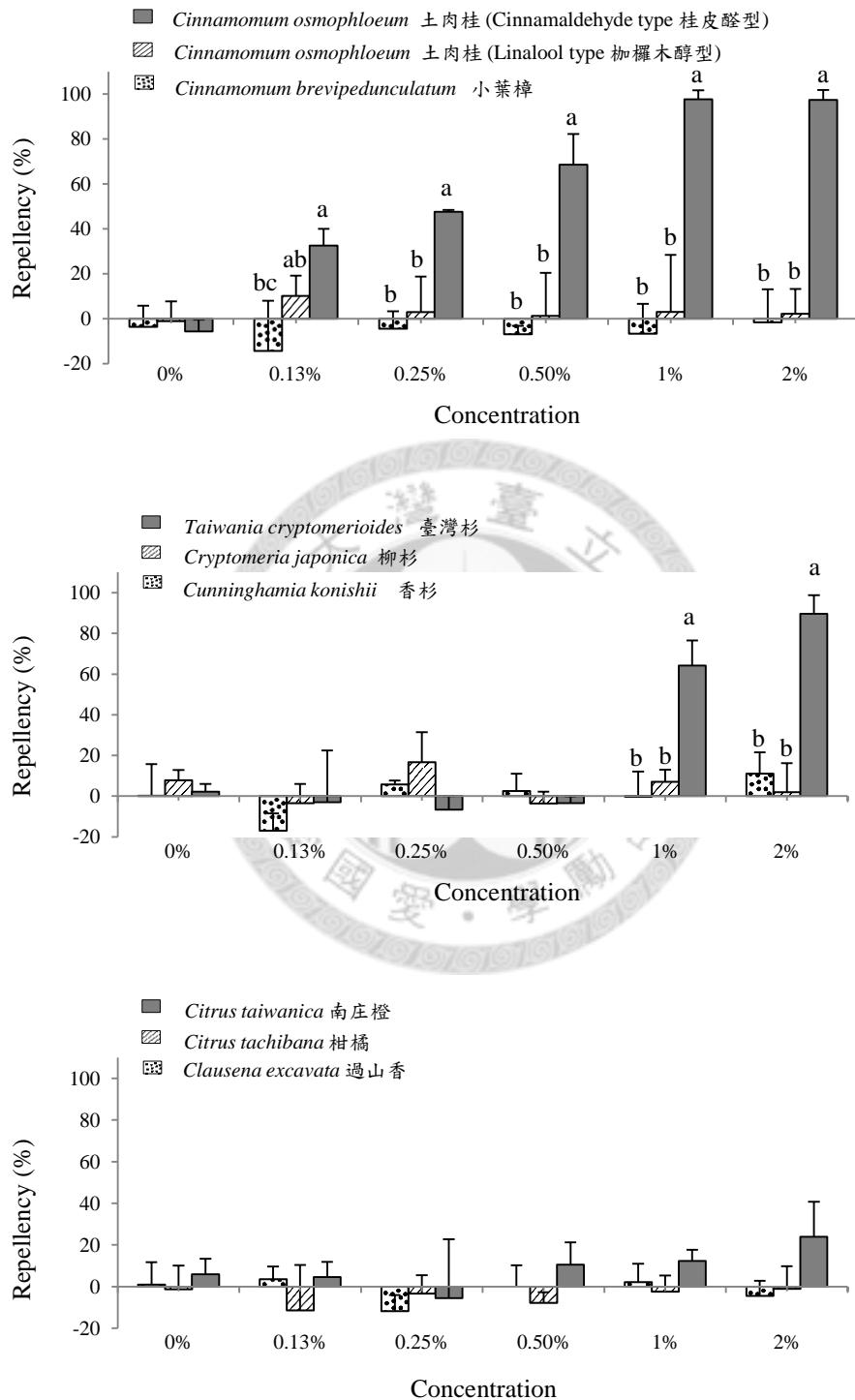
Table 3. The stability test result of glass tube of round bottom with filter paper strip tested method. B means the number of cat flea stayed on the bottom of test tube

Replicate	75% ethanol			OFF ! (15% deet)		
	Treat	Control	B	Treat	Control	B
(1)	9	10	1	0	20	0
(2)	8	12	0	0	20	0
(3)	10	9	1	1	17	2
(4)	13	6	1	0	19	1
(5)	9	11	0	0	19	1
(6)	8	12	0	1	19	0
(7)	9	11	0	0	19	1
(8)	13	7	0	0	19	1
(9)	12	7	1	0	19	1
(10)	7	13	0	1	19	0
Average	9.8	9.8	0.4	0.3	19	0.7
SD	2.14	2.44	0.51	0.48	0.81	0.67

二、精油對貓蚤成蟲之忌避活性

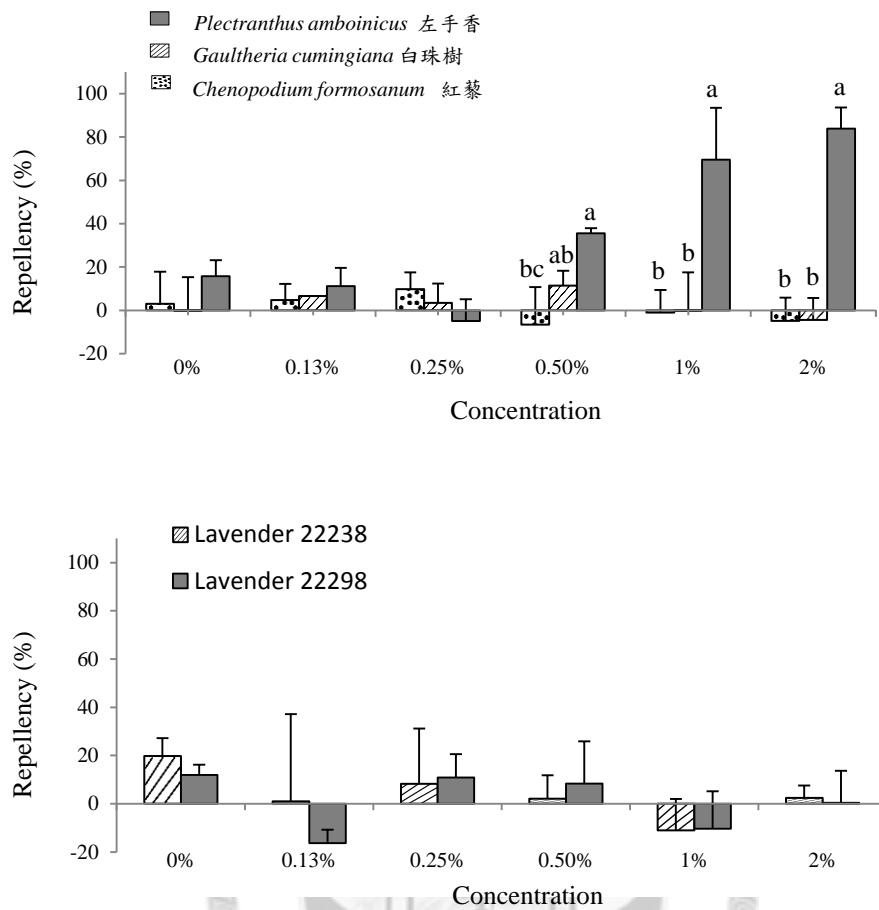
根據圖六顯示，三種樟科植物的精油中，肉桂醛型土肉桂葉子精油對於貓蚤成蟲的忌避效果明顯最佳，特別是在 2% 及 1% 濃度的忌避率可以達到 97.5% 及 97.7%，另外在 0.5% 濃度時還有 68.6% 的忌避效果；三種杉科植物精油，以臺灣杉心材精油對貓蚤成蟲的忌避效果最佳，特別是在 2% 濃度的忌避率可高達 89.6%；而三種芸香科植物精油、二種薰衣草精油及另外三種植物精油中，只有唇形花科的左手香葉子精油在 2% 濃度時，對於貓蚤成蟲的忌避率可高達 83.8%；由以上結果可知貓蚤成蟲對於精油的

忌避率會隨著濃度的增加而上升。而其他的植物精油在 2% 及以下的濃度時，對於貓蚤成蟲則無忌避效果。



圖六、植物精油對貓蚤成蟲的忌避活性。

Fig. 6. Repellent activities of plant essential oils against adult cat fleas. Columns within each treatment with different letters are significantly different at $P < 0.05$.



圖六、植物精油對貓蚤成蟲的忌避活性。(續)

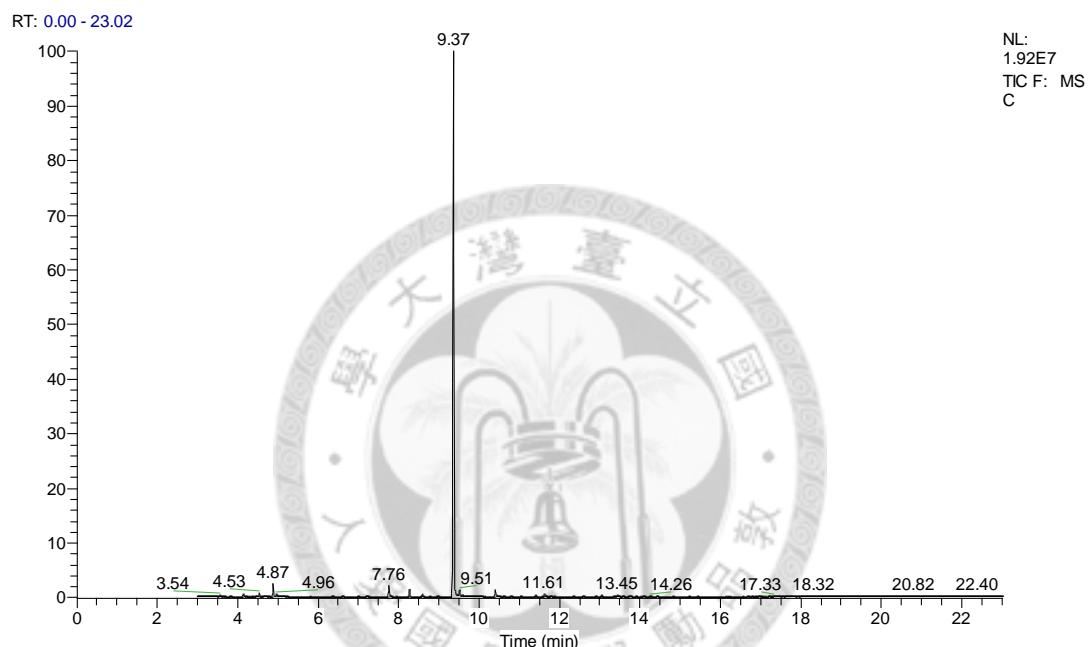
Fig. 6. Repellent activities of plant essential oils against adult cat fleas. Columns within each treatment with different letters are significantly different at $P < 0.05$.
(continued)

三、有效精油之成分分析

在生物活性試驗同時，我們亦利用氣相層析質譜儀，鑑定其組成活性物質，以便進行後續之試驗。圖七、圖八及圖九分別為肉桂醛型土肉桂葉子精油、左手香葉子精油及臺灣大學森林環境暨資源學系教授張上鎮老師提供的臺灣杉心材精油的層析圖譜。三種精油經氣相層析質譜儀鑑定出 15 個主要化合物（表四），肉桂醛型土肉桂葉子精油鑑定出的化合物有 *trans-cinnamaldehyde*、*3-phenylpropionaldehyde*、*trans-anethole*、*isobornyl acetate*、*eugenol*；左手香葉子精油鑑定出 5 個主要化合物，分別為 *thymol*、

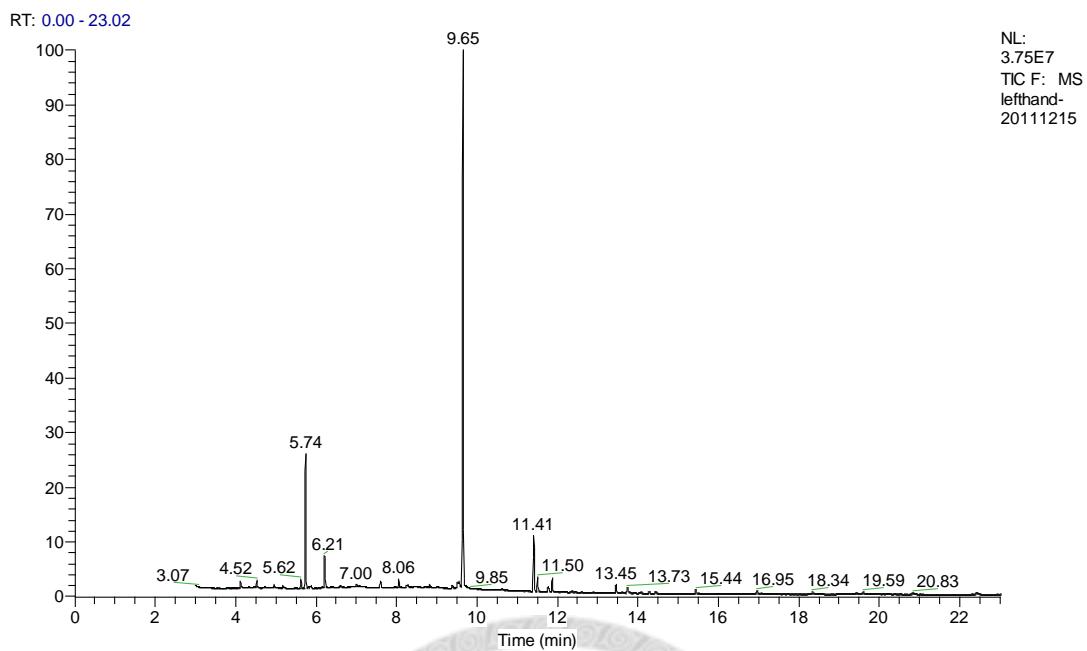
eugenol、caryophyllene、 γ -terpinene、 α -longipinene；臺灣杉心材精油所鑑定出的 5 個主要化合物分別為 α -cadinol、T-muurolol、cedrol、T-cadinol、 δ -cadinene。其餘的植物精油由張上鎮老師提供圖譜與鑑定成分如附錄二。

肉桂醛型土肉桂葉子精油、左手香葉子精油及臺灣杉心材精油的主要成分中，分別以 *trans-cinnamaldehyde*、thymol 和 α -cadinol、T-muurolol 的含量最多，因此後續試驗便以這些主成分來做進一步的測試。



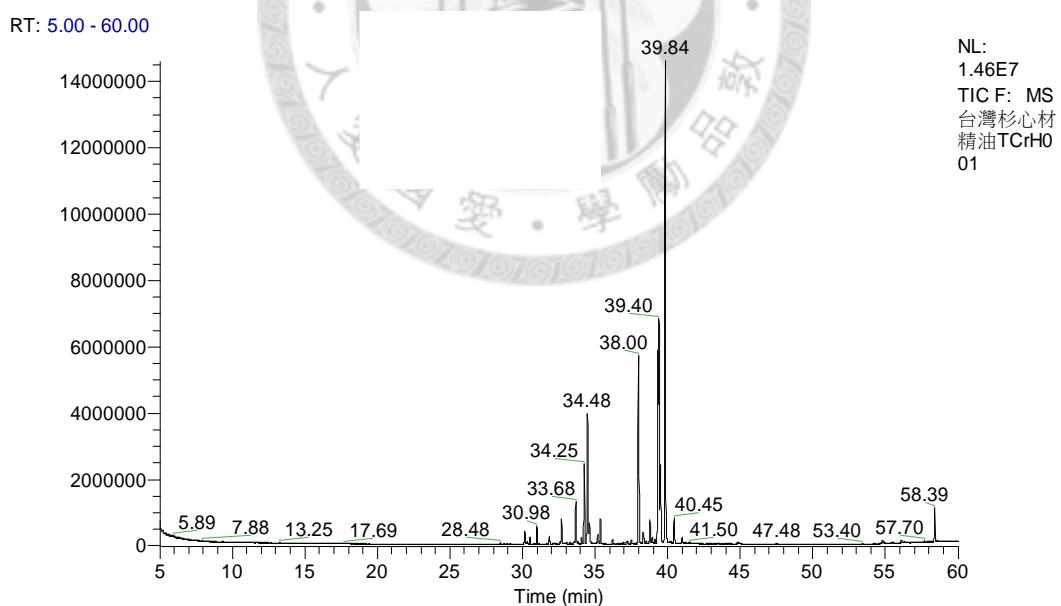
圖七、肉桂醛型土肉桂葉子精油之氣相層析圖譜。

Fig. 7. Gas chromatography of *trans-cinnamaldehyde* type leaf essential oil from *Cinnamomum osmophloeum*.



圖八、左手香葉子精油之氣相層析圖譜。

Fig. 8. Gas chromatography of leaf essential oil from *Plectranthus amboinicus*.



圖九、臺灣杉心材精油之氣相層析圖譜（臺灣大學森林環境暨資源學系教授張上鎮老師提供）。

Fig. 9. Gas chromatography of heartwood essential oil from *Taiwania cryptomerioides* (supplied by Prof. Shang-Tzen Chang in School of Forestry and Resource Conservation, National Taiwan University).

表四、土肉桂葉子、左手香葉子、臺灣杉心材精油的鑑定主要成分

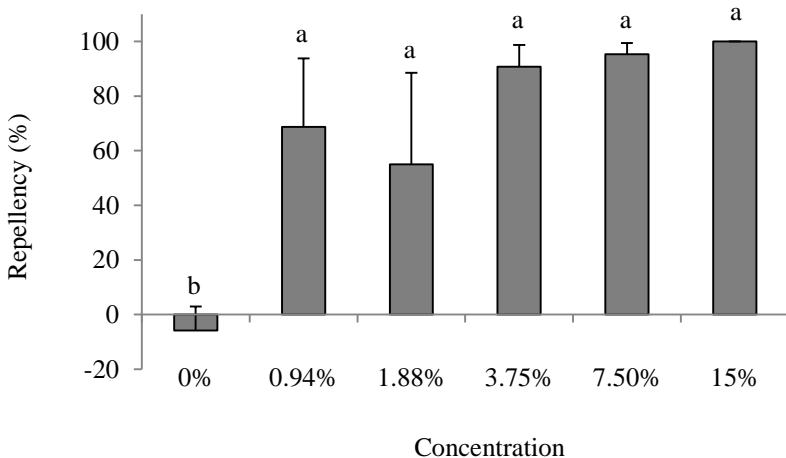
Table 4. Identified main components of essential oils from leave of *Cinnamomum osmophloeum* (trans-cinnamaldehyde type), *Plectranthus amboinicus* and heartwood of *Taiwania cryptomerioides*

NO	RT	Compounds	Area, %
<i>Cinnamomum osmophloeum</i> (cinnamaldehyde type)			
1	9.37	trans-cinnamaldehyde	87.06
2	7.76	3-phenylpropionaldehyde	1.76
3	8.28	trans-anethole	1.14
4	9.51	isobornyl acetate	1.11
5	10.40	eugenol	1.08
<i>Plectranthus amboinicus</i>			
1	9.65	thymol	58.08
2	5.74	eugenol	14.58
3	11.41	caryophyllene	6.01
4	9.51	r-terpinene	3.53
5	10.40	α-longipinene	1.58
<i>Taiwania cryptomerioides</i>			
1	39.84	α-cadinol	27.81
2	39.40	T-muurolol	12.80
3	38.00	cedrol	12.21
4	39.33	T-cadinol	11.00
5	34.48	δ-cadinene	7.82

四、精油主成分對貓蚤成蟲之忌避活性

(一) DEET 對貓蚤成蟲的忌避活性

如圖十所示，15% 濃度之 DEET 對於貓蚤成蟲的忌避效果可高達 100%，而 7.5% 與 3.75% 濃度的忌避效果也可以高達 95.2% 及 90.8%。但 7.5% 與 3.75% 濃度之 DEET 的忌避效果誤差較 100% 濃度之 DEET 高，且有文獻指出 15% DEET 對於許多種蚊子不論在忌避效果或是持續性都比其他濃度來的好 (Frances, 2007)，因此便挑選 15% 的 DEET 當作接下來試驗之正對照組。



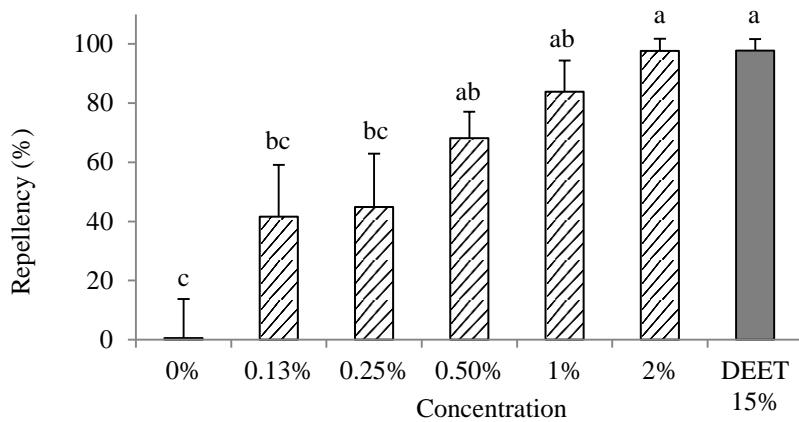
圖十、不同濃度之 DEET 對貓蚤成蟲的忌避活性。

Fig. 10. Repellent activities of different concentrations of DEET against adult cat fleas.

Columns with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

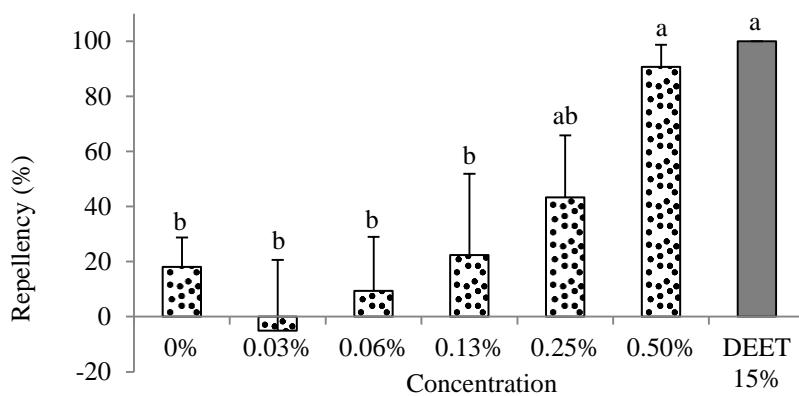
(二) 精油主成分對貓蚤成蟲的忌避活性

為探討精油對跳蚤的忌避作用的真正化學成分，因而先以各精油之主要化學成分進行對於貓蚤成蟲的忌避試驗。肉桂醛型土肉桂葉子精油的主成分 *trans-cinnamaldehyde* 在濃度 2% 時，對於貓蚤成蟲的忌避率可高達 97.6%，且與 15% 濃度的 DEET 之忌避率 97.7% 相當，而 *trans-cinnamaldehyde* 在濃度 1% 時，也有 83.8% 的忌避效果（圖十一）；左手香葉子精油的主成分 thymol 在濃度 2% 及 1% 時，因為對於貓蚤成蟲毒性太強，使得成蚤躁動或死亡而無法記錄結果，因此便從濃度 0.5% 往下序列稀釋再進行試驗。試驗結果如圖十二，濃度 0.5% 的 thymol 對於貓蚤成蟲的忌避率也可達到 90.6%，而濃度降到 0.25% 時，忌避率則只剩 43.2%；而臺灣杉心材精油之主成分 α -cadinol 和 T-muurolol 因為無法從藥商購買，且自木材萃取的量很少，因此只夠稀釋成 0.2% 濃度進行測試，測試結果如圖十三所示，兩者對貓蚤成蟲皆不具有忌避活性。



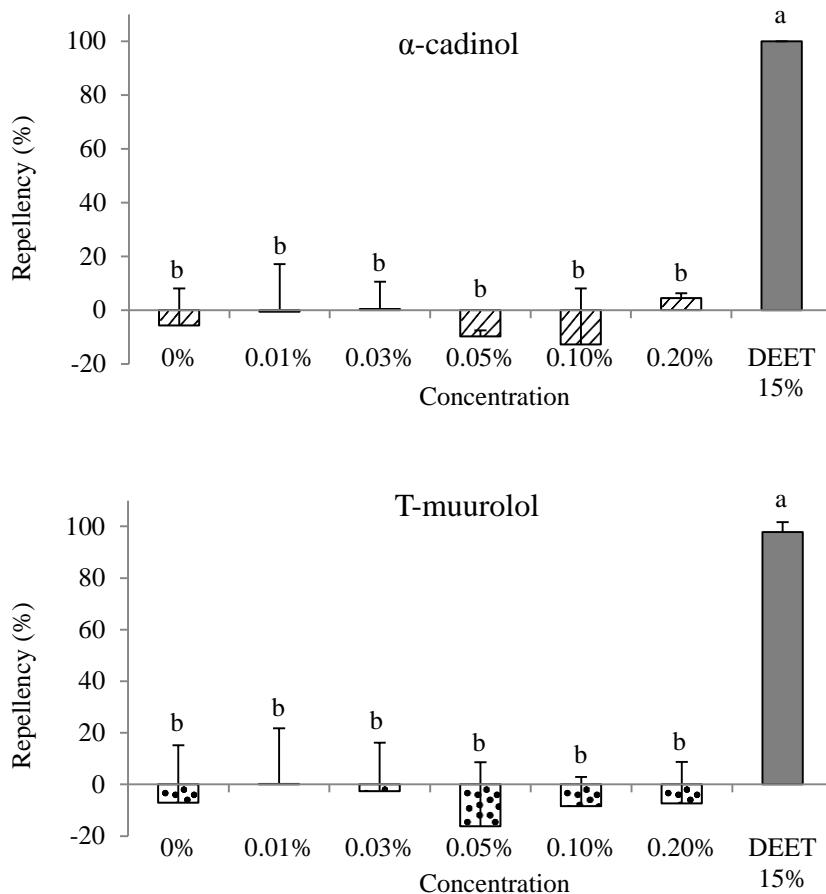
圖十一、*trans*-cinnamaldehyde 對貓蚤成蟲的忌避活性。

Fig. 11. Repellent activities of *trans*-cinnamaldehyde against adult cat fleas. Columns with different letters are significantly different at $P < 0.05$.



圖十二、thymol 對貓蚤成蟲的忌避活性。

Fig. 12. Repellent activities of thymol against adult cat fleas. Columns with different letters are significantly different at $P < 0.05$.



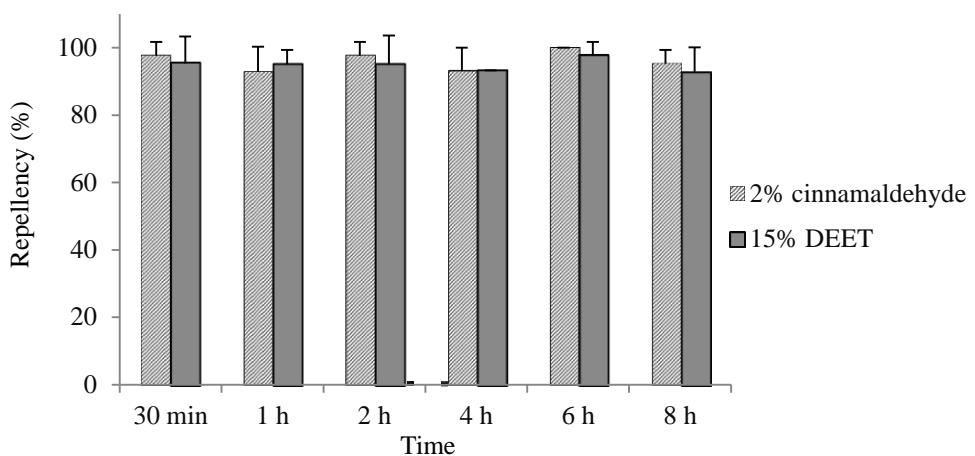
圖十三、 α -cadinol 與 T-muurolol 對貓蚤成蟲的忌避活性。

Fig. 13. Repellent activities of α -cadinol and T-muurolol against adult cat fleas.

Columns with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

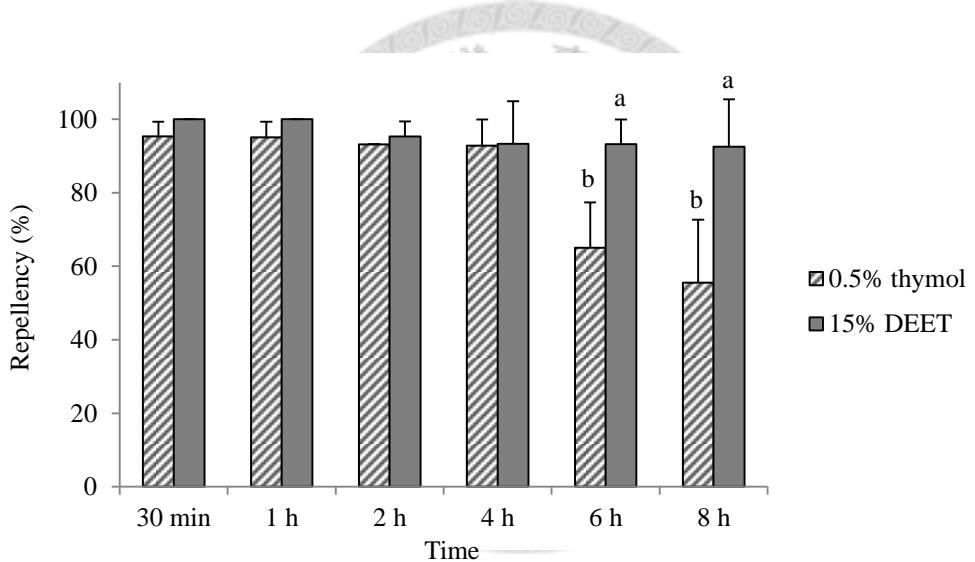
(三) 精油主成分對貓蚤成蟲的持續忌避活性

根據圖十四及圖十五顯示，2% 濃度的 *trans*-cinnamaldehyde 對於貓蚤成蟲的忌避活性在晾乾 30 分鐘、1 小時、2 小時、4 小時、6 小時和 8 小時後，忌避率分別為 97.6%、92.8%、97.6%、93.1%、100%、95.3%，與 15% 濃度之 DEET 的忌避效果相近。而濃度 0.5% 之 thymol 在晾乾 30 分鐘、1 小時、2 小時與 4 小時的忌避率分別為 95.3%、95.1%、93.1% 和 92.8%，而晾乾 6 小時與 8 小時的忌避率明顯下降為 65% 和 55%。 α -cadinol 和 T-muurolol 在濃度 0.2% 時，對於貓蚤成蟲不具忌避效果且取得有限，因此並未進行持續性之測試。



圖十四、*trans*-cinnamaldehyde 對貓蚤成蟲的持續忌避活性。

Fig. 14. Persistent repellent activities of *trans*-cinnamaldehyde against adult cat fleas.

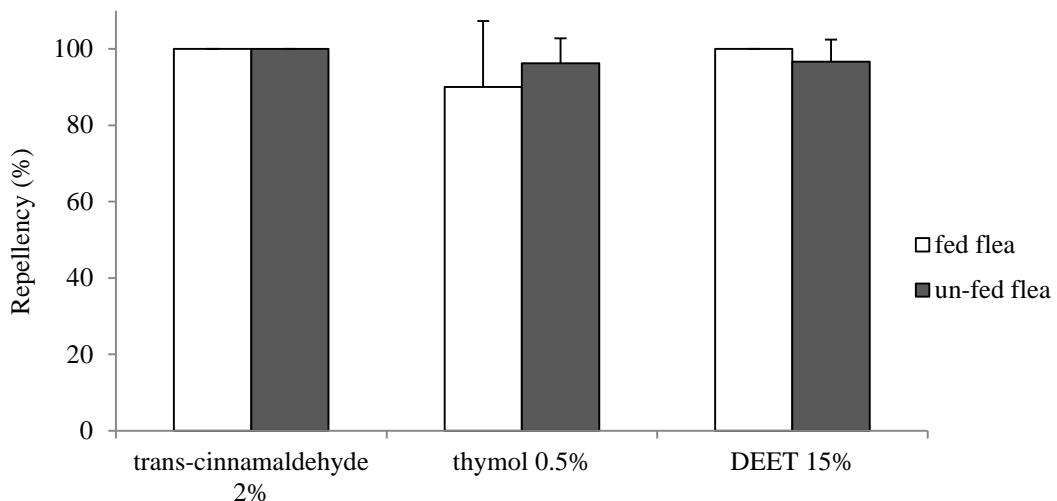


圖十五、thymol 對貓蚤成蟲的持續忌避活性。

Fig. 15. Persistent repellent activities of thymol against adult cat fleas. Columns within each treatment with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

(四) 精油主成分對於吸血之貓蚤成蟲的忌避活性

貓蚤成蟲在吸血 24 小時後，對於濃度 2% *trans*-cinnamaldehyde、0.5% thymol 與 15% DEET 的忌避率分別為 100%、90% 與 100%，此結果與未吸血貓蚤成蟲的忌避率，100%、96.2% 和 96.6% 在統計上並無顯著差異（圖十六）。

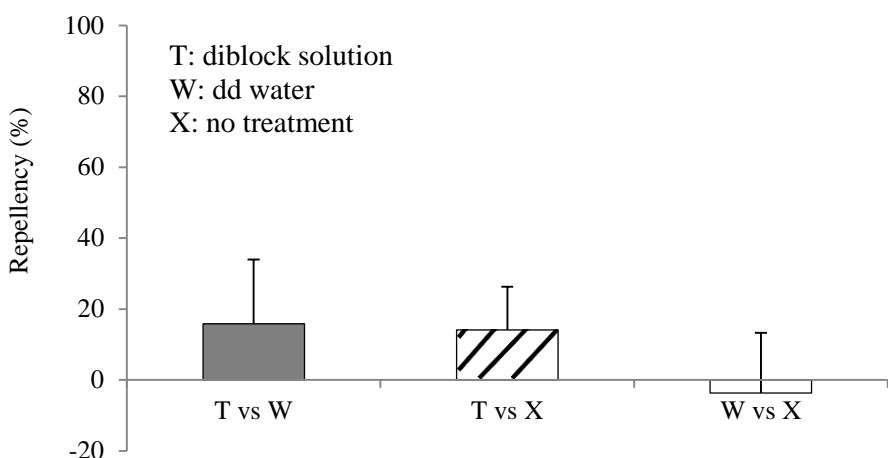


圖十六、2% *trans*-cinnamaldehyde、0.5% thymol 與 15% DEET 對吸血與未吸血之貓蚤成蟲的忌避活性。

Fig. 16. Repellent activities of 2% *trans*-cinnamaldehyde, 0.5% thymol and 15% DEET against fed and un-fed adult cat fleas.

(五) 包埋劑型的忌避活性

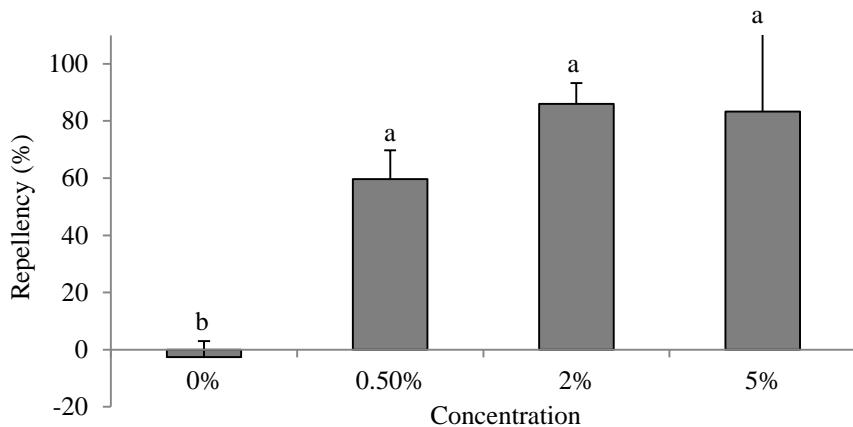
在試驗之初，為了瞭解未包埋任何物質之 diblock 溶液本身是否對跳蚤具有忌避作用，因此使用濃度 10 mg/mL 的 diblock 溶液 (T)、二次水 (W) 與無處理 (X) 來進行試驗（圖十七）。一邊濾紙滴上 diblock 溶液，另一邊則是滴上二次水或是無處理，另一組則是一邊滴上二次水，一邊無處理，總共有 3 組處理，晾乾黏合後再放入試管觀察貓蚤成蟲在濾紙上的分布情況。試驗結果顯示，不論是 diblock 溶液與二次水或是與無處理互相比較，其結果都呈現對貓蚤成蟲並無明顯忌避效果。



圖十七、diblock 溶液、二次水與無處理對於貓蚤成蟲忌避效果。

Fig. 17. The repellent activity of diblock solution, deionized distilled water and no treatment to adult cat fleas.

得知此 diblock 溶液對貓蚤成蟲不具忌避之影響後，便開始以經 diblock 包埋之精油進行忌避試驗。*trans-cinnamaldehyde* 之 diblock 溶液包埋濃度提高至 5% 及 10% 是原先以為經過包埋後，會因揮發較慢使得忌避效果降低因而提高包埋濃度，但試驗結果卻發現，不只是 5% 和 10% 的濃度無法記錄忌避效果，就連 2% 的包埋濃度也無法記錄，因為這 3 個濃度的貓蚤成蟲在 10 分鐘的觀察時間內就已經全數死亡。但包埋過 thymol 的 diblock 溶液所做出的結果卻跟 *trans-cinnamaldehyde* 的結果完全不同，原先 0.5% 之 thymol 未包埋溶液就可以有很好的忌避效果，但經過包埋後的 thymol 之忌避效果卻降低至 59.7%，而濃度提升至 2% 時才有 85.9% 的忌避效果，但當濃度提升至 5% 時，忌避效果雖然為 83.3%，但卻變得非常不穩定（圖十八）。

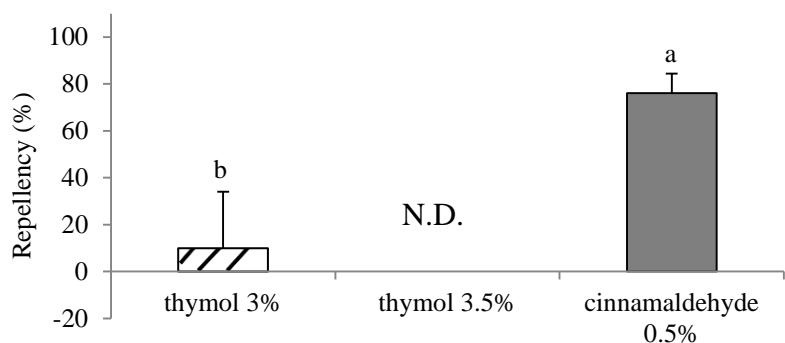


圖十八、包埋 thymol 之 diblock 溶液對貓蚤成蟲的忌避結果。

Fig. 18. The repellent activity of diblock-encapsulated thymol against adult cat fleas.

Columns with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

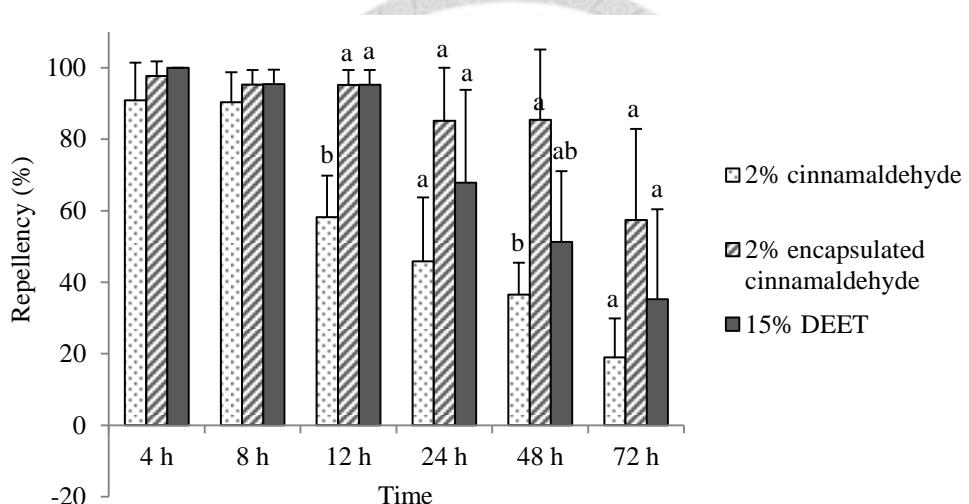
為了解包埋 *trans*-cinnamaldehyde 與 thymol 之 diblock 溶液的最有效忌避濃度，因此再重新包埋調配成不同的濃度以進行忌避試驗。試驗結果如圖十九所示，當 *trans*-cinnamaldehyde 重新調配成濃度 0.5% 時，忌避率還可達到 76.1%。但當 thymol 的濃度提高到 3% 及 3.5% 時，3% 的忌避率為 9.9%，而 3.5% 則產生無法計算忌避率的情況。由此結果得知，經由 diblock 包埋過的 *trans*-cinnamaldehyde 比 thymol 來的穩定，且對於貓蚤成蟲的忌避效果較佳，因此便以 2% *trans*-cinnamaldehyde 的 diblock 溶液再來進行持續性試驗。



圖十九、diblock 包埋的 *trans*-cinnamaldehyde 與 thymol 溶液對貓蚤成蟲的忌避效果。N.D.：未測定。

Fig. 19. The repellent effect of diblock-encapsulated *trans*-cinnamaldehyde and thymol against adult cat fleas. N.D.: not determined. Columns with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

持續性試驗結果如圖二十所示，2% 濃度 *trans-cinnamaldehyde* 未包埋之溶液在晾乾 8 小時後，忌避率還可高達 90.2%，但晾乾 12 小時的忌避率卻只剩下 58.1%，且忌避效果隨著晾乾時間增加往下遞減，而同樣晾乾 12 小時之 15% DEET 的忌避率卻還可維持在 95.2%。反觀經 diblock 包埋過後 2% 濃度的 *trans-cinnamaldehyde*，忌避率可持續到晾乾 48 小時都還有 85.3% 的效果，而 15% DEET 的忌避效果自 12 小時開始遞減，到晾乾 48 小時後，忌避率只剩下 51.2%。由以上試驗結果得知，經由 diblock 包埋後的 *trans-cinnamaldehyde* 不只效果較 thymol 佳，且對貓蚤成蟲的忌避持續性也比未包埋的 *trans-cinnamaldehyde* 來的持久，24 小時後的持續效果也較 DEET 為佳。



圖二十、diblock 包埋對 *trans-cinnamaldehyde* 對貓蚤成蟲忌避效果的影響。

Fig. 20. The effect of diblock encapsulation on the repellent activity of *trans-cinnamaldehyde* against adult cat fleas. Columns within each treatment with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

伍、討論

一、新型的跳蚤忌避劑篩選模型

以往跳蚤忌避劑的篩選方法多使用活體試驗，雖然使用活體測試忌避效率較接近真實的情況，但如果這些化合物本身就具有毒性，而在未知情且無通過毒性測試前，就使用這些化合物來做試驗，即使通過了忌避率測試，也不可將之發展成商品，因為這或許會造成許多人嚴重過敏，甚至導致急性皮膚炎的症狀；例如將迷迭香精油塗抹在皮膚上即會引發嚴重的接觸性皮膚炎 (Trumble, 2002)。此外，活體試驗的成本昂貴且會耗費許多時間，因為如用動物做試驗對象，必須定期餵食且照顧這些動物以及居住環境和設備的維護，而若用人做試驗則需要向相關之政府機關申請人體試驗，且必須付給受試者一定金額之報酬，因此不管是時間或是金錢，都是昂貴負擔。此外，不論用動物或是人體來做試驗，因每一試驗個體取得不易，所以較難進行多重複與多處理的測試。例如 Barnard (1998) 的研究報告裡，受試者於試驗中用一隻手臂來做測試，而另一隻手臂則是做為對照組，因此一次試驗只能測試一種忌避劑或是一種劑量。如果要測試多種忌避劑，或是進行同一種忌避劑不同劑量的測試，則需要進行相當多次的試驗，或是找尋更多受試者一同參與測試，既耗時也費力。

為了克服活體測試的缺點，忌避劑簡易篩選模型便因應而生。簡易篩選模型除了較節省成本及避免讓活體直接暴露在化學物質的風險外，其講求的就是操作方便，可大量篩選待測物質，並且節省測試的時間。雖然簡易篩選模型的方便性高，但所篩選出的物質還需要考量到結果是否有過顯性的現象，因為所測試的待測物在模型中測試或許效果相當顯著，但若是使用在活體身上，同樣的化學物質可能遭受到生物因子及非生物因子的干擾，使得效果不如用模型測試所得到的結果來的好。生物性干擾因子包括皮膚的吸收和蒸散、吸血性節肢動物的種類、個體吸引吸血性節肢動物的程度等；而非生物干擾因子有化學物質的揮發程度、氣

候的溫度和濕度、風速、下雨或流汗衝掉化學物質、皮膚和衣物之間的磨擦等 (Govere and Durrheim, 2007)。因此，若是要開發新的忌避劑商品，最後的步驟勢必要經過人或者其他動物的測試，並評估各項因子間的干擾，方能得到更可靠的忌避效果。

不同的節肢動物都有其適合的忌避劑篩選模型，飛行性節肢動物適合使用籠子或箱子等具有較大空間以利飛行的模型。而爬行性的節肢動物則需要相對較平面的空間，且可以用最輕便的模型來做篩選。如先前所述，現今普遍使用於篩選爬行性節肢動物的模型多以圓型濾紙測試法為主。因此試驗之初先依照 Bissinger *et al.* (2009) 的方法，進行貓蚤忌避劑的測試，但卻發現操作不便及結果不穩定的問題。主要因貓蚤是一種會爬行及跳躍的昆蟲，當要將貓蚤放入培養皿時，貓蚤便會迅速地跳離培養皿；如使用 CO_2 將之迷昏，其恢復時間相當快；若使用低溫處理，又會使得有些貓蚤個體死亡而減少樣本數；此外，將蓋子蓋上後，跳蚤則會跳上蓋子的縫隙而鑽出測試區，影響到後續忌避結果的呈現。因此方法操作不便及結果不穩定的問題，而需重新再設計一個適合的方法。

離心管濾紙條測試法的設計概念在於利用跳蚤會向上爬的習性，而設計出垂直的濾紙條來進行試驗。有別於平面的圓型濾紙測試法，垂直的濾紙條測試法再搭配跳蚤分離器的操作，更適合用於跳蚤的測試。雖然試驗操作簡易很多，但此方法的問題點在於底部面積大，可提供貓蚤立足的空間，使得許多貓蚤會停留在離心管底部而不爬上濾紙，造成記錄上的困難。但改用圓底玻璃試管後，因為試管底部呈現凹狀的半圓形且表面光滑，而當跳蚤蒐集後放於試管時，因跳蚤較難停留而集中在試管底部，再加上濾紙一端剪成尖型，更容易使跳蚤攀附到濾紙而向上爬行。

此外，本試驗所測試的物質多半都具有揮發性，而揮發性是較常被拿來定義忌避劑活性的特性，有些化學物質的揮發會刺激昆蟲的腳，使得昆蟲不想花太多時間停留在有化學物質處理的區域 (Peterson and Coats, 2001)，若是以圓底玻璃試

管濾紙條測試法對跳蚤進行有效的忌避物質測試時，即可觀察到此現象，跳蚤大部分都會停留在控制組的區域上，若是爬行到處理區也會趕緊調頭或是跳離此區域而改停留在控制區上。每一根試管皆可放置於試管架上進行觀察，因此可大量進行待測物的試驗（附錄三）。而觀察結束後可放置於室內 1 天，如果此待測物對跳蚤具有毒性，即可發現跳蚤多數平躺於試管底部，此額外功能雖然無法作為正式的跳蚤成蟲毒性試驗，但可做為往後正式跳蚤成蟲毒性試驗的依據。以此方法在觀察跳蚤忌避情況時，應當注意燈光的光源及觀察者的位置及避免動作過大，以防產生影子及震動而吸引跳蚤的聚集。

二、植物精油及主成分對貓蚤成蟲的忌避活性

本論文試驗幾種植物精油及主成分對貓蚤成蟲的忌避結果顯示，對貓蚤成蟲具有較高忌避效果的植物精油種類為肉桂醛型土肉桂葉子精油、臺灣杉心材精油及左手香葉子精油，經化學成分之鑑定後得知主成分分別為 *trans-cinnamaldehyde*、 α -cadinol、T-muurolol 和 thymol，其中只有 *trans-cinnamaldehyde* 及 thymol 所取得的量足夠以濃度 2% 來進行忌避試驗，而同樣是主成分為伽櫟木醇的土肉桂葉子精油對貓蚤成蟲卻無忌避效果。此外，Cheng *et al.*(2009) 同樣以不同品系之台灣土肉桂葉子精油來進行對白線斑蚊幼蟲的毒殺測試，含量 95.13% 之伽櫟木醇型土肉桂葉子精油及伽櫟木醇對白線斑蚊幼蟲的 24 小時半數致死濃度分別為 144.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $>100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，比起肉桂醛型土肉桂葉子精油和 *trans-cinnamaldehyde* 的 24 小時半數致死濃度 40.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 48.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 高出許多。由此可知，若使用同一樹種同一部位的精油或是萃取物來防治害蟲，如果不確定其植株品系或者植物體內的天然化學物質組成而直接用於防治害蟲上，有可能導致防治效果不彰，且若是主要成分取得不易，即使此化學物質可有效的驅趕害蟲，也會因為成本的關係而降低開發之價值。

雖然臺灣杉心材精油之主成分 α -cadinol 和 T-muurolol 含量不足以呈

現出對貓蚤有忌避效果且這兩種化學物質無法從廠商購買，但若直接以臺灣杉之木材或精油來防治害蟲或許較使用主成分防治來得有利。例如 Chang *et al.* (2001b) 經由測試發現臺灣家白蟻對臺灣杉邊材和心材所造成的木材重量損失百分比分別只有 $1.3 \pm 0.1\%$ 和 $1.1 \pm 0.1\%$ ，而 $12.6 \mu\text{g/mL}$ 的臺灣杉精油對於歐洲室塵蟎的致死率在 48 小時後還可達到 67.0% (Chang *et al.*, 2001c)，且本試驗中的 2% 臺灣杉心材精油在晾乾 30 分鐘後對貓蚤也具有 89.6% 之忌避效果。因此，目前若希望開發臺灣杉之相關防蟲產品，或許以臺灣杉木材精油或木材本身來當作是產品之主要資材是較可行的。

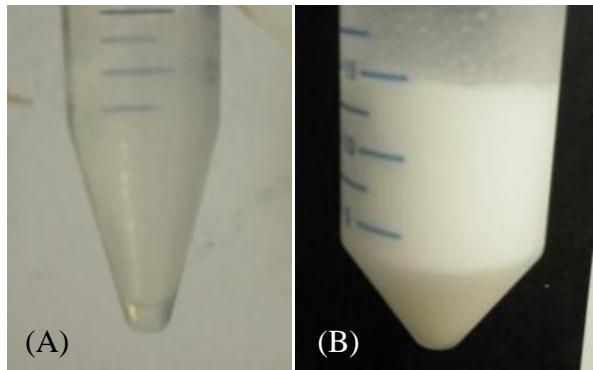
大部分從植物中取得的活性物質都具有高度的揮發性，致使容易消逝而使得效果喪失 (Lindsay *et al.*, 1996)，因此在保存精油或主成分方面，盡量使用棕色玻璃瓶，且瓶子外側最好用鋁箔紙包覆住、再放置冰箱的低溫環境中，以減少受到光照和高溫而產生變化。欲進行精油忌避劑之測試時，要考量的另一重要因素即是此精油或是主成分的揮發性和溫度之間的關聯、與具有忌避效果的持續時間。由上述之主成分持續性測試結果得知，在控制 27°C 的溫度環境下，2% 濃度的 *trans-cinnamaldehyde* 在放置 8 小時後，對貓蚤成蟲的忌避效果還是相當地高。而 *thymol* 雖然對貓蚤成蟲的最低忌避有效濃度為 0.5% 濃度，低於 *trans-cinnamaldehyde* 的 2% 濃度，但是 0.5% 濃度之 *thymol* 放置 6 小時後的忌避效果就明顯下降許多，此可能是因為不同的濃度，所導致持續性有效時間的差異。

三、以 diblock 包埋主成分之忌避試驗

以 diblock 包埋化學物質現今大多使用於人體內的醫療用途，目前為止尚未得知此種材料和技術被使用於人體外的用途。此部分研究希望藉由 diblock 包埋物質的特性來延長天然植物主成分的忌避效果。由以上試驗結果證實，以 diblock 包埋 2% 濃度 *trans-cinnamaldehyde* 對貓蚤成蟲來說，確實可以有效的延長忌避效果，且在濃度使用上，*trans-cinnamaldehyde* 經

由 diblock 包埋後的濃度只需要 2% 就可對貓蚤成蟲具有很高且相當持久的忌避效果，相對於 DEET 而言，雖然濃度高達 15%，但對於貓蚤成蟲的忌避持續性卻還不及 2% *trans-cinnamaldehyde* 的 diblock 溶液來的持久。有鑑於 *trans-cinnamaldehyde* 經過 diblock 包埋後可延長忌避效果與低濃度使用量即可達到高水平忌避率的特性，未來跳蚤忌避商品的開發上，考量取得原料使用的成本與效果間的平衡，*trans-cinnamaldehyde* 相較於 DEET 將更可被研發人員所接納。

此外，*trans-cinnamaldehyde* 的 diblock 溶液相較於包埋 diblock 的 thymol 溶液更來的穩定。造成此現象的原因，推測可能是由於兩種物質的化學結構式不同所導致的差異，且經 diblock 包埋的 *trans-cinnamaldehyde* 和 thymol 兩種溶液有很明顯的不同，包埋 *trans-cinnamaldehyde* 的 diblock 溶液是呈現乳白色的均勻液體，此代表 diblock 有成功並均勻包覆住 *trans-cinnamaldehyde*，底部沉澱的是白色粉末狀的 diblock。但包埋 thymol 的 diblock 溶液一開始是呈現混濁的乳白色液體，而靜置一段時間之後，則是呈現透明無色的液體，而且溶液還出現水層及油層的分層現象（圖二十一），此代表包埋好 thymol 的溶液，如果靜置一小段時間之後，裡面的成分還會再度脫離 diblock 而沉澱，所以在試驗前振盪溶液的時候，較難使 thymol 和 diblock 再均勻分布而導致試驗結果相當不穩定。



圖二十一、diblock 包埋精油主成分的溶液，(A) 包埋 thymol 的 diblock 溶液；
(B) 包埋 *trans*-cinnamaldehyde 的 diblock 溶液。

Fig. 21. The diblock-encapsulated solution. (A) the diblock solution of thymol; (B) the diblock solution of *trans*-cinnamaldehyde.



陸、結論

現今防治貓蚤主要依賴化學合成藥劑為主，但長時間使用化學藥劑有其缺點，且並非所有時機與場合都適用化學合成藥劑防治貓蚤。因此，研發天然防蟲物質，並以使用忌避劑的方法來取代化學合成殺蟲劑是未來的趨勢。在研發跳蚤忌避劑的階段中，測試方法是較為關鍵的一環，因先前的跳蚤忌避劑研究多以活體測試為主，除了較耗費金錢與時間成本外，這些化學物質還可能造成受試動物的不適，因此便以非活體試驗、且操作簡單的測試方法來進行忌避物質的篩選。本論文依據貓蚤成蟲的行為來設計的圓底玻璃試管長條濾紙測試法，利用歐護、小博士天然防蚊液及 75% 酒精進行的測試，證實此測試方法具有試驗的應用性；另外，使用歐護與 75% 酒精進行 10 次重複測試的結果穩定，可以得知此試驗方法具有良好的再現性。由於此試驗方法同時具有應用性及再現性，因此往後的貓蚤成蟲忌避劑篩選便以此方法進行。

本論文比較 14 種植物精油對貓蚤成蟲的忌避結果得知，桂皮醛型土肉桂葉子精油、臺灣杉心材精油及左手香葉子精油對於貓蚤成蟲的忌避效果最佳，且精油成分的鑑定分析得知三種精油的主成分分別為 *trans-cinnamaldehyde*、 α -cadinol 和 T-muurolol、thymol。利用此等主成分再進行對貓蚤成蟲忌避效果的試驗，因 α -cadinol 和 T-muurolol 含量較少，且現今無法從廠商購買，而濃度 0.2% 對貓蚤成蟲也不具忌避效果，因此在未來開發成本的考量上， α -cadinol 和 T-muurolol 目前較不適合用於製成商品。而 2% *trans-cinnamaldehyde* 和 0.5% thymol 的試驗結果都呈現出對貓蚤成蟲具有很高的忌避效果，且 2% *trans-cinnamaldehyde* 在持久性測試結果，比 0.5% thymol 對於貓蚤成蟲具有更長的忌避效果，值得進一步後續開發。

而考量到 *trans-cinnamaldehyde* 和 thymol 活性較大且易揮發的特性，因此在開發商品的研究上需要搭配適合的劑型並做測試，以進一步提高和延長其忌避效果。由本論文以 PEG-PCL 的 diblock 包埋 2% *trans-cinnamaldehyde* 和 0.5%

thymol 對貓蚤成蟲的忌避試驗結果得知，2% *trans*-cinnamaldehyde 可能因為包埋的關係，而使 *trans*-cinnamaldehyde 在濾紙上的濃度提高、或改變 *trans*-cinnamaldehyde 的化性，使得 diblock 包埋之 2% *trans*-cinnamaldehyde 在短時間晾乾下，對貓蚤效應從忌避效果轉變成毒殺的作用。而 thymol 經由 diblock 包埋後，對貓蚤的忌避效果卻不如預期、且變異很大。可能原因是 PEG-PCL 的 diblock 這種材料無法有效包埋 thymol，而導致包埋後反而有分層的現象，而包埋後的 *trans*-cinnamaldehyde 溶液則呈現均勻的乳白色液體。此外，2% *trans*-cinnamaldehyde 經由 PEG-PCL 的 diblock 包埋後，在長時間晾乾的條件下可延長對貓蚤成蟲的忌避效果。由目前結果可以證實，以 PEG-PCL 的 diblock 較適合當作 *trans*-cinnamaldehyde 包埋的劑型。而 thymol 成分則需要開發其他更適合之包埋劑型，以作為發展成忌避商品之可能性。

由於環保與安全考量，天然植物或萃取物所製成的產品成為流行之趨勢，然並非天然植物或萃取物對人或動物就是安全無毒，若未經安全試驗，並不一定比合成的安全；許多植物裡所含的物質對人類皮膚就具有刺激性，若是貿然製成商品上架販售，可能造成嚴重的後果。此外，如天然忌避物質未經過各種害蟲的忌避效果篩選，貿然使用這些天然物來防治害蟲，除了可能效果不佳外，也可能發生誘引另一種害蟲前來的情況。因此，篩選出對跳蚤具有忌避效果的化合物以提供未來發展商品時，需再通過動物的毒性測試，以確保此物質在施用時安全無慮，才可能提高製成商品並上架販售的潛力。

柒、參考文獻

- 王升陽、鄭森松、張上鎮。2009。土肉桂飄香-葉子的神奇功效及應用。臺灣林業 35：116-122。
- 余志儒。2005。植物抽取液防治蟲害研究現況。優質安全農產品研討會專刊：129-139。
- 周欽賢、連日清、王正雄。2005。醫學昆蟲與病媒防制（修訂版）。南山堂出版社，臺北市。658頁。
- 洪毓珮、楊育書。2007。誰是左手香？。中國醫訊 46：48。
- 徐雅均。2000。食物因子對貓蚤幼蟲發育及存活的影響。國立臺灣大學昆蟲學系碩士論文。53頁。
- 張上鎮、王升陽、吳季玲。2005。臺灣杉 Cadinane 類倍半萜之生物活性。臺灣林業 31：29-34。
- 陳怡如。2010。貓蚤對系統性殺蟲劑的感受性試驗。國立臺灣大學昆蟲學系碩士論文。63頁。
- 陳品方。2000。臺灣杉與土肉桂精油及成份之生物活性。國立臺灣大學森林環境暨資源學系碩士論文。66頁。
- 陳信龍。2004。高分子之自組裝奈米結構。Chemistry (The Chinese Chem. Soc., Taipei) 62：455-460。
- 陳福安。2012。精油產品面面觀。科學發展 469：20-24。
- 葉若鋆。2008。植物二次代謝物與病蟲害防治。臺灣林業 34：33-37。
- 楊政川、李世傑、何坤益、林敏宜。2010。臺灣森林特產物-土肉桂。科學發展 446：28-33。
- 楊政典。2004。具自由胺基微胞之合成與特性分析及於藥物釋放之應用：聚己內酯-幾丁寡糖-聚乙二醇雙性共聚合物。中原大學醫學工程學系碩士論文。108頁。

謝博銓。2012。花草精靈 精油的奧秘。科學發展 469：6-9。

蘇凱馨。2005。植物中揮發性抗菌活性成分之研究。國立屏東科技大學食品科學系碩士論文。113頁。

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol* 46: 446-475.

Barnard DR. 1998. Mediation of deet repellency in mosquitoes (Diptera: Culicidae) by species, age, and parity. *J Med Entomol* 35: 340-343.

Barnard DR, Xue RD. 2004. Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 41: 726-730.

Bar-Zeev M, Gothilf S. 1972. Laboratory evaluation of flea repellents. *J Med Entomol* 9: 215-218.

Birkett MA, Hassanali A, Hoglund S, Pettersson J, Pickett JA. 2011. Repellent activity of catmint, *Nepeta cataria*, and iridoid nepetalactone isomers against Afro-tropical mosquitoes, ixodid ticks and red poultry mites. *Phytochemistry* 72: 109-114.

Bissinger BW, Apperson CS, Sonenshine DE, Watson DW, Roe RM. 2009. Efficacy of the new repellent BioUD® against three species of ixodid ticks. *Exp Appl Acarol* 48: 239-250.

Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J, Stashenko EE. 2011. Repellent activity of essential oils and some of their individual constituents against *Tribolium castaneum* Herbst. *J Agric Food Chem* 59: 1690-1696.

Chang KS, Tak JH, Kim SI, Lee WJ, Ahn YJ. 2006. Repellency of *Cinnamomum cassia* bark compounds and cream containing cassia oil to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory and indoor conditions. *Pest Manag Sci* 62: 1032-1038.

Chang ST, Chen PF, Chang SC. 2001a. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol* 77: 123-127.

Chang ST, Cheng SS, Wang AY. 2001b. Antitermitic activity of essential oils and components from Taiwania (*Taiwania cryptomerioides*). *J Chem Ecol* 27: 717-724.

Chang ST, Chen PF, Wang SY, Wu HH. 2001c. Antimite activity of essential oils and their constituents from *Taiwania cryptomerioides*. *J Med Entomol* 38: 455-457.

Cheng SS, Liu JY, Tsai KH, Chen WJ, Chang ST. 2004. Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oil from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. *J Agric Food Chem* 52: 4395-4400.

Cheng SS, Liu JY, Huang CG, Hsui YR, Chen WJ, Chang ST. 2009. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. *Bioresour Technol* 100: 457-464.

Cheng SS, Liu JY, Lin CY, Hsui YR, Lu MC, Wu WJ, Chang ST. 2008. Terminating red imported fire ants using *Cinnamomum osmophloeum* leaf essential oil. *Bioresour Technol* 99: 889-893.

De Almeida RN, Araujo DAM, Goncalves JCR, Montenegro FC, De Sousa DP, Leite JR, Mattei R, Benedito MAC, De Carvalho JGB, Cruz JS, Maia JGS. 2009. Rosewood oil induces sedation and inhibits compound action potential in rodents. *J Ethnopharmacol* 124: 440-443.

Delaplane KS. 1992. Controlling tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) with vegetable oil and menthol. *J Econ Entomol* 85: 2118-2124.

Diao YY, Li HY, Fu YH, Han M, Hu YL, Jiang HL, Tsutsumi Y, Wei QC, Chen DW,

- Gao JQ. 2011. Doxorubicin-loaded PEG-PCL copolymer micelles enhance cytotoxicity and intracellular accumulation of doxorubicin in adriamycin-resistant tumor cells. *Int J Nanomed* 6: 1955-1962.
- Discher BM, Won YY, Ege DS, Lee JCM, Bates FS, Discher DE, Hammer DA. 1999. Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers. *Science* 284: 1143-1146.
- Dolan MC, Dietrich G, Panella NA, Montenieri JA, Karchesy JJ. 2007. Biocidal activity of three wood essential oils against *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae), *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae), and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Econ Entomol* 100: 622-625.
- Dryden MW. 2009. Flea and tick control in the 21st century: challenges and opportunities. *Vet Dermatol* 20: 435-440.
- Dryden MW, Rust MK. 1994. The cat flea: biology, ecology and control. *Vet Parasitol* 52: 1-19.
- El-Gengaihi SE, Amer SAA, Mohamed SM. 1996. Biological activity of thyme oil and thymol against *Tetranychus urticae* Koch. *Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz* 96: 157-159.
- Feldmeier H, Kehr JD, Heukelbach J. 2006. A plant-based repellent protects against *Tunga penetrans* infestation and sand flea disease. *Acta Tropica* 99: 126-136.
- Frances SP. 2007. Efficacy and safety of repellents containing deet. pp 311-326. In: Debboun M, Frances SP, Strickman D (eds). *Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses*. CRC Press, Boca Raton.
- Galeotti N, Mannelli LDC, Mazzanti G, Bartolini A, Ghelardini C. 2002. Menthol: a natural analgesic compound. *Neurosci Lett* 322: 145-148.
- Gong CY, Wei XW, Wang XH, Wang YJ, Guo G, Mao YQ, Luo F, Qian ZY. 2010.

- Biodegradable self-assembled PEG-PCL-PEG micelles for hydrophobic honokiol delivery: I. preparation and characterization. *Nanotechnology* 21: 1-8.
- Govere JM, Durrheim DN. 2007. Techniques for evaluating repellents. pp 147-159. In: Debboun M, Frances SP, Strickman D (eds). *Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses*. CRC Press, Boca Raton.
- Guerrini VH, Kriticos CM. 1998. Effects of azadirachtin on *Ctenocephalides felis* in the dog and the cat. *Vet Parasitol* 74: 289-297.
- Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem* 46: 3590-3595.
- Howlett, FM. 1912. The effects of oil of citronella on two species of *Dacus*. *Trans R Entomol Soc London* 60: 412-418.
- Hu TW, Lin YT, Ho CK. 1985. Natural variation of chemical components of the leaf oil of *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. *Prod Res* 34: 11-17.
- Hussain AI. 2009. Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae. Ph.D. dissertation. University of Agriculture, Faisalabad.
- Islam MS, Hasan MM, Xiong W, Zhang SC, Lei CL. 2009. Fumigant and repellent activities of essential oil from *Coriandrum sativum* (L.) (Apiaceae) against red beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Pest Sci* 82: 171-177.
- Isman MB. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot* 19: 603-608.
- Isman MB. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol* 51: 45-66.
- Karina CG, Jesus OV, Elena ES. 2011. Repellent activity of essential oils and some of

their individual constituents against *Tribolium castaneum* Herbst. *J Agric Food Chem* 59: 1690-1696.

Lee BH, Lee SE, Annis PC, Pratt SJ, Park BS, Tumaalii F. 2002. Fumigant toxicity of essential oil and monoterpenes against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. *J Asia-Pacific Entomol* 5: 237-240.

Lima B, Lopez S, Luna L, Aguero MB, Aragon L, Tapia A, Zacchino S, Lopez ML, Zygaglo J, Feresin GE. 2011. Essential oils of medicinal plants from the central Andes of Argentina: chemical composition, and antifungal, antibacterial, and insect-repellent activities. *Chem Biodivers* 8: 924-936.

Lindsay LR, Surgeoner GA, Heal JD, Gallivan GJ. 1996. Evaluation of the efficacy of 3% citronella candles and 5% citronella incense for protection against field populations of *Aedes* mosquitoes. *J Am Mosquito Contr Assoc* 12: 293-294.

Liu ZL, Yu M, Li XM, Wan T, Chu SS. 2011. Repellent activity of eight essential oils of Chinese medicinal herbs to *Blattella germanica* L. *Rec Nat Prod* 5: 176-183.

Lu TC, Liao JC, Huang TH, Lin YC, Liu CY, Chiu YJ, Peng WH. 2011. Analgesic and anti-inflammatory activities of the methanol extract from *Pogostemon cablin*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2011, Article ID 671741, 9 pages. doi:10.1093/ecam/nep183.

McElroy KM, Blagburn BL, Breitschwerdt EB, Mead PS, McQuiston JH. 2010. Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. *Trends Parasitol* 26: 197-204.

Mehlhorn H, Schmahl G, Schmidt J. 2005. Extract of the seeds of the plant *Vitex agnus castus* proven to be highly efficacious as a repellent against ticks, fleas, mosquitoes and biting flies. *Parasitol Res* 95: 363-365.

Moore SJ, Debboun M. 2007. History of insect repellents. pp 3-29. In: Debboun M,

- Frances SP, Strickman D (eds). Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses. CRC Press, Boca Raton.
- Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. 2010. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour Technol* 101: 372-378.
- Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJP, Begin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int J Food Microbiol* 37: 155-162.
- Pandey SK, Upadhyay S, Tripathi AK. 2009. Insecticidal and repellent activities of thymol from the essential oil of *Trachyspermum ammi* (Linn) Sprague seeds against *Anopheles stephensi*. *Parasitol Res* 105: 507-512.
- Panella NA, Dolan MC, Karchesy JJ, Xiong Y, Peralta-Cruz J, Khasawneh M, Montenieri JA, Maupin GO. 2005. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. *J Med Entomol* 42: 352-358.
- Pavela R. 2011. Insecticidal and repellent activity of selected essential oils against the pollen beetle, *Meligethes aeneus* (Fabricius) adults. *Ind Crop Prod* 34: 888-892.
- Peterson C, Coats J. 2001. Insect repellents- past, present and future. *Pestic Outlook* 12: 154-158.
- Pohl AM, Rezende AR, Baldin ELL, Lopes NP, Neto VFA. 2011. Plant extracts, isolated phytochemicals, and plant-derived agents which are lethal to arthropod vectors of human tropical diseases – a review. *Planta Med* 77: 618-630.
- Rutledge LC, Lawson MA, Young LL. 1982. Tests of repellents against *Dlamanus montanus* (Siphonaptera: Ceratophyllidae). *J Med Entomol* 19: 361-365.
- Schreck CE, Fish D, McGovern TP. 1995. Activity of repellents applied to skin for protection against *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* ticks (Acari: Ixodidae). *Parasitology* 115: 111-117.

- Ixodidae). J Am Mosquito Contr Assoc 11: 136-140.
- Senthilkumar A, Venkatesalu V. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. Parasitol Res 107: 1275-1278.
- Shaaya E, Kostjukovski M, Eilberg J, Sukprakam C. 1997. Plant oils as fumigant and contact insecticides for the control of stored-product insects. J Stored Prod 33: 7-15.
- Soukand R, Kalle R, Svanberg I. 2010. Uninvited guests: traditional insect repellents in Estonia used against the clothes moth *Tineola bisselliella*, human flea *Pulex irritans* and bedbug *Cimex lectularius*. J Insect Sci 10: 1-18.
- Stefanazzi N, Stadler T, Ferrero A. 2011. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Pest Manag Sci 67: 639-646.
- Trumble JT. 2002. Caveat emptor: safety considerations for natural products used in arthropod control. Am Entomol 41: 7-13.
- [WHO] World Health Organization. 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of fleas to insecticides. WHO unpub, document, WHO/VBC/81.815.
- [WHO] World Health Organization. 1996. Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. WHO, Geneva. CTD/WHOPES/IC/96.1.
- Wu L, Wu Y, Guo Q, Li S, Zhou K, Zhang J. 2011. Comparison of genetic diversity in *Pogostemon cablin* from China revealed by RAPD, morphological and chemical analyses. J Med Plant Res 5: 4549-4559.
- Yang FL, Li XG, Zhu F, Lei CL. 2009. Structural characterization of nanoparticles

loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). J Agric Food Chem 57: 10156-10162.



捌、附錄

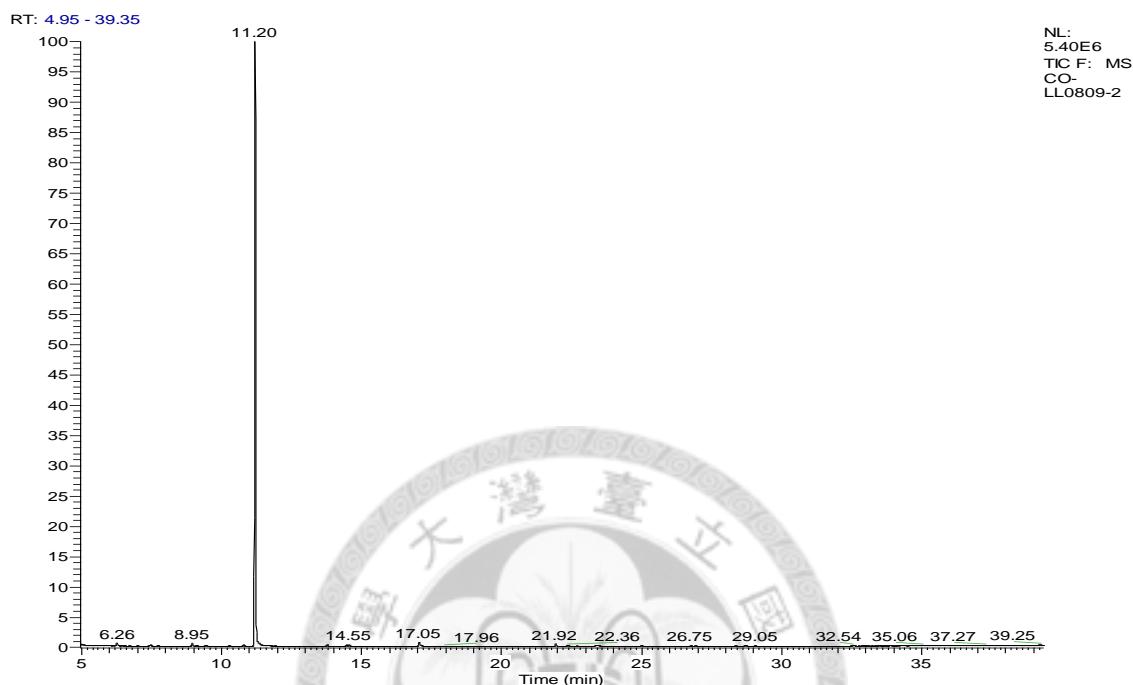
附錄一、每種精油植物之來源與萃取方法（資料來源：張上鎮教授）

植物物種	採集地點	採集日期	樹齡	前製
土肉桂	埔里大坪頂 (BP6)	2009/03	—	氣乾
<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	CO0709			
土肉桂	埔里大坪頂 (BP6)	2009/03	—	氣乾
<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	CO0618			
小葉樟	屏東縣仁武鄉	2010/07	—	無
<i>Cinnamomum brevipedunculatum</i>				
臺灣杉	臺大實驗林溪頭營 林區 2 林班觀音樹	2010/11	29 年生	打成碎片
<i>Taiwania cryptomerioides</i>	湖 70-1 造林地			
黑心柳杉	臺大實驗林溪頭營 林區 3 林班，地號 51-28	2005/02	43 年生	無
<i>Cryptomeria japonica</i>				
香杉 <i>Cunninghamia konishii</i>	臺大學實驗林內茅 埔營林區 21 林班	2007/11	—	打成碎片
南庄橙	臺中縣和平鄉初雲 山苗圃	2010/02	—	無
<i>Citrus taiwanica</i>				
過山香	花蓮縣吉安鄉	2009/08	4 年生	無
<i>Clausena excavata</i>				
橘柑	南投縣集集特有中 心園區	2010/09	—	無
<i>Citrus tachibana</i>				
白珠樹	南投縣仁愛鄉立鷹 山	2009/09	—	無
<i>Caultheria cumingiana</i>				

所有採集的植物皆以相同的傳統水蒸餾萃取法萃取精油，首先，將約 200 g 的植物組織，分別裝入圓底燒瓶，並加上 1000 mL 蒸餾水萃取精油，萃取時間 6 小時。

附錄二、植物精油之鑑定圖譜與化學成分 (資料來源：張上鎮教授)

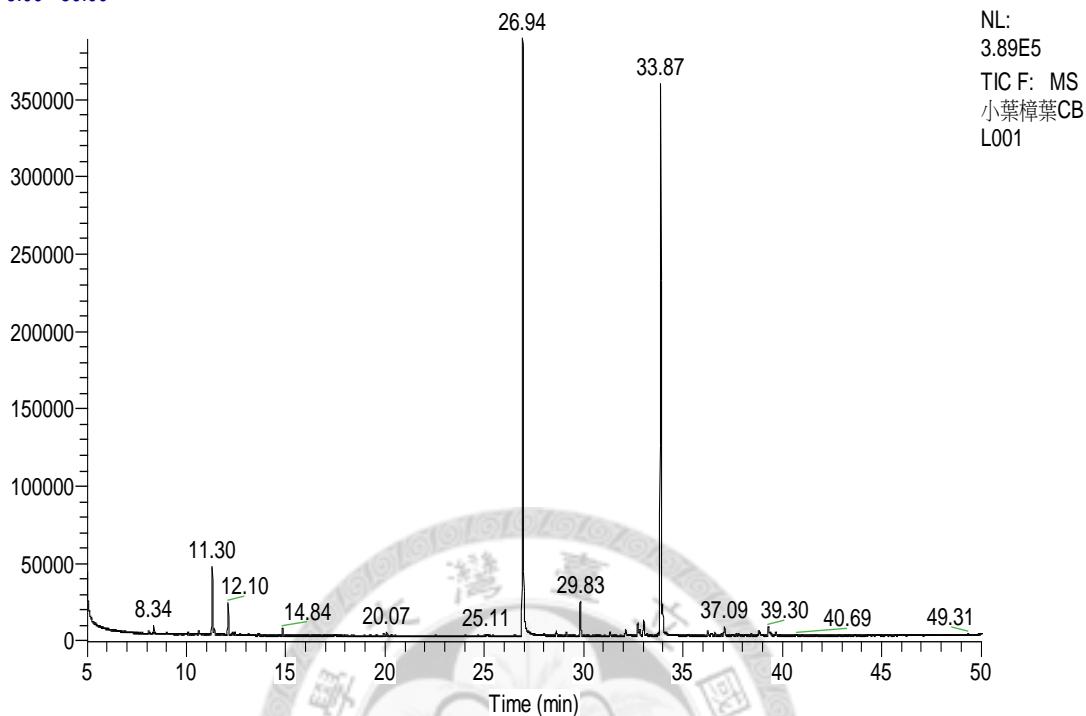
土肉桂葉 (伽櫟木醇型) 精油



RT	Compound	MF	MW	Area, %
6.26	α -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136	0.49
7.46	β -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136	0.15
8.95	Limonene	$C_{10}H_{16}$	136	0.44
9.43	Salicylaldehyde	$C_7H_6O_2$	122	0.14
10.26	cis-Linalool oxide	$C_{10}H_{18}O_2$	170	0.07
10.78	trans-Linalool oxide	$C_{10}H_{18}O_2$	170	0.21
11.2	Linalool	$C_{10}H_{18}O$	154	95.72
13.77	unknown			0.29
14.45	α -Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	154	0.22
14.55	4-Allylanisole	$C_{10}H_{12}O$	148	0.31
17.05	trans-Cinnamaldehyde	C_9H_8O	132	0.93
21.92	trans- β -Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	0.42
22.36	Coumarin	$C_9H_6O_2$	146	0.26
24.97	Cubebol	$C_{15}H_{26}O$	222	0.09
26.75	Spathulenol	$C_{15}H_{24}O$	220	0.15
26.9	Caryophyllene oxide	$C_{15}H_{24}O$	220	0.12

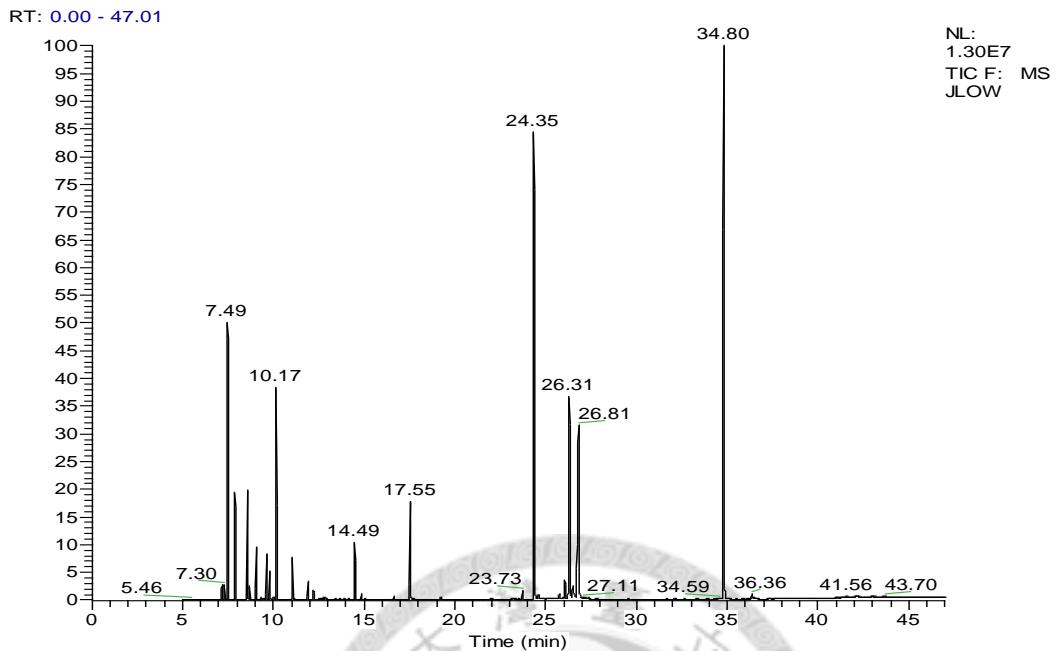
小葉樟葉子精油

RT: 5.00 - 50.00



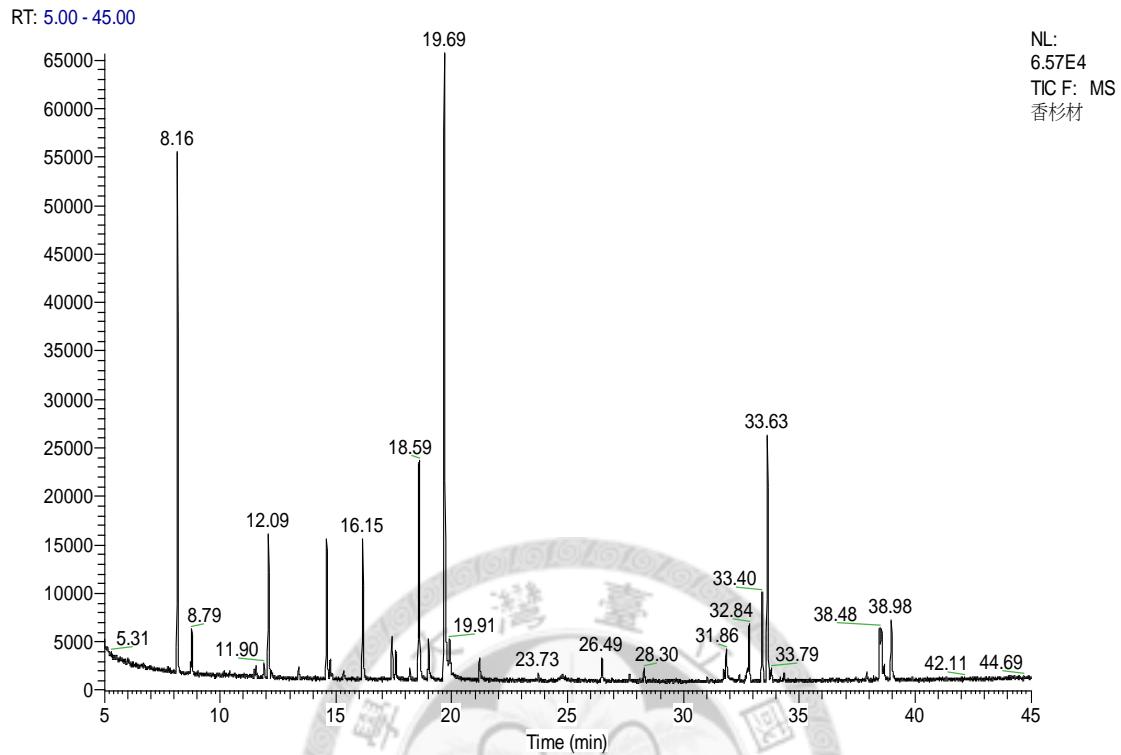
RT	Compounds	MF	MW	Area, %
8.34	α -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136	0.43
11.30	α -Phellandrene	$C_{10}H_{16}$	136	4.17
12.10	<i>p</i> -Cymene	$C_{10}H_{14}$	134	1.94
14.84	Terpinolene	$C_{10}H_{16}$	136	0.43
26.94	Eugenol	$C_{10}H_{12}O_2$	164	43.93
28.63	β -Elemene	$C_{15}H_{24}$	204	0.25
29.10	Methyl eugenol	$C_{11}H_{14}O_2$	178	0.21
29.83	<i>trans</i> - β -Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	2.73
31.33	α -Humulene	$C_{15}H_{24}$	204	0.27
33.02	β -Selinene	$C_{15}H_{24}$	204	1.25
33.87	Eugenol acetate	$C_{12}H_{14}O_3$	206	42.86
36.24	Spathulenol	$C_{15}H_{24}O$	220	0.27
38.80	T-Cadinol	$C_{15}H_{26}O$	222	0.37
39.30	α -Cadinol	$C_{15}H_{26}O$	222	0.89

柳杉葉子精油



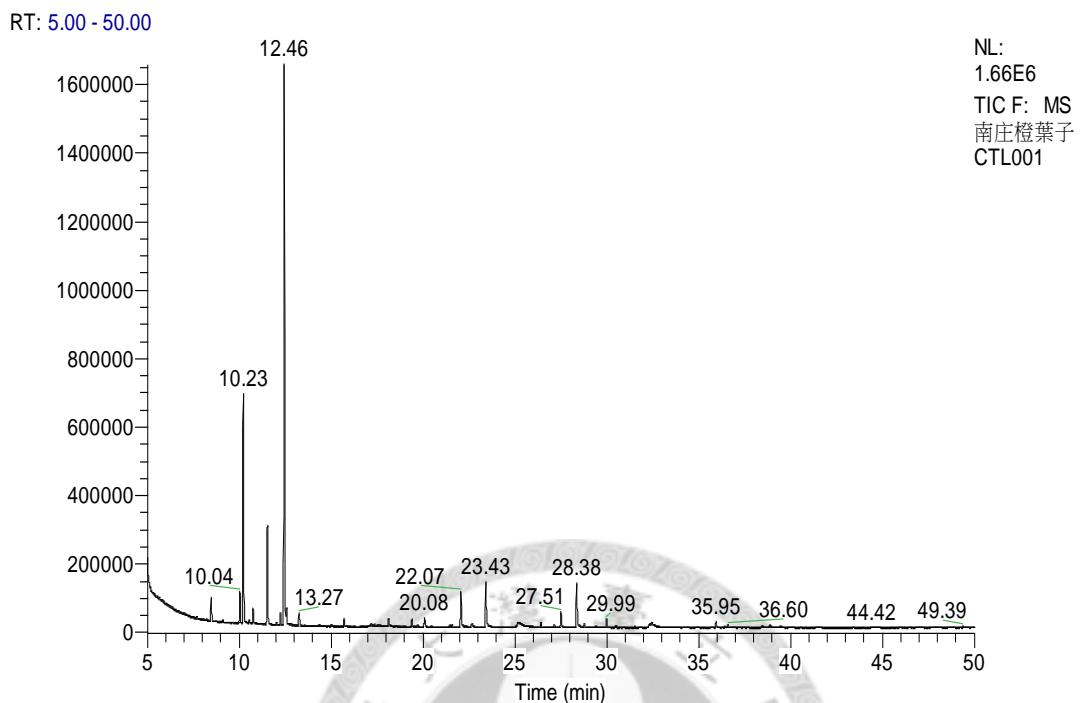
RT	Compounds	Area, %
7.30	α -Thujene	0.46
7.49	α -Pinene	8.54
7.90	Camphene	3.36
8.58	Sabinene	3.80
9.07	β -Myrcene	1.55
9.63	3-Carene	1.50
9.81	α -Terpinene	0.91
10.17	Limonene	6.81
11.04	γ -Terpinene	1.36
11.91	Terpinolene	0.62
12.21	Linalool	0.39
14.49	(-)-Terpinen-4-ol	2.01
14.86	α -Terpineol	0.23
17.55	Bornyl acetate	3.84
23.73	δ -Cadinene	0.41
24.35	β -Elemol	18.29
26.31	γ -Eudesmol	8.23
26.50	Cubenol	0.92
26.74	β -Eudesmol	4.84
26.81	α -Eudesmol	6.50
34.80	<i>ent</i> -Kaur-16-ene	23.29

香杉材部精油



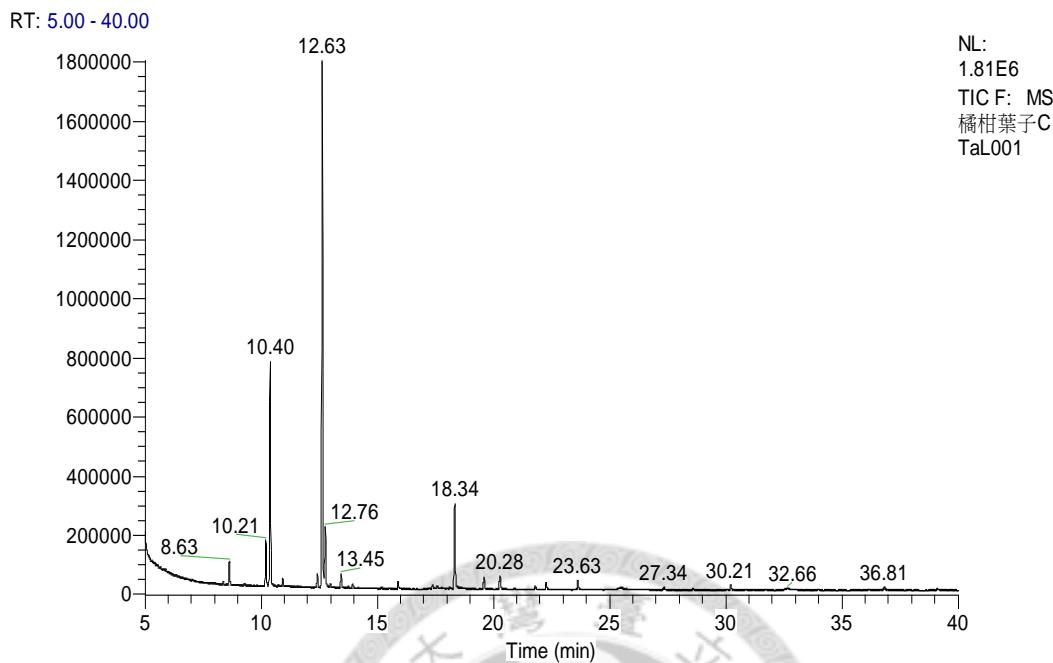
RT	Compounds	MW	MF	Area, %
8.16	α -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136	15.50
8.79	Camphene	$C_{10}H_{16}$	136	1.43
11.90	<i>p</i> -Cymene	$C_{10}H_{14}$	134	0.48
12.09	(+)-Limonene	$C_{10}H_{16}$	136	4.91
13.40	γ -Terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	0.42
14.60	Terpinolene	$C_{10}H_{16}$	136	4.93
15.34	Linalool	$C_{10}H_{16}$	136	0.35
16.15	endo-Fenchol	$C_{10}H_{18}O$	154	5.10
17.42	L-(-)-Camphor	$C_{10}H_{16}O$	152	1.49
18.59	Borneol	$C_{10}H_{18}O$	154	8.99
19.00	(-)-Terpinen-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	154	1.37
19.69	α -Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	154	26.89
21.21	Citronellol	$C_{10}H_{20}O$	156	0.84
26.49	α -Terpinyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	196	0.70
32.84	α -Muurolene	$C_{15}H_{24}$	204	2.28
33.40	Cuparene	$C_{15}H_{22}$	202	3.43
33.63	γ -Cadinene	$C_{15}H_{24}$	204	10.06
38.48	T-Cadinol	$C_{15}H_{26}O$	222	4.10
38.98	α -Cadinol	$C_{15}H_{26}O$	222	2.59

南庄橙葉子精油



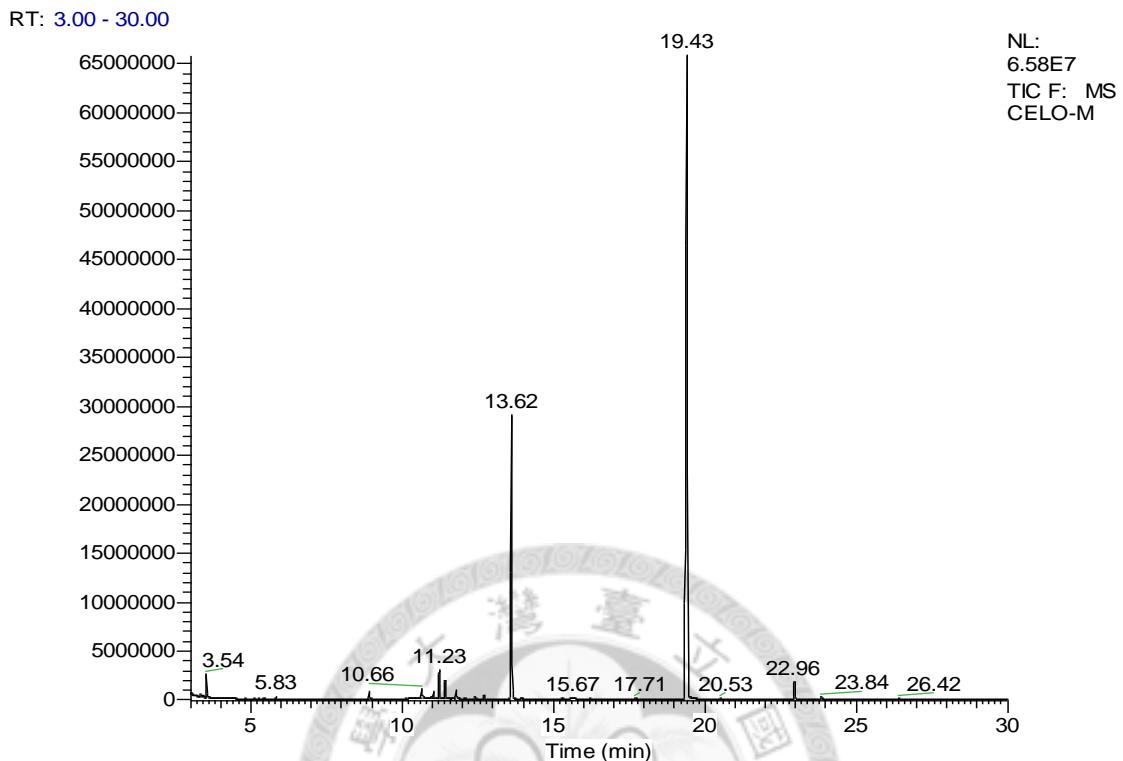
RT	Compounds	MF	MW	Area, %
8.48	α -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136	1.90
10.04	Sabinene	$C_{10}H_{16}$	136	2.62
10.23	β -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136	18.99
10.76	β -Myrcene	$C_{10}H_{16}$	136	1.15
11.54	3-Carene	$C_{10}H_{16}$	136	8.06
12.24	<i>p</i> -Cymene	$C_{10}H_{14}$	134	1.03
12.46	(-)-Limonene	$C_{10}H_{16}$	136	46.63
15.71	Linalool	$C_{10}H_{18}O$	154	0.60
18.14	L-Citronellal	$C_{10}H_{18}O$	154	0.69
19.40	(-)-Terpinen-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	154	0.75
20.08	α -Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	154	0.89
22.07	Z-Citral	$C_{10}H_{16}O$	152	3.51
22.66	Geraniol	$C_{10}H_{18}O$	154	0.36
23.43	<i>E</i> -Citral	$C_{10}H_{16}O$	152	4.52
26.42	δ -Elemene	$C_{15}H_{24}$	204	0.35
28.38	Geranyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	196	4.28
29.99	<i>trans</i> - β -Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	0.76
35.95	(-)-Nerolidol	$C_{15}H_{26}O$	222	0.52
36.60	Spathulenol	$C_{15}H_{26}O$	222	0.27

橘柑葉子



RT	Compounds	MF	MW	Area, %
8.63	α -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136	2.03
10.21	Sabinene	$C_{10}H_{16}$	136	4.22
10.40	β -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136	20.32
10.93	β -Myrcene	$C_{10}H_{16}$	136	0.75
12.43	<i>p</i> -Cymene	$C_{10}H_{14}$	134	1.15
12.63	(-)-Limonene	$C_{10}H_{16}$	136	47.51
12.76	1,8-Cineole	$C_{10}H_{18}O$	154	5.83
12.98	<i>cis</i> - β -Ocimene	$C_{10}H_{16}$	136	0.26
13.45	<i>trans</i> - β -Ocimene	$C_{10}H_{16}$	136	1.18
13.95	γ -Terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	0.4
15.90	Linalool	$C_{10}H_{18}O$	154	0.61
17.37	<i>cis</i> -Limonene oxide	$C_{10}H_{16}O$	152	0.37
18.34	L-Citronellal	$C_{10}H_{18}O$	154	8.67
19.60	Terpinen-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	154	1.21
20.28	α -Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	154	1.47
22.28	Z-Citral	$C_{10}H_{16}O$	152	0.71
23.63	<i>E</i> -Citral	$C_{10}H_{16}O$	152	0.91
27.34	Citronellyl acetate	$C_{12}H_{22}O_2$	198	0.25
30.21	<i>trans</i> - β -Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	0.55
36.81	Caryophyllene oxide	$C_{15}H_{24}O$	220	0.27

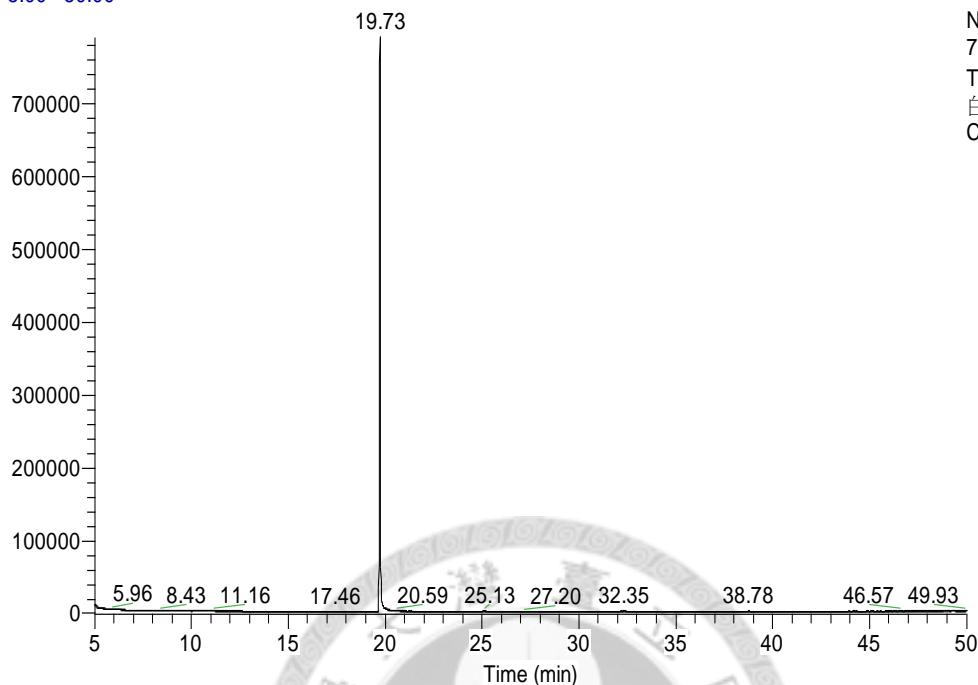
過山香葉子精油



RT	Compounds	MW	MF	Area, %
3.54	Unknown	-	-	0.94
8.92	α -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136	0.44
10.66	β -Myrcene	$C_{10}H_{16}$	136	0.64
11.04	α -Phellandrene	$C_{10}H_{16}$	136	0.63
11.23	3-Carene	$C_{10}H_{16}$	136	1.90
11.42	α -Terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	1.09
11.79	(+)-Limonene	$C_{10}H_{16}$	136	0.53
12.71	γ -Terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	0.26
13.62	Terpinolene	$C_{10}H_{16}$	136	19.73
19.43	Safrole	$C_{10}H_{10}O_2$	162	72.63
22.96	β -Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	1.21

白珠樹葉子精油

RT: 5.00 - 50.00



RT	Compound	MF	MW	%Area
19.73	Methyl salicylate	C ₈ H ₈ O ₃	152	100

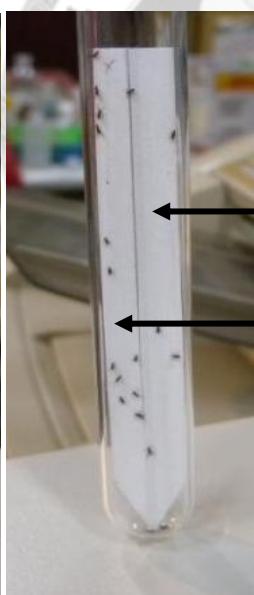
附錄三、跳蚤忌避劑簡易測試法的試驗圖



多支試管可立於試管架上進行觀察



無忌避效果



有忌避效果

