

迷迭香植物精油对白纹伊蚊的驱避作用 及其化学成分^{*}

李 黎^{1, 2} 范泉水¹ 邱 薇¹ 张富强¹ 冯子良¹ 王 杰¹

余 静^{1 **} 刘祥义^{3 **}

(1. 成都军区疾病预防控制中心博士后工作站 昆明 650032; 2. 成都军区昆明总医院 昆明 650032;
3. 西南林学院基础部 昆明 650224)

Repellent activities of essential oil from *Rosmarinus officinalis* on *Aedes albopictus* and its chemical constituents. LI Li^{1, 2}, FAN Quan-Shui¹, QIU Wei¹, ZHANG Fu-Qiang¹, FENG Zi-Liang¹, WANG Jie¹, YU Jing^{1 **}, LIU Xiang-Yi^{3 **} (1. Center for Disease Control and Prevention of Chengdu Command, Kunming 650032, China; 2. Kunming General Hospital of Chengdu Command, Kunming 650032, China; 3. Department of chemistry, Southwest Forestry College, Kunming 650224, China)

Abstract The effectiveness of essential oils from the stems and leaves of *Rosmarinus officinalis* L. as repellents of *Aedes albopictus* Skuse mosquito was assessed. Essential oils were extracted by steam distillation and supercritical CO₂ extraction from plants growing in Yunnan Province and their chemical constituents isolated and identified using GC/MS methods. The results show that essential oils extracted by supercritical CO₂ extraction were effective for sufficiently long (5.82 ± 1.13) h to meet the public health insecticide B-standard for repellents. The active chemicals were (+)-Limonene, D-(+)-camphor, Eucalyptol, (+)-4-Carene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-cyclohexene. Beta-pinene were the major constituent of the essential oils extracted by either method. The results show that *R. officinalis* has potential as a commercial source of mosquito repellent.

Key words *Rosmarinus officinalis*, essential oil, GC/MS, *Aedes albopictus*, repellence

摘 要 应用水蒸气蒸馏法和超临界二氧化碳萃取法提取生长于云南的迷迭香茎叶植物精油, 测试 2 种精油对白纹伊蚊 *Aedes albopictus* Skuse 的驱避作用, 并利用 GC/MS 联用仪分析 2 种精油的化学成分。结果表明: 超临界二氧化碳提取的迷迭香精油对白纹伊蚊的驱避时间是 (5.82 ± 1.13) h, 达到国标驱避剂评价的 B 级标准。2 种精油化学成分中都含有驱蚊活性物质: 柠檬烯、樟脑、Eucalyptol、(+)-4-Carene、1-methyl-4-(1-methylethylidene)-cyclohexene、Beta-pinene 等, 且驱蚊活性成分在挥发油中占有较高比例, 显示该植物精油在驱蚊方面有一定开发价值。

关键词 迷迭香, 精油, 气相色谱-质谱 (GC/MS), 白纹伊蚊, 驱避

白纹伊蚊 *Aedes albopictus* Skuse 是我国一种重要的医学媒介昆虫, 是登革热和基孔肯雅病的主要传播媒介, 感染实验表明还能传播乙脑病毒等多种虫媒病毒病^[1]。涂抹驱避剂是个人蚊虫防护的主要措施之一。目前市售的驱避剂主要成分是 DEET。但是, 近年来 DEET 不断被报道对人体有负作用、对环境有害^[2]。法国 Corbel 等^[3]最新研究成果表明, DEET 对昆虫和哺乳动物中枢神经系统酶的活性有抑制作

用, 且 DEET 与氨基甲酸盐类杀虫剂混用时, 毒性增强。由此迫切需要寻找和发现新的 DEET 替代物。近年来从植物中寻找驱蚊活性物质受到人们的广泛重视。我国植物资源丰富, 为寻

^{*} 资助项目: 国家博士后科研基金 (20080441272)。

^{**} 通讯作者, E-mail: yujing021112@yahoo.com.cn; Liuxy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-08-27, 修回日期: 2010-01-29

找植物源蚊虫驱避剂提供了良好的条件。

迷迭香 (*Rosmarinus officinalis* L.) 系唇形科 Labiatae 迷迭香属植物, 现有的研究表明: 该植物富含二萜酚类、黄酮类、三萜类和精油等, 其二萜酚类成分具有明显的抗氧化、抗肿瘤、抗艾滋病毒及微生物等活性^[5-6]。迷迭香精油广泛应用于化妆品和其他日用品。此外, 迷迭香精油还具有杀虫活性, Rutledge^[7]报道, 迷迭香精油对红蜘蛛、蚊子及其虫卵有强杀伤力。Veena 等^[8]报道生姜 (*Zingiber officinale*) 精油和迷迭香精油对 *Anopheles stephensi*, 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 有杀蚊卵作用。作者从云南玉溪迷迭香精油提炼厂工人和居民了解到, 生产期间工厂周围很少蚊虫侵扰, 显示迷迭香存在明显驱蚊活性。但是, 有关该植物挥发性成分对蚊虫的驱避作用方面的研究少见报道。本文采用水蒸气蒸馏和超临界 CO₂ 萃取方法, 提取了生长于云南的迷迭香茎、叶中的植物精油, 测试了 2 种方法提取的植物精油对白纹伊蚊的驱避活性, 并利用气相色谱/质谱 (GC/MS) 联用仪分析了 2 种迷迭香精油的化学成分, 比较并探讨了 2 种迷迭香精油的化学成分差异。

1 材料与方法

1.1 迷迭香精油提取

1.1.1 水蒸气蒸馏法提取精油 迷迭香采自云南省玉溪市, 自然干燥后取其茎和叶, 电动粉碎机粉碎。称取粉碎后的迷迭香茎、叶 200 g, 用水蒸气蒸馏 (共水蒸馏) 提取 5 h, 油水分离后, 用无水硫酸钠干燥, 得到淡黄色具有芳香气味的挥发油。

1.1.2 超临界二氧化碳萃取法提取精油 称取粉碎后的迷迭香茎、叶 200 g, 装入萃取釜中, 10 ~ 20 MPa 程序加压, 30 ~ 40℃ 程序升温, 萃取 2 h, 收集产物, 得到淡黄色具有芳香气味的挥发油。

1.2 2 种方法提取的迷迭香精油成分分析

HP6890/HP5973 GC/MS 气相色谱/质谱联用仪进行成分分析。气相色谱条件: 石英毛

细管柱 HP-FFAP (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)。程序升温: 从 45℃ 开始, 保持 5 min 以 4℃/min 升温至 150℃, 再以 6℃/min 升温至 250℃。载气为 He, 柱流量 110 mL/min, 进样口温度 250℃, 分流比 80:1。

质谱条件: 离子源 EI 源; 离子源温度 230℃; 电子能量 70 eV; 发射电流 34.6 μA; 倍增器电压 1 706 V; 接口温度 230℃; 溶剂延迟 3 min; 质量范围 40 ~ 500 amu (m/z), 进样量 1.0 μL。

化合物定性分析通过 NIST05 标准质谱图库, 并结合有关文献人工图谱^[9,10], 按峰面积和匹配度 2 个指标同时满足 0.1% 和 90 保留解析鉴定。

1.3 2 种方法提取的迷迭香精油对白纹伊蚊的驱避作用

参照中华人民共和国国家标准 GB/T 17322.10 - 1998 规定的测试方法进行。

1.3.1 测试蚊虫 白纹伊蚊江苏株 2009 年 4 月引自军事医学科学院微生物流行病学研究所媒介生物学与控制研究室。蚊虫在养虫室内常规养殖, 室内温度 26℃ ± 1℃, 相对湿度 55% ± 5%, 光照 L:D = 14:10。蚊虫羽化后供以 10% 葡萄糖水。测试蚊虫为羽化后 4 ~ 5 d 未吸血的雌蚊。

1.3.2 攻击力试验 3 名实验人员均戴上背面剪出 4 cm × 4 cm 大小窗口的一次性手套, 将手伸入装有 300 只蚊虫的蚊笼 (40 cm × 30 cm × 30 cm) 内 2 min, 前来停落的蚊虫多于 30 只者为攻击力合格, 此人及此笼蚊虫可用于驱避试验。

1.3.3 驱避试验 3 名攻击力合格的实验人员双手同样戴上上述手套, 其中一只手为空白对照, 另一只手在手背窗口处按 1.5 μL/cm² 的剂量均匀涂抹待测的迷迭香精油, 暴露涂抹了精油的皮肤, 严密遮蔽其余部分。涂抹精油后 2 h, 将手伸入放有攻击力合格蚊虫的蚊笼中 2 min, 观察有无蚊虫前来吸血, 以后每小时测试一次, 只要有 1 只蚊虫前来吸血即判作驱避失效。实验重复 3 次, 记录迷迭香精油的有效保护时间

(h)。实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果与分析

2.1 迷迭香精油的提取

用水蒸气蒸馏法提取 200 g 迷迭香茎、叶精油,获得精油 0.46 g,提取率为 0.23%;用超临界 CO₂ 萃取法提取 200 g 迷迭香茎、叶精油,得到 2.42 g,提取率为 1.2%。2 种方法得到的迷迭香精油均为淡黄色具有芳香气味。

2.2 迷迭香精油成分分析

采用 GC/MS 联用仪分析,得到迷迭香精油总离子流色谱图(图 1,2),峰面积相对含量分析是通过 HPMSD 化学工作站数据处理系统,按不校正的峰面积归一法进行,化合物定性分析结果见表 1 和表 2。

从水蒸气蒸馏法提取的精油中共检测出 491 个峰,超临界 CO₂ 萃取法提取的精油中共检测出 553 个峰,而峰面积和匹配度 2 个指标同时满足 0.1% 和 90 及其以上的检测出 24 个成分。其中水蒸气蒸馏法提取的精油被检测的成分有 18 个,已检测成分的总含量约占全油 42.01%;超临界 CO₂ 萃取法提取的精油被检测的成分有 19 个,已检测成分的总含量约占全

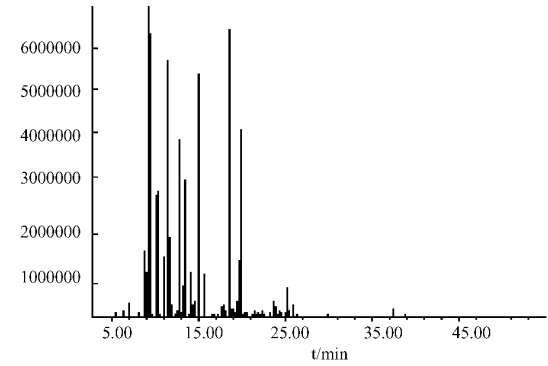


图1 水蒸气蒸馏法提取的迷迭香精油总离子流图

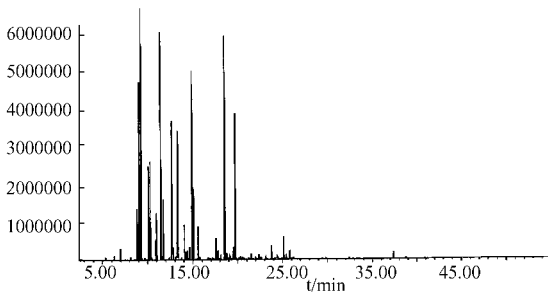


图2 超临界 CO₂ 萃取法提取的迷迭香精油总离子流图

油 35.38%。两者共有成分 13 个。水蒸气蒸馏法提取的精油中,质量分数较高的有 1-甲基-

表 1 水蒸气蒸馏法提取的迷迭香精油化学成分及其相对百分含量

峰号	保留时间 (min)	分子量	分子式	化学成分	百分含量 (%)
85	6.29	136.23	C ₁₀ H ₁₆	1,7,7-Trimethyltricyclo [2.2.1.0,2,6] heptane	0.14
94	6.94	136.23	C ₁₀ H ₁₆	7,7-dimethyl-2-methyleneBicyclo [2.2.1] heptane	0.19
95	6.98	136.23	C ₁₀ H ₁₆	Camphene	0.35
111	8.12	136.23	C ₁₀ H ₁₆	Beta-pinene	0.12
123	8.86	136.23	C ₁₀ H ₁₆	(+)-4-Carene	1.71
124	8.96	122.16	C ₈ H ₁₀ O	1-Methoxy-4-methylbenzene	0.15
125	9.11	134.22	C ₁₀ H ₁₄	1-methyl-4-(1-methylethyl)-Benzene	6.84
126	9.23	136.23	C ₁₀ H ₁₆	(+)-Limonene	0.39
127	9.33	154.25	C ₁₀ H ₁₈ O	Eucalyptol	10.93
133	10.11	136.23	C ₁₀ H ₁₆	1-methyl-4-(1-methylethyl)-1,4-cyclohexadiene	2.92
141	10.91	136.23	C ₁₀ H ₁₆	1-methyl-4-(1-methylethyl)-1,3-cyclohexadiene	0.63
142	10.99	136.23	C ₁₀ H ₁₆	1-methyl-4-(1-methylethylidene)-cyclohexene	1.61
145	11.50	154.25	C ₁₀ H ₁₈ O	Isoborneol	9.51
157	12.72	152.23	C ₁₀ H ₁₆ O	D-(+)-camphor	5.51
174	14.65	150.22	C ₁₀ H ₁₄ O	4,6,6-Trimethylbicyclo [3.1.1] hept-3-en-2-one	0.47
184	15.76	152.23	C ₁₀ H ₁₆ O	5-Isopropyl-2-methyl-2-cyclohexen-1-one	0.16
243	22.00	204.35	C ₁₅ H ₂₄	Beta-Maaliene	0.14
246	22.33	186.23	C ₈ H ₁₀ O ₃ S	4-methylbenzenesulfonate methyl ester	0.24

4-(1-异丙基)-苯 (6.84%)、桉叶油素 (10.93%)、异龙脑 (9.51%)、D-(+)-樟脑 (5.51%)。超临界 CO₂ 萃取法提取的精油中,质量分数较高的有 1-甲基-4-(1-异丙基)-苯 (6.19%)、桉叶油素 (13.85%)、D-(+)-樟脑 (5.68%)。2 种提取法得到的迷迭香精油有

1,7,7-三甲基三环 [2.2.1.0,2,6] 庚烷等 13 种成分完全一致,占水蒸气蒸馏提取得到的精油成分的 29.88%,占超临界 CO₂ 萃取得到的精油成分的 31.90%。此外,同分异构体的成分有 1-甲基-4-(1-异丙基)-1,4-环己二烯与 1-甲基-4-(1-异丙基)-1,3-环己二烯。

表 2 超临界 CO₂ 萃取法提取的精油成分及其相对百分含量

峰号	保留时间 (min)	分子量	分子式	化学成分	百分含量 (%)
66	6.29	136.23	C ₁₀ H ₁₆	1,7,7-Trimethyltricyclo [2.2.1.0,2,6] heptane	0.13
72	6.94	136.23	C ₁₀ H ₁₆	7,7-dimethyl-2-methyleneBicyclo [2.2.1] heptane	0.19
73	6.98	136.23	C ₁₀ H ₁₆	Camphene	0.33
93	8.86	136.23	C ₁₀ H ₁₆	1-methyl-4-(1-methylethyl)-1,3-cyclohexadiene	2.03
94	8.96	122.16	C ₈ H ₁₀ O	1-methoxy-4-methylbenzene	0.15
95	9.11	134.22	C ₁₀ H ₁₄	1-methyl-4-(1-methylethyl)-Benzene	6.19
96	9.23	136.23	C ₁₀ H ₁₆	(+)-Limonene	0.31
97	9.33	154.25	C ₁₀ H ₁₈ O	Eucalyptol	13.85
103	10.11	136.23	C ₁₀ H ₁₆	1-methyl-4-(1-methylethyl)-1,4-cyclohexadiene	2.30
111	10.91	136.23	C ₁₀ H ₁₆	(+)-4-Carene	0.54
112	10.99	136.23	C ₁₀ H ₁₆	1-methyl-4-(1-methylethylidene)-cyclohexene	1.54
126	12.38	154.25	C ₁₀ H ₁₈ O	4-Isopropyl-1-methyl-3-cyclohexen-1-ol	0.10
128	12.71	152.23	C ₁₀ H ₁₆ O	D-(+)-camphor	5.68
145	14.65	150.22	C ₁₀ H ₁₄ O	4,6,6-Trimethylbicyclo [3.1.1] hept-3-en-2-one	0.74
154	15.75	152.23	C ₁₀ H ₁₆ O	5-Isopropyl-2-methylene-cyclohexanone	0.55
195	20.15	204.35	C ₁₅ H ₂₄	(-)-α-gurjunene	0.14
207	21.51	204.35	C ₁₅ H ₂₄	α-Neo-clovene	0.23
211	22.00	204.35	C ₁₅ H ₂₄	Beta-Maaliene	0.12
214	22.33	186.23	C ₈ H ₁₀ O ₃ S	4-methylbenzenesulfonate methyl ester	0.26

2.3 迷迭香精油对白纹伊蚊的驱避作用

测试者涂抹水蒸气蒸馏法提取的迷迭香精油后进行对白纹伊蚊的有效保护时间测试,结果对白纹伊蚊的有效保护时间是 (3.67 ± 0.58) h,小于国标驱避剂评价的最低 B 级标准;用超临界 CO₂ 萃取法提取的迷迭香精油对白纹伊蚊的有效保护时间是 (5.82 ± 1.13) h,其防护效果达到国标驱避剂评价的 B 级标准 (≥4 h)。因此,水蒸气蒸馏法提取的迷迭香精油不适宜直接用做皮肤涂抹驱避剂,超临界 CO₂ 萃取法提取的迷迭香精油驱避效果达到国标 B 级标准,可用作皮肤涂抹驱避剂。

3 讨论

Gillij 等^[1]曾经证实迷迭香挥发性成分对埃及伊蚊有明显驱避活性,通过与驱蚊植物

(*Aloysia citriodora*) 精油化学成分对比分析,认为柠檬烯和樟脑可能是主要驱避活性成分。本实验进一步证实,云南产迷迭香挥发性成分也有明显驱蚊活性,并含有柠檬烯和樟脑这 2 种与驱蚊活性有关的化学成分。此外,本研究还发现,云南产迷迭香还含有 Eucalyptol、(+)-4-Carene、1-methyl-4-(1-methylethylidene)-cyclohexene、Beta-pinene 等物质,这些物质在过去的研究中都报道有驱蚊活性^[12-17],它们与柠檬烯和樟脑一同构成迷迭香的驱蚊成分。在这些驱蚊成分中,樟脑和桉叶油素含量较高,成为驱蚊的主要成分。

2 种挥发性成分提取方法获得的驱避活性成分种类一致,水蒸气蒸馏获得驱蚊活性成分相对百分含量之和为 20.27%,CO₂ 超临界萃取获得的驱蚊活性成分相对百分含量为

21. 92% ,驱蚊活性成分在挥发油中占有较高比例,显示该植物精油在驱蚊方面有一定开发价值。

2 种提取方法获得挥发油驱蚊效果存在差异,可能与驱蚊活性成分比例和含量有关,如果在现有研究基础上,能将迷迭香中具有驱蚊活性物质按照不同比例组合可能会获得更好驱避效果。当然深入研究其他挥发性成分对蚊虫的驱避效果,发现更多驱避活性物质也是今后研究重要内容之一。迷迭香是一种重要的抗氧化、抗菌植物,其精油成分挥发性强,用作蚊虫驱避剂,其有效保护时间不长,今后如果能在挥发性成分中加入其他化合物形成缓释制剂,可以延长有效保护时间。

参 考 文 献

- 1 张海林,米竹青,张云智. 云南白纹伊蚊感染、传播登革和乙型肝炎病毒的研究. 中国媒介生物及控制杂志, 1997, 8(1): 50 ~ 53.
- 2 Qiu H. C., Jon H. W., McCall J. W. Pharmacokinetics, formulation and safety of insect repellent N, N - diethyl - 3 - methylbenzamide (DEET): J. Am. Mosq. Control Assoc., 1998, 14(1): 12 ~ 27.
- 3 Corbel V., Stankiewicz M., Pennetier C., et al. Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent DEET. BMC Biology, 2009, 7: 47.
- 4 Ganeva Y. E., Tsankova. Phytochemical study of *Rosmarinus officinalis* L. Dokladi na "B" Igarskata Akademiya na Naukite. 1993, 46(12): 53 ~ 55.
- 5 曹树稳,余燕影,温辉梁. 迷迭香提取物的抗乳腺癌活性研究. 营养学报, 2001, 23(3): 225 ~ 229.
- 6 陈伟贤,陈鸿雁,张义平,等. 迷迭香提取物抑菌活性研究. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(5): 406 ~ 407.
- 7 Rutledge L. C. Some corrections to the record on insect repellents and attractants. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1988, 4(4): 414 ~ 425.
- 8 Veena P., Tripathi A. K., Aggarwal K. K., et al. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Bioresour Technol., 2005, 96(16): 1 749 ~ 1 757.
- 9 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册. 北京:北京人民卫生出版社, 2004, 1 586 ~ 1 588.
- 10 郭玫,贡济宇,邹海舰,等. 中药成分分析. 北京:中国中医药出版社, 2006. 23.
- 11 Gillij Y. G., Gleiser R. M., Zygodlo J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. Bioresour Technol., 2008, 99(7): 2 507 ~ 2 515.
- 12 Michaelakis A., Papachristos D., Kimbaris A., et al. Citrus essential oils and four enantiomeric pinenes against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Parasitol. Res., 2009, 105(3): 769 ~ 773.
- 13 Lucia A., Licastro S., Zerba E., et al. Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of *Eucalyptus* essential oils. Bioresour Technol., 2009, 100(23): 6 083 ~ 6 087.
- 14 Choochote W., Chaithong U., Kamsuk K., et al. Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. Fitoterapia, 2007, 78(5): 359 ~ 364.
- 15 Traboulsi A. F., El-Haj S., Tueni M., et al. Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). Pest Manag. Sci., 2005, 61(6): 597 ~ 604.
- 16 Gkinis G., Tzakou O., Iliopoulou D. et al. Chemical composition and biological activity of *Nepeta parnassica* oils and isolated nepetalactones. Z. Naturforsch C., 2003, 58(9 ~ 10): 681 ~ 686.
- 17 Lampman R., Eckenbach U., Seigler D., et al. Laboratory evaluations of methylated soy oil and monoterpenes as mosquito larvicides. J. Am. Mosq. Control Assoc., 2000, 16(2): 153 ~ 157.