

猫薄荷精油有效成分的提取及其对白纹伊蚊、淡色库蚊的驱避活性

郝蕙玲^{1,2}, 邓晓军¹, 杜家纬¹

(1. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032; 2. 海军医学研究所, 上海 200433)

摘要: 采用同时蒸馏萃取及硅胶柱层析法从猫薄荷 *Nepeta cataria* 植物中提取、分离制得驱蚊有效成分假荆芥内酯, 并采用个体涂肤有效保护时间测定法及风洞空间驱避效果测试法, 对假荆芥内酯与避蚊胺 (DEET) 的驱蚊效果进行了对比试验。结果表明 400 g 新鲜猫薄荷植株可制得精油 5.6 g, 其中假荆芥内酯含量为 55%, *Z*, *E*-假荆芥内酯 32%, *E*, *Z*-假荆芥内酯 23%。室内标准药效评价结果表明, DEET 对白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 及淡色库蚊 *Culex pipien pallens* 有效保护时间分别为 9.6 ± 0.2 h 与 11.5 ± 1.5 h, 而假荆芥内酯仅为 2.2 ± 0.2 h 与 4.3 ± 0.8 h。风洞定向行为测试结果表明, 假荆芥内酯单独作用时, 对蚊虫有微弱的引诱效果, 但在人体气味及二氯甲烷 L-乳酸存在时, 可显著抑制这些引诱物对蚊虫的引诱效果, 是优良的空间驱避剂; DEET 对蚊虫无明显的引诱作用, 对二氯甲烷 L-乳酸溶液引诱剂也无明显的抑制效果, 但可显著增强人体气味对蚊虫的引诱性。

关键词: 猫薄荷; 假荆芥内酯; 避蚊胺; 蚊虫; 驱避活性

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)03-0533-05

Extraction of catnip essential oil components and their repellent activity against *Aedes albopictus* and *Culex pipien pallens*

HAO Hui-Ling^{1,2}, DENG Xiao-Jun¹, DU Jia-Wei¹ (1. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 2. Naval Medical Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract: Nepetalactone, the primary component of catnip oil, were extracted by the using method of simultaneous distillation-extraction and separated by using silica gel chromatography column. To compare the repellency of nepetalactone and DEET on mosquitoes, topical bioassay method on the skin and a cage olfactometer were employed to assess the effective protection time and the spatial repellency. The results showed that essential oil of catnip was comprised of 55% nepetalactone, with the constitution of 32% *Z*, *E*-nepetalactone and 23% *E*, *Z*-nepetalactone. Evaluated by using laboratory efficacy criterions and bioassay method of public health insecticides for pesticide registration, the results showed that the protection time for DEET and nepetalactone against *Aedes albopictus* was 9.6 ± 0.2 h, and 2.2 ± 0.2 h respectively, and against *Culex pipien pallens* was 11.5 ± 1.5 h and 4.3 ± 0.8 h respectively. When used alone, nepetalactone attracted mosquitoes to the trap of the olfactometer, however, when mixed with human odor or a L-lactic acid dichloromethane solution, nepetalactone inhibited the attractiveness obviously. Nepetalactone exhibited a spatial repellency, but was not an ideal topical repellent. DEET did not have the attractiveness to mosquitoes, and did not exhibit inhibition on L-lactic acid dichloromethane solution too, but enhanced the attractivity of human odor to mosquitoes.

Key words: Catnip; nepetalactone; DEET; mosquitoes; repellent activity

自 1954 年报道避蚊胺 (N, N-diethyl-3-methylbenzamide, DEET) 具驱蚊活性以来, 一直作为最

有效的驱避剂被广泛应用。然而, 多年来有关其毒性及安全性方面的研究一直受到人们的重视 (Gyrboski

et al., 1961; Miller, 1982; Sinha *et al.*, 2004), 世界各国都在加强寻找更为安全、有效的驱避剂。人们对数千种植物及人工合成化合物进行了广泛的研究, 但一直没有发现优于 DEET 的替代物。Peterson (2001) 研究发现一种存在于猫薄荷 *Nepeta cataria* 中的有效成分假荆芥内酯 (nepetalactone) 具有极高的驱蚊活性, 其驱蚊活性是 DEET 的 10 倍。其后的研究表明, 假荆芥内酯有 2 种异构体, 即 *Z*, *E*-和 *E*, *Z*-异构体; *E*, *Z*-异构体是主要的活性物质, 对蚊、蟑螂、白蚁均具驱避效果 (Peterson, 2001; Peterson *et al.*, 2002; Peterson and Ems-Wilson, 2003)。

猫薄荷为唇形科荆芥属多年生直立草本植物, 又名香薷、小荆芥、假苏, 全株有香气, 可药用, 在中国盛行用来沏茶, 叶和开花枝端能治疗感冒、反胃、降温、头痛及头皮痒。此外, 它还是一种猫类兴奋剂, 被开发成宠物玩具用品。在我国, 该植物在新疆、甘肃、陕西、山西、河北、山东至四川、云南等省区均有分布, 但有关其作为驱避剂的功用尚未得到很好地开发利用。为此, 我们对猫薄荷精油的制备及假荆芥内酯的分离纯化及其驱蚊活性进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 供试植物及昆虫

猫薄荷购自上海农业科技种子有限公司, 在自然条件下种植并扦插繁殖, 收获根以上部分并以蒸馏水冲洗干净后晾干备用。

白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 和淡色库蚊 *Culex pipien pallens* 均为上海品系, 饲养温度 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 5\%$, 光周期 14L:10D, 成虫供以 6% 葡萄糖水溶液。选用 5~8 天未吸血雌虫供试。

1.2 主要供试药品及仪器

DEET (95.4%) 为江苏省丹阳市华盛化工有限公司产品, L-乳酸 (>99%) 购自 Sigma 公司, 二氯甲烷 (>99.5%) 购自上海化学试剂有限公司, 假荆芥内酯标样由美国爱荷华州立大学昆虫系 Jun-wei Zhu 博士提供。

安捷伦 6890/5793GC-MSD 气相色谱-质谱仪, 惠普 5980GC-FID 气相色谱仪。

1.3 方法

1.3.1 猫薄荷精油的制备及假荆芥内酯的分离和纯化: 采用 Seidel 和 Lindner (1993) 设计的蒸馏萃取装置, 把经预处理过的猫薄荷植株粉碎, 置于 1 L 烧瓶中加入 350 mL 蒸馏水, 溶剂瓶内加 20 mL 乙醚,

同时蒸馏萃取 2 h, 萃取液加无水 Na_2SO_4 1 g 干燥过夜, 冰浴下氮吹浓缩至 2 mL, 得到的精油粗制品采用硅胶柱层析 (100~200 目) 纯化, 洗脱溶剂体系为正己烷:丙酮:乙醇 = 40:10:3, 收集溜出液, 氮吹浓缩后进行色谱分析, 得到含量为 85% 的假荆芥内酯样品以供生物测试用。

1.3.2 猫薄荷精油组分测定: GC-MS 为 Agilent 6890N/5973, 采用 HP5-MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) 石英毛细管柱。升温程序为: 柱温 60°C 保持 1 min, $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 程序升温至 240°C 保持 10 min; 进样口温度 250°C 。高纯氦气作为载气, 流量 1 mL/min。离子源为 EI, 电离电压为 70 eV, 离子源温度 260°C ; 扫描质荷比范围: 30~550 amu (m/z)。分析结果采用 Wiley library 第 7 版图谱库检索结合标准品质谱图进行定性。

1.3.3 有效保护时间测试: 个体涂肤有效保护时间试验参照 GB/T 17322.10-1998 方法进行, 在 3 名试验者双手背上画出 5 cm \times 5 cm 的皮肤面积, 其余部分严密遮蔽, 将手伸入放有 300 只试蚊的蚊笼内 2 min, 前来停落的试虫多于 30 只者为攻击力合格, 此人及此蚊笼可用于驱避试验。试验时一只手为空白对照, 另一只按 $1.5 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ 均匀涂抹药品, 自然风干 15 min 后将手伸入蚊笼内 2 min 测试, 每隔 30 min 测试一次, 只要有一只蚊虫前来吸血即判定失效。

1.3.4 空间驱避效果测试: 参照 Posey 等 (1998) 方法自行制作风洞装置 (图 1), 在测试室中放入试虫 25 只, 适应 30 min 开始测试, 样品经由活性炭过滤的空气流带入测试室, 风速为 0.2 m/s, 测试室的另一端装有 18 W 的排风扇将气流即时排出, 观察 8 min 内飞入陷笼内的试虫数。在引诱效果实验中, 将待测物 10 μL 滴于滤纸上, 送入测试臂口处, 另一测试臂设置为空白对照。在抑制效果实验中, 2 个测试臂内均放置由玻璃瓶盖盖载的 300 μL 1% 的二氯甲烷 L-乳酸溶液为引诱剂, 其中一只臂同时放置 10 μL 被测物, 另一测试臂为空白对照。在每组试验中 2 只臂更替交换进行, 并设人体气味引诱 (攻击力合格者把手放在臂口处) 平行试验。生物测试室温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 5\%$ 。每次试验后清洗整个装置保持测试室清洁, 并进行空白试验, 以 8 min 内飞入陷笼内的试虫数不大于 1 只为标准。

1.4 数据处理

用配对样本 *T* 检验来分析不同驱避物的有效保护时间及空间驱避效果的抑制试验, 用 One-Way ANOVA 的 Duncan 检验来分析不同处理组的引诱效

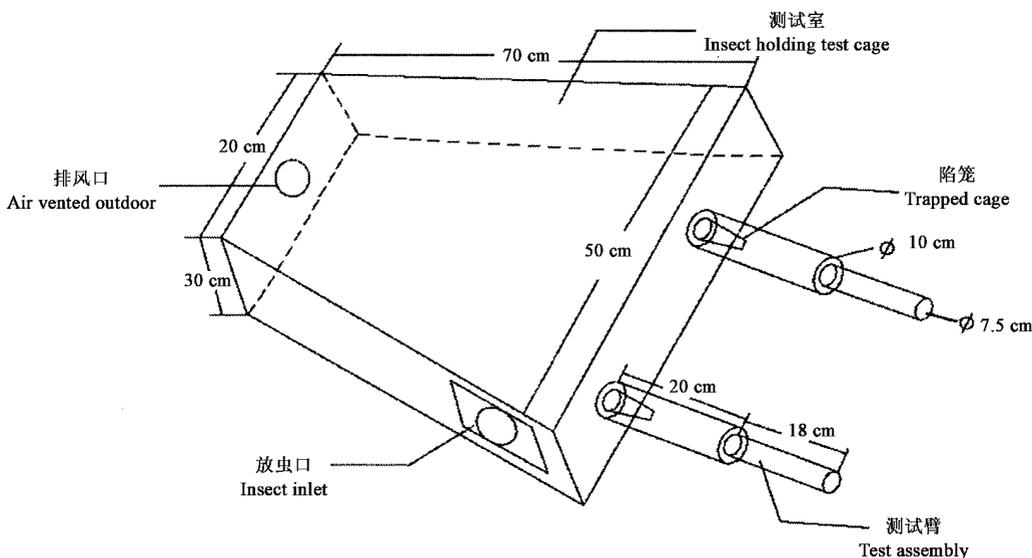


图 1 风洞装置示意图

Fig. 1 Schematic structure of olfactometer

果试验 (SPSS11.0)。

2 结果

2.1 猫薄荷精油有效成分的测定

本研究以乙醚作为萃取剂从 400 g 新鲜的猫薄荷植株得到精油 5.6 g, 从精油中共分离出 61 种化合物, 假荆芥内酯含量为 55%, 其中 *Z*, *E*-假荆芥内

酯(保留时间 13.10 min)含量 32%, *E*, *Z*-假荆芥内酯含量 23%(保留时间 13.15 min); 其他主要成分及含量分别为: 吉马烯-D (7.12%), 反式石竹烯 (3.25%), 反式 β -法尼醇 (1.77%), β -蒎烯 (1.27%), β -榄烯 (1.15%) (图 2)。

2.2 驱避性试验

2.2.1 有效保护时间: 参照农药登记卫生用杀虫

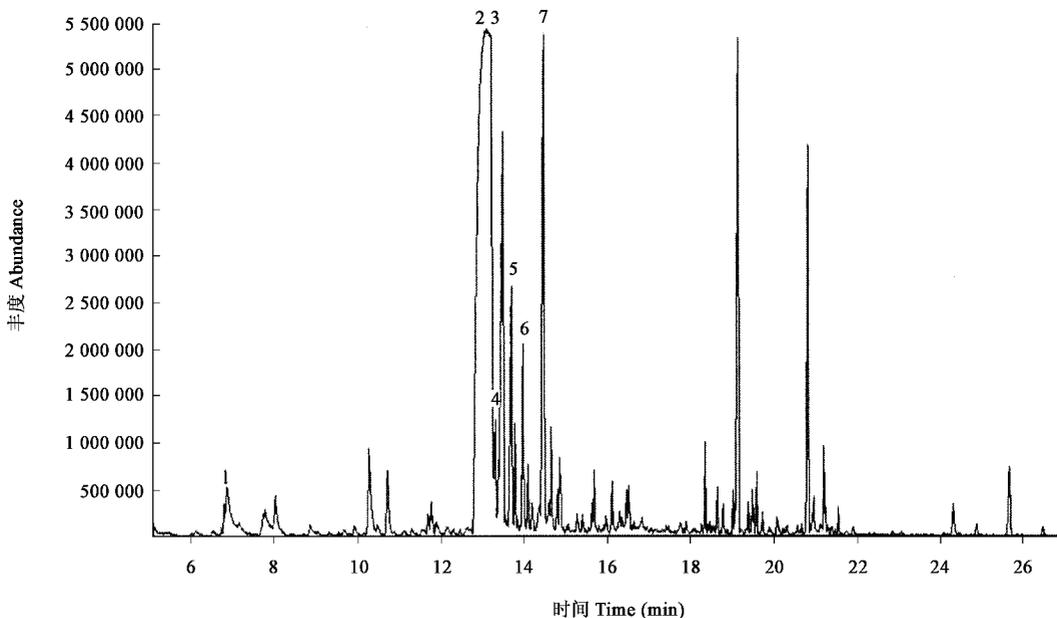


图 2 猫薄荷精油总离子峰谱图

Fig. 2 Total ion current chromatogram of essential oil of catnip

1. β -蒎烯 (β -pinene); 2. *Z*, *E*-假荆芥内酯 (*Z*, *E*-nepetalactone); 3. *E*, *Z*-假荆芥内酯 (*E*, *Z*-nepetalactone); 4. β -榄烯 (β -elemene); 5. 反式石竹烯 (*trans*-caryophyllene); 6. 反式 β -法尼醇 (*trans*- β -farnesene); 7. 吉马烯-D (*germacrene*-D); 其他为次要成分 (Other secondary components)。

剂的室内药效评价方法,3名受试者以药物涂抹皮肤,测试结果(表1)表明:DEET处理组对白纹伊蚊及淡色库蚊的有效保护时间分别为 9.6 ± 0.2 h与 11.5 ± 1.5 h,而假荆芥内酯处理组有效保护时间仅为 2.2 ± 0.2 h与 4.3 ± 0.8 h。本研究结果表明,作

为涂抹剂驱避蚊虫,DEET的性能远优于假荆芥内酯,而根据国家农药登记卫生用杀虫剂室内药效评价标准,其驱避剂室内驱蚊合格有效保护时间为 ≥ 4 h,因此,假荆芥内酯不适合作为皮肤涂抹剂来驱避蚊虫。

表1 DEET与假荆芥内酯人体涂肤有效保护时间
Table 1 Protection time of DEET and nepetalactone by topical bioassay

试虫 Tested colonies	试验次数 Number of tests	有效保护时间 Protection time (h $\bar{x} \pm SE$)		T 检验 T test	
		避蚊胺 DEET	假荆芥内酯 Nepetalactone	t	P
白纹伊蚊 <i>Aedes albopictus</i>	6	9.6 ± 0.2	2.2 ± 0.2	29.05	< 0.001
淡色库蚊 <i>Culex pipien pallens</i>	6	11.5 ± 1.5	4.3 ± 0.8	26.34	< 0.001

2.2.2 空间驱避效果试验:为了测试驱避物的空间驱避效果,我们首先对人体气味、二氯甲烷 L-乳酸引诱剂及 DEET 与假荆芥内酯对蚊虫的嗅觉行为反应进行了测试。结果表明,两种试蚊对人体气味和二氯甲烷 L-乳酸引诱剂均有明显的定向行为反

应,其中二氯甲烷 L-乳酸溶液对蚊虫引诱性显著高于人体气味(表2)。同时,假荆芥内酯也表现出一定的引诱性能,而试蚊对 DEET 没有发生任何定向行为反应。

表2 不同处理对白纹伊蚊与淡色库蚊的引诱效果
Table 2 The attractiveness of treatments to *Aedes albopictus* and *Culex pipien pallens*

处理 Treatment	试验次数 Number of tests	平均诱捕率 Mean trappability (%) ($\pm SE$)	
		白纹伊蚊 <i>A. albopictus</i>	淡色库蚊 <i>C. pipien pallens</i>
人体气味 Human scent	4	31.2 ± 2.6 b	24.0 ± 6.5 b
避蚊胺 DEET	4	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 d
假荆芥内酯 Nepetalactone	4	12.2 ± 2.5 c	10.5 ± 1.3 c
二氯甲烷 L-乳酸 Dichloromethane L-lactic acid	4	44.6 ± 4.6 a	42.1 ± 7.4 a

同列数据后相同的字母代表诱捕率在 0.05 水平上无显著性差异。

Data in the same column followed by the different letters are significantly different by Duncan's multiple range tests ($P < 0.05$).

DEET 及假荆芥内酯的空间驱避效果研究结果表明,假荆芥内酯可显著抑制人体气味及二氯甲烷 L-乳酸对两种蚊虫的引诱作用,假荆芥内酯表现出良好的空间驱避效果(表3)。但 DEET 对二氯甲烷

L-乳酸诱蚊作用无明显的抑制效果,对照组与处理组诱捕率无显著性差异($P > 0.05$),而在人体气味 + DEET 处理组中,DEET 却明显增强了人体气味对蚊虫的引诱性。

表3 DEET和假荆芥内酯对白纹伊蚊与淡色库蚊的抑制效果
Table 3 Inhibition of DEET and nepetalactone to *Aedes albopictus* and *Culex pipien pallens*

处理 Treatment	试验次数 Number of tests	平均诱捕率 Mean trappability (%) ($\pm SE$)					
		白纹伊蚊 <i>A. albopictus</i>			淡色库蚊 <i>C. pipien pallens</i>		
		处理组 Treated	空白组 Control	T 检验 T test	处理组 Treated	空白组 Control	T 检验 T test
人体气味 + 避蚊胺 Human scent + DEET	4	66.7 ± 4.4	15.0 ± 2.9	$P < 0.05$	55.4 ± 6.2	12.6 ± 3.9	$P < 0.05$
人体气味 + 假荆芥内酯 Human scent + nepetalactone	4	10.5 ± 1.5	47.5 ± 3.1	$P < 0.05$	11.2 ± 3.1	40.5 ± 5.5	$P < 0.05$
二氯甲烷 L-乳酸 + 避蚊胺 Dichloromethane L-lactic acid + DEET	4	18.8 ± 3.2	12.5 ± 4.4	$P > 0.05$	14.6 ± 4.3	13.2 ± 3.1	$P > 0.05$
二氯甲烷 L-乳酸 + 假荆芥内酯 Dichloromethane L-lactic acid + nepetalactone	4	12.6 ± 3.6	48.0 ± 4.6	$P < 0.05$	10.5 ± 1.5	40.5 ± 4.2	$P < 0.05$

从上述结果看,假荆芥内酯单独作用时具有微弱的引诱效果,当有引诱源存在时它是良好的空间驱避剂,可明显抑制蚊虫对引诱源的定向行为反应。同时,它也是一种有效的乳酸引诱源的抑制剂。

DEET 是优良的皮肤涂抹驱避剂,单独作用时不会引起蚊虫空间意义上的行为反应,但在人体复杂气味存在时,可显著增强蚊虫的定向飞行机率。

3 讨论

近年来对植物源驱避剂的研究受到广泛重视,国外对这方面的报道甚多,企图寻找出性能优良的驱避物来代替现在广泛使用的 DEET。同时,一些基于气味化合物的蚊虫防治技术也日益受到人们的重视,其中利用引诱性挥发物质达到对蚊虫的有效诱杀技术已在海外得到成功应用(Kline, 1994; Kline and Lemire, 1998),而利用挥发性驱避物以空间驱避带来防控蚊虫的研究是近年来兴起的又一大热点(Kline *et al.*, 2003)。本研究结果发现,取材方便的猫薄荷有效成分假荆芥内酯虽然不能作为传统的皮肤涂抹驱避剂来防护个体,但对蚊虫准确搜寻寄主气味源有明显的抑制作用,是良好的空间驱避剂,有一定的开发应用前景。

乳酸是人体汗液的主要成分之一,一直被认为是诱蚊的主要因素之一,而 DEET 自 1999 年证实是一种乳酸抑制剂以来,其作用机理已被人们所共识,DEET 可封锁蚊虫的乳酸受体,从而抑制了蚊虫对正常引诱性化学信号的反应(Dogan *et al.*, 1999a, 1999b)。而在本研究中 DEET 对二氯甲烷 L-乳酸引诱液无明显的抑制作用,尚可解释为 DEET 在本试验系统中的挥发量可能低于一定的抑制浓度阈值;但 DEET 在本研究中可明显提高人体气味对蚊虫的引诱效果,表现为增效作用的实验结果,尚无理论依据。DEET 对蚊虫吸血行为的抑制,可能有着更为复杂的作用机理。DEET 作为皮肤涂抹驱避剂,在近皮肤一定距离形成的气味层,抑制了蚊虫对宿主气味的识别能力,从而阻断了其定向吸血行为;而未与皮肤接触时,DEET 自然挥发物对蚊虫并不表现抑制作用。有关 DEET 在皮肤内的代谢及深入的作用机理还有待于进一步的研究。

随着蚊虫抗药性的增强、环境保护的压力以及传统涂抹型驱避剂所暴露出的弊端,需开发新的蚊虫防控措施,我国植物资源丰富,从植物挥发性物质中寻找高效的驱避物以及对空间驱避剂实用性技术的研究将是未来的发展趋势。

参考文献(References)

- Dogan EB, Ayres JW, Rossignol PA, 1999a. Behavioral model of action of DEET: inhibition of lactic acid attraction. *Med. Vet. Entomol.*, 13: 97-100.
- Dogan EB, Rossignol PA, 1999b. An olfactometer for discrimination between attraction, inhibition and repellency in mosquito (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 36: 788-793.
- Gyrboski J, Weinstein D, Ordway NK, 1961. Toxic encephalopathy apparently related to the use of an insect repellent. *N. Engl. J. Med.*, 264: 289-291.
- Kline DL, 1994. Introduction to symposium on attractants for mosquito surveillance and control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 10: 253-257.
- Kline DL, Bernier UR, Posey KH, Barnard DR, 2003. Olfactometric evaluation of spatial repellents for *Aedes aegypti*. *J. Med. Entomol.*, 40(4): 463-467.
- Kline DL, Lemire GF, 1998. Evaluation of attractant-baited traps/targets for mosquito management on Key Island, Florida, USA. *J. Vect. Ecol.*, 23: 171-185.
- Miller JD, 1982. Anaphylaxis associated with insect repellent. *N. Engl. J. Med.*, 307(21): 1341-1342.
- Peterson CJ, 2001. Insect Repellent of Nature Origin: Catnip and Osage Orange. Ph.D. Dissertation of Iowa State University, Ames, IA.
- Peterson CJ, Ems-Wilson J, 2003. Catnip essential oil as a barrier to subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in the laboratory. *J. Econ. Entomol.*, 96(4): 1275-1282.
- Peterson CJ, Leah T, Nemetz LM, Jonesand JR, 2002. Behavioral activity of catnip (Lamiaceae) essential oil components to the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.*, 95(2): 377-380.
- Posey KH, Barnard DR, Schreck CE, 1998. Triple cage olfactometer for evaluating mosquito (Diptera: Culicidae) attraction responses. *J. Med. Entomol.*, 35(3): 330-334.
- Seidel V, Lindner W, 1993. Universal sample enrichment technique for organochlorine pesticides in environmental and biological samples using a redesigned simultaneous steam distillation-solvent extraction apparatus. *Anal. Chem.*, 65: 3677-3683.
- Sinha C, Agrawal AK, Islam F, Seth K, Chaturvedi RK, Shukla S, Seth PK, 2004. Mosquito repellent (pyrethroid-based) induced dysfunction of blood-brain barrier permeability in developing brain. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 22(1): 31-37.

(责任编辑:黄玲巧)