

精油微膠囊的製備及其對害蟲的生物活性

蘇裕昌*、鄒文心**

Preparation of Essential Oil Microcapsules and Their Biological Activity Against Pests

Yu-Chang Su* Wen-hsin Tsou**

Summary

This study investigated the toxic effects of seven essential oils on *Limantria dispar* (Lepidoptera: Lymantridae, gypsy moth) larvae. The essential oils were first formulated as oils in water (o/w) emulsions and used in laboratory bioassays to assess their lethal concentration (LC₅₀). The results showed that seven tested oils possess effecting on *Limantria dispar* larvae. Among them, *Rosmarinus officinalis* and *Thymus herba-barona* L. has preferred lethal concentration 0.40 and 0.35 (μL/g) respectively. Preparing microcapsules containing the most bioactive oils (*Rosmarinus officinalis* and *Thymus herba-barona*) by a phase separation process, followed by freeze-drying. The effects of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* ated essential oils content in microcapsules were assayed against *Plodia interpunctella* larvae. Those microcapsules were characterized in terms of essential oil content and composition, morphology, storage stability, and release profile.

Results show that the encapsulation process gave high encapsulation yields (over 98%) with two essential oils. The microcapsules not only reduced the loss of essential oils but also protected the core material against environmental agents and could be use in controlled and release systems. Another aspect low concentration (0.1%) of *Thymus* and *Rosmarinus* oils were extremely effective against I-II instar larvae, gaving mortalities over 50%. By Using different concentration of microcapsules in the diet, could found that proportional hight recorded in mortality, which reached values up to 80% in 5% treatments. On the release experiment, there are different release pattern between two oils. *Thymus* microcapsules still contains about 75% of the oil after 25 days while *Rosmarinus* formulation only 25% remained. It may be referred due to the different hydrophilic characteristics of these oils.

Key words: essential oil、emulsion、microcapsule、in vitro release、larvicidal effect、*Limantria dispar*

一、緒言

印度穀蛾 (*Plodia interpunctella*) 又稱為棉鈴蟲，廣泛出現在各種穀類、豆類、堅果及加工食品中，導致食品加工及儲存產生問題，Allotey 與 Goswami (1994) 的報告指出，印度穀蛾可以利用當地的植物材料加以防治。舞毒蛾 (*Limantria dispar*) 幼蟲生長於美國東部、歐洲及亞洲之栓皮櫟林中，為最具破壞性的害蟲之一，經常造成大面積櫟木森林的嚴重蟲蛀為害。直到幾年前，抑制食葉害蟲的化工產品出現，此現象才得以減緩。目前經常使用蘇雲金芽孢桿菌 (*Bacillus thuringiensis*) 為基底的殺蟲劑來抑

制舞毒蛾，並將此殺蟲劑以天然或合成之聚合物製備形成複合微膠囊。

許多化學合成之農藥被認為是較有效的防蟲害產品，然而這些產品對於有益之昆蟲及環境皆有負面的影響，而且化學物殘留對人體也有害，因此逐漸發展出以各種優良植物精油製成天然殺蟲劑 (Grainge & Ahmed, 1988)。精油相較於人工合成之化合物，能在環境中更迅速的降解，並且可吸引有益處之昆蟲。近期的研究指出，精油中的天然衍生物做為殺蟲劑，可以殺死幼蚊及使蚊蟲產生拒食作用、也可延後蚊蟲成長和成蟲羽化時間、阻止成蟲產卵，

或使其卵死亡，另外也可減緩蚊蟲活動力以及產生蚊蟲忌避性的潛能。(Huang et al, 2000; Lale et al., 2000; Padin et al., 2000; Tunc et al., 2000; Bouda et al., 2001; Lee et al., 2001)。

農藥通常有兩種控制釋放系統，分別為液態（水及非水的溶液或分散液）和固態（可濕性粉末及水分散性顆粒）系統。其材料的選擇受到下列幾個因素的影響，例如農藥之物理、化學和生物學性質；作物處理方式和農業上應用等等。另外其使用經濟性須加以考慮，尤其是和殺蟲劑相似的應用領域，必須維持蟲害的控制。而雖然精油可作為替代性害蟲之防治產品，但其中的揮發性成分具親水性差與容易氧化及揮發速度等問題，因此將精油利用微膠囊進行包覆，以達到控制釋放的效果。

現今已有許多研究，將精油中的化合物製備成微膠囊 (Clancy et al, 1992)，使用同質或異質性的基質作物理性包覆，進而保護內部敏感性材料。因此，可利用最少量的有效成分，達到控制其釋放，使其在特定的時間內具有更顯著的效果，且改善精油的變質缺點，並減少對環境的破壞。

噴霧乾燥是目前最常用的微膠囊乾燥方式，但由於其需要較高的溫度，會導致油滴凝聚、微膠囊大小不均、以及芯材的損失，因此其應用性有限。考慮到乾燥程序及精油之理化特性的限制，因此使用冷凍乾燥來製備微膠囊。

本報告檢討使用七種含不同化學成分之精油，包括荷巴百里香草 (*Thymus herba-barona L.*)、香桃木 (*Myrtus communis L.*)、藍桉 (*Eucalyptus globulus L.*)、鼠尾草 (*Salvia officinalis L.*)、蠟菊 (*Helichrysum italicum*) 和錫蘭肉桂油 (*Cinnamomum zeylanicum Nees ex Blume*) 製成 (O/W) 乳液，並且進行生物試驗，觀測其毒性對於 IIrd 及 IIIrd 期舞毒蛾幼蟲的影響。再將其中活性較佳之精油包覆成微膠囊，作為控制舞毒蛾幼體的方法。另外，將迷迭香 (*Rosmarinus officinalis*) 及銀斑百里香 (*Thymus vulgaris*) 精油製備成微膠囊，並測定微膠囊內精油含量、組成、粒度分佈以及控制釋放曲線等，並試驗其對印度穀蛾幼蟲的影響。

二、試驗材料與方法

(一)、試驗材料

明膠 (Gelatine) 120 bloom 得自 Cruciani 公司

(Cruciani, Rome, Italy)。無水硫酸鈉 (Anhydrous Na₂SO₄) 及 1M 氫氧化鈉溶液 (Sodium hydroxide) 得自 Merck 公司 (Milan, Italy)。50 % 戊二醛溶液 (Glutaraldehyde) 取自 Sigma Aldrich 公司 (Milan, Italy)。Tween 80 得自 Sigma Aldrich 公司。矽油 (Silicon oil) 取自 ICN 醫藥公司 (Milan, Italy)，且無需進一步純化。錫蘭肉桂油 (*Cinnamomum zeylanicum Nees ex Blume*) (Ulrich)，須經蒸氣蒸餾，並純化後才能使用。

銀斑百里香、迷迭香、荷巴百里香草 (*Thymus herba-barona L.*)、香桃木 (*Myrtus communis L.*)、藍桉 (*Eucalyptus globulus L.*)、鼠尾草 (*Salvia officinalis L.*)、蠟菊 (*Helichrysum italicum*)，萃取上述幾種芳香植物之精油進行試驗。

(二)、試驗方法

1. 精油萃取

(1) 水蒸餾

新鮮植物材料於薩丁尼亞島氣候溫和的時期採集，以植物材料與蒸餾水之比例為2:1下儲存24 hr。蒸餾時間為2 hr，萃取出之精油經無水硫酸鈉乾燥處理，從水溶液中分離得到油狀物，並將其存放於4°C的暗色玻璃瓶中。

(2) 水蒸氣蒸餾

銀斑百里香 (*Thymus vulgaris*) 和迷迭香 (*Rosmarinus officinalis*) 經水蒸氣蒸餾後，使用所得之精油。

2. 精油收率

精油收率的測定是利用歐洲藥典標準中使用之 Clevenger-type 型水蒸氣蒸餾設備進行精油的製備，數據為至少3次蒸餾的平均值。

3. 精油分析

精油成分利用氣相層析 (GC) 及氣相層析質譜 (GC/MS) 進行分析測定。氣相層析採用 Carlo Erba HRGC 5300 Mega series 氣相層析火焰離子化偵測器 (FID) (Carlo Erba, Milan, Italy)。管柱為 SPB-5 (5% 二苯基, 94% 二甲基, 1% Vinylpolysiloxane) (30m × 0.32mm × 0.25μm) (Supelchem, Milan, Italy)，載體為氮氣 (1 ml/min)。分析條件：起始溫度為 60°C，以 5°C/min 上升至 150°C，持溫，再以 5°C/min

之升溫速率上升至 220°C，持溫 20 min。偵測器溫度為 250°C，Supelcowax 10 管柱（聚乙二醇20M）（15m × 0.25mm × 0.25µm）（Supelchem, Milan, Italy）之溫度條件：50°C持溫 8 min，以 3°C/min 升溫速率上升至 180°C，並持溫 20 min。載氣為氮（0.6 ml/min）。進樣器和偵測器溫度分別為 200°C和 220°C。注射分流比 1:40。利用標準品的比較，可得鑑定峰的成分。定量部分使用乙二醇單丁基醚（Ethylene glycol monobutyl ether）作為內部標準，數據為 3 次分析的平均值。

GC/ MS分析是使用 Hewlett Packard 5890 氣相層析儀，直接連接 Hewlett Packard HP 5971 A（70 eV）質譜儀（Hewlett Packard, Milan, Italy）進行測定。分離管柱為 DB-5MS（30 m × 0.25 mm × 0.25 µm）（Fisons, Milan, Italy），使用氮氣作為載體。分析條件為：60°C 持溫 3 min，然後以 3°C/min 升溫至 150°C，再持溫 5 min，最後以 10°C/min 升溫至 200°C，持溫 20 min。進樣器和偵測器溫度分別為 70°C及 280°C。使用 Hewlett Packard 7673 自動進樣器進樣。成分鑑定上使用質譜（Mass-spectra）的比對採用 Wiley 之資料庫。

4. 精油調配

(1) 精油乳液製備

將濃度 0.25、0.5 及 1.0% wt / wt 的精油放入含 1.0 % Tween 80 之溶液中，利用冷卻設備（Haake GH-D8, Karlsruhe, Germany）在 5°C下，以速率 13500 rpm 攪拌 10 min，使精油均勻分散。

(2) 精油微膠囊製備

將蒸餾水及 10%（wt / wt）的明膠放入玻璃管中，於 40°C下均勻攪拌使明膠溶解在水中。然後加入適量所選用之精油（表1），使用高剪力渦輪混合機以速率 1200 rpm 攪拌進行乳化反應，此時稱為凝集階段（Coacervate phase）（表2）。加入適量的硫酸鈉（20%wt / wt的水溶液），並將系統冷卻至 5°C，攪拌 1 hr，得到凝聚相。然後加入 50 %戊二醛（Glutaraldehyde）溶液，並利用 1N 氫氧化鈉調整 pH 值至 8。將所得的混合物保持在 5°C下攪拌 3 hr（750 rpm），經硬化後的微膠囊，利用冷水沖洗過濾，最後使用冷凍乾燥脫水。清洗微膠囊用的水必須收集起來，用來定量未包覆之精油。微膠囊包覆率使用以下公式計算：

$$\text{微膠囊包覆率 (\%)} = (C - N / C) \times 100$$

其中 C = 包覆之精油量 (g)，N = 未包覆精油量 (g)

表 1 和表 2 中顯示初始原料量以及微膠囊過程各階段的條件。結果為 3 次測定之平均值。

表 1. 精油微膠囊之原料使用量 (Moretti et al., 2002)

組成	使用量 (g)
明膠	15
精油	30
水	135
硫酸鈉 20% 水溶液	200
戊二醛 50% 水溶液	3
1 N氫氧化鈉	3

表 2. 微膠囊製程之各階段條件 (Moretti et al., 2002)

乳化階段	
溫度 (°C)	40
攪拌速率 (rpm)	1200
時間 (h)	0.5
凝集階段	
溫度 (°C)	40-50
攪拌速率 (rpm)	1200
時間 (h)	60
硬化階段	
溫度 (°C)	5
攪拌速率 (rpm)	750
時間 (h)	3
脫水階段	
樣品溫度 (°C)	-80
冷凝機溫度 (°C)	-54
殘留壓力 (mbar)	0.1-0.05
時間 (h)	4

(3) 精油乳液的特性

乳液的特性主要和精油含量及組成有關：精油含量的測定是利用水蒸餾裝置，以 0.5%矽油作為消泡劑，蒸餾乳液中的活性成分。計算得到的精油，以 GC 分析之。

(4) 精油微膠囊的特性分析

微膠囊中精油的含量和組成，以及乾燥前後微膠囊之粒徑分佈、形狀和表面特性的分析如下：

- a. 微膠囊內精油含量：精密秤取適量濕微膠囊及乾燥後微膠囊，經水蒸氣蒸餾萃取其包覆之精油量。
- b. 微膠囊內精油組成：以氣相層析圖譜分析水蒸氣蒸餾法所製備之微膠囊（濕和乾的），數據為 3 次分析的平均值。
- c. 微膠囊粒徑分佈：利用 LS100 粒徑分析儀(Coulter, Miami, FL) 進行測定，將空微膠囊及包覆精油的微膠囊在適當濃度下，調配成水分散液進行測定，其測定之尺寸範圍為顆粒粒徑 0.4 - 900 μm 。數據為顆粒平均直徑及粒徑分佈，以 d 10、d 50 及 d 90 來表示，其中 d 50 顯示出尺寸分布的平均值。
- d. 微膠囊形狀及表面特性：利用光學顯微鏡 (Zeiss Standard Universal, Zeiss, Germany) 和掃描電子顯微鏡 (SEM) (Zeiss DSM 962, Zeiss) 來測定。微粒樣品放置在以雙面膠帶固定的鋁短線上，鍍上一層金之後，在氬氣下以交流電 20 kV 的加速電壓進行分析。
- e. 微膠囊內水相百分比：濕微膠囊過濾後，計算其精油含量，並利用精油萃取後得到的乾燥殘餘物的量換算之。數據為 3 次分析的平均值，並利用百分比來表示。
- f. 控制釋放：微膠囊包覆之精油釋放曲線的測定方法，是在溫度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 及不同相對濕度 (45、75、 $95 \pm 5\%$) 環境下，將含有 2 g 的樣品微粒，放入直徑為 90 mm 的玻璃培養皿中，並以尼龍網覆蓋。在設定的時間間隔內 (1、3、5、7、11、15、25 days)，測定剩餘之包覆精油量和組成，試驗重複 4 次取其平均值，並繪製成釋放曲線。
- g. 貯存穩定性：將乾燥後微膠囊，放置於 54°C 密封玻璃容器內，日光照射 2 週後測定其精油含量及成分。

5. 昆蟲的生物活性試驗

(1) 印度穀蛾試驗

將印度穀蛾飼養在溫度 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ，相對濕度 $60\% \pm 5\%$ 的塑膠廣口瓶中，以生物玉米粉 (Maize flour) 進行餵食，光照與黑暗時間比為 16 hr / 8 hr。

a. 攝食測試

在 35 mm 的培養皿中飼養 10 組不同生長階段 (I、II、III、IV 齡) 的幼蟲，將銀斑百里香及透香微膠囊與玉米澱粉混合成不同濃度的飼料 (0.01 - 4 % w/w)，取 1 g 混和飼料進行試驗。7 天後記錄幼蟲死亡率及致死濃度 (LC50) (Hamilton et al., 1977)。

b. 吸入試驗

將 2 g 玉米粉及 10 組 II - III 齡幼蟲放置在塑料試驗管 (高 10 cm，直徑 3.5 cm) 中，並用尼龍網蓋住。試驗管插入含精油微膠囊 (1.0、2.5 及 5.0% w/w 玉米粉量) 的玻璃試管 (直徑 20 cm，高度 3.7 cm) 中。7 天後，利用玉米粉殘存量來評估幼蟲死亡率，並以正己烷萃取，確定其揮發油的含量。每個試驗重複 4 次，並使用空微膠囊作為控制組。

(2) 舞毒蛾試驗

將舞毒蛾的卵儲存於 4°C 下，用毛刷將其依質量分開，之後將其放置在溫度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ，相對濕度 $60\% \pm 5\%$ 環境下孵化，光照時間與黑暗時間的比值為 12 hr / 12 hr。剛孵出的幼蟲被餵食 ICN-Biomedicals (Milan, Italy) 人工飼料 (The Gypsy Moth Diet, Catalog No. 960294)，飼養至 IIrd 和 IIIrd 型齡幼蟲，並在生物試驗中使用。

a. 七種精油製成乳液的毒性試驗

將 20 組舞毒蛾幼蟲組，飼餵 0.5 g 的 ICN 人工固體飼料，並注入 35 μL 精油乳液。注射器為立方體形，厚度 5 mm，總體積 50 μL 。在 24、48 及 72 hr 之後計算死亡幼蟲的數量。24 hr 後秤其飼料的殘留量，以確定各組的進食量，同時也考慮到幼蟲的死亡率。IIrd 和 IIIrd 型齡幼蟲每個試驗重複 3 次，並計算其致死濃度 (LC50)。

b. 兩種精油 (百里香及迷迭香精油) 微膠囊的毒性試驗

於玻璃瓶內 (直徑 90 mm) 放入 10 隻幼蟲，以及 0.3 mg/cm^2 微膠囊，每個玻璃瓶上覆蓋尼龍網。在 0 ~ 10 hr 之間，觀察幼蟲的行為，並且於特定的時間間格內，記錄幼蟲的死亡率。試驗重複 4 次，並以空微粒當作空白試驗進行測試。

6. 統計分析

利用 1-way ANOVA 轉化後死亡率，並利用多重差距檢定 (Student-Newman-Keuls) 進行平均數比較。所有統計測試的結果若 $P < 0.05$ 表示有顯著性差異。未轉換的數

據利用 Abbott's formula 進行修正，如下式：

$$[(A - B)/A] \times 100$$

其中：A = 控制幼蟲存活數，B = 在測試中幼蟲存活數

三、結果與討論

1. 七種精油製成乳液之舞毒蛾毒性試驗

(1) 七種植物精油成分探討

表3為試驗中每種植物精油的收率，以及其主要成分。精油收率和植物物種有關，範圍約在 0.3% (蠟菊) 至 3.6 % (迷迭香)。所萃取出之精油成分都是由許多複雜的化合物所組成。迷迭香 (*Rosmarinus officinalis*) 和香桃木精油

(*Myrtus communis L.*) 含有高含量的單萜烴 (α -pinene 和 Camphene)。鼠尾草精油 (*Salvia officinalis L.*) 主要成分是單萜酮 (Camphor, α -thujone)。蠟菊精油 (*Helichrysum italicum*) 主要由乙酸橙花酯 (Neryl acetate) 及其相對應的醇所組成。錫蘭肉桂精油 (*Cinnamomum zeylanicum Nees ex Blume*) 主要由肉桂醛組成 (Cinnamic aldehyde)。荷巴百里香精油 (*Thymus herba-barona L.*) 的主要成分為香芹酚 (Carvacrol) 和百里香 (Thymol)。錫蘭肉桂精油中的酚類衍生物是丁香酚 (eugenol)。而藍桉精油 (*Eucalyptus globulus L.*) 的主要成分是環氧化物衍生物 1,8 cineol，同時此化合物也存在於香桃木油和迷迭香油中。

表 3. 七種植物精油收率及其主要成分 (Moretti et al., 2002)

精油	收率% mg/100g	碳水化合物	醇類	酮類	酯類%	酚類	醛類	氧化物
錫蘭肉桂	市售	4	2	—	1	12	81	—
藍桉	2.8	14	1	—	—	—	—	86
蠟菊	0.3	24	18	—	59	1	—	1
香桃木	0.8	64	6	—	7	3	—	29
迷迭香	3.6	64	6	11	8	—	—	9
鼠尾草	2.4	20	11	54	2	—	—	12
荷巴百里香	2.2	27	<1	<1	<1	68	—	<1

(2) 精油乳液對舞毒蛾的毒性試驗

表 4 顯示各種精油乳液對舞毒蛾的殺蟲效果。在 24 hr 後，其精油乳液造成的死亡率和控制組相同 (數據未顯示)。結果顯示，在 1.0% 的活性成分中，只有曝露 48 及

72 hr 後的死亡率和控制組有顯著的差異，而在曝露 72 hr 後的 LC50 範圍為 0.35 mL/g (百里香精油) 至 0.60 mL/g (藍桉精油)。

表 4. 不同精油在飼餵舞毒蛾後 48 及 72 hr 後的致死率 (Moretti et al., 2002)

	48 Hours			72 Hours			LC50 ($\mu\text{L/g}$)
	0.25	0.5	1.0	0.25	0.5	1.0	
	%			% (LC50)			
錫蘭肉桂	11.6	20.0	53.0+	20.0	33.0+	75.0+	0.45
藍桉	5.0	10.0	27.0	13.3	22.0	58.0+	0.60
蠟菊	13.3	20.0	48.0+	25	38.0+	73.0+	0.42
香桃木	8.3	18.0	43.0+	18.3+	33.0+	73.0+	0.46
迷迭香	13.3	15.0	33.0+	26.6	40.0+	78.0	0.40
鼠尾草	8.3	13.0	15.0	20	30.0+	28.0	—
荷巴百里香	20.0	25.0	53.0+	31.6	45.0+	88.0+	0.35
	8.3	10.0	15.0	20.0	20.0	28.0	—

圖1顯示了每次試驗結束後的死亡率百分比。荷巴百里香、迷迭香、香桃木、錫蘭肉桂和蠟菊精油造成的死亡率都超過 60%。而其中百里香精油造成最高的死亡率（在 1.0%濃度下約 84%）。根據文獻顯示，我們發現主要的毒性來源是精油的酚含量，尤其是香芹酚這種化合物，已被研究出具有殺蟲的活性 (Ulthee A et al., 1999)。另外也有報告顯示，香芹酚與致病細菌的細胞膜相互作用，改變 H⁺ 和 K⁺ 的通透性，而此樣的改變也同樣在蘇雲金芽孢桿菌中發現，離子梯度的降低，會導致幼蟲腸細胞中重要的反應減少，最後細胞死亡。(Knowless et al., 1994)

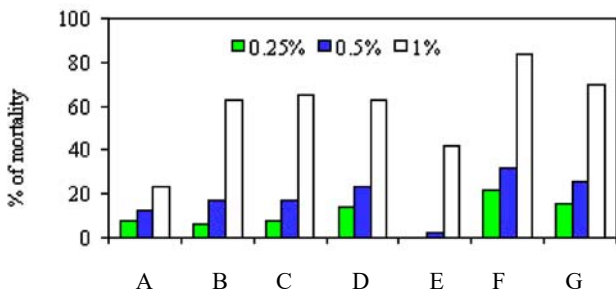


圖 1. 各種精油的乳液造成舞毒蛾之致死率 (Moretti et al., 2002)

A: 鼠尾草 *Salvia officinalis*, B: 香桃木 *Myrtus communis*, C: 錫蘭肉桂 *Cinnamomum zeylanicum*, D: 蠟菊 *Helichrysum italicum*, E: 藍桉 *Eucalyptus globulus*, F:

荷巴百里香 *Thymus herbabarona*, G: 迷迭香 *Rosmarinus officinalis*

表 5 顯示舞毒蛾攝食 1% 精油乳液 24 hr 後的狀況。鼠尾草桉和藍桉精油和空白組對照後，皆無統計學上的顯著差異。另外，除了荷巴百里香油之外，蠟菊、迷迭香、香桃木和錫蘭肉桂精油和 Tween 80 控制組沒有統計學的顯著差異。

表 5. 舞毒蛾攝食 1% 精油乳液 24 hr 後的狀況 (Moretti et al., 2002)

	處理組 (平均值±SD)	存活組 (平均值±SD)
錫蘭肉桂	62.6 (±4.5) bc	3.8 (±0.2)
藍桉	85.3 (±3.6) a	4.6 (±0.8)
蠟菊	59.3 (±4.4) c	4.2 (±0.6)
香桃木	61.5 (±4.3) bc	3.8 (±0.5)
迷迭香	61.8 (±2.4) bc	3.6 (±0.1)
鼠尾草	86.5 (±1.3) a	4.8 (±0.2)
荷巴百里香	46.4 (±4.9) d	3.4 (±0.3)
	71.3 (±2.9) b	3.7 (±0.1)
	88.3 (±2.1) a	4.5 (±0.2)

2. 兩種精油（迷迭香油和荷巴百里香）微膠囊對舞毒蛾的毒性試驗

(1) 迷迭香油和荷巴百里香精油微膠囊

使用在前述試驗中，對舞毒蛾的毒性效果較佳的兩種精油(迷迭香油和荷巴百里香油)製成微膠囊，兩者皆有 98% 以上的包覆率(表 6)。如果考慮到微膠囊乾燥時的質量，兩種精油在濕微粒時的含量是非常相似的，但是，在乾燥後的微膠囊，迷迭香精油的包覆百分比高於百里香精油。造成這種差異的原因可能是在凝聚過程中，因為荷巴百里香精油具有更好的親水性特性，在凝聚時可以有利於水相的包覆，但在最後得脫水階段，會有較高的精油損失，因為在蒸發系統中，油的揮發和系統中水的濃度有關。

另一方面兩種精油所製備之微膠囊的顆粒尺寸分佈沒有表現出顯著的差異。濕微膠囊尺寸分佈也和乾燥後微膠囊的差異不大，由此結果可知，乾燥對於微膠囊粒徑的影響不大。

表 6. 微膠囊包覆率及其顆粒尺寸的分佈 (Moretti et al., 2002)

	Rosmarinus oil	Thymus oil
Wet microcapsules		
Encapsulation yield	99.2	98.6
Essential oil content(%wt/wt)	68.4	66.5
Percentage of humidity	70.2	86.5
Particle size(μm)		
Mean diameter	58.5	56.7
D10	13.2	12.6
D50	51.0	48.9
D90	100.9	96.5
Dried microcapsules		
Loss on drying(%wt/wt)	68.6	83.5
Essential oil content(%wt/wt)	65.2	55.6
Percentage of oil recovery*	95.3	83.6
Essential oil/gelatin ratio	1.9	1.7
Particle size(μm)		
Mean diameter	57.9	54.9
D10	11.8	11.5
D50+	50.4	51.2
D90	100.6	97.3

平均值，標準差在 5%以內

圖 2 顯示出在相分離過程結束時的微膠囊顆粒：芯材組成濕軟的微粒，包覆在穩定厚度的殼材中，凝聚形成較大的聚集體。聚合通常是相分離過程中主要的問題，利用控制 pH值和溫度，或加入適當的界面活性劑可改善這個問題。

由 SEM 圖像(圖 3 和圖 4)中所示，硬化過程並沒有改變聚集體的結構，乾燥後微膠囊每顆直徑約 0.2 μm，彼此連接形成一個黑莓狀球型結構。每顆的外表幾乎是平滑的，顯示出明膠所形成的連續膜包覆在精油液滴的周圍。

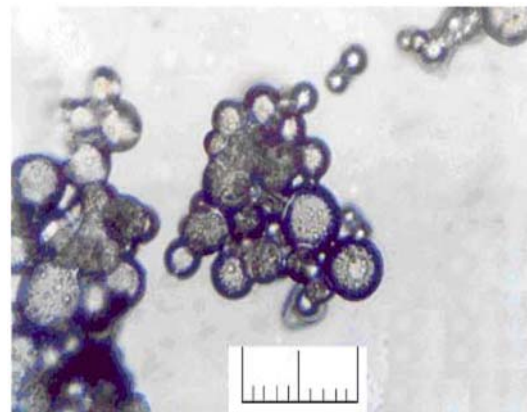


圖 2. 迷迭香精油微膠囊凝聚後的影像 (Moretti et al., 2002) (放大倍率100 x 1.25; 比例尺: 100 μm)

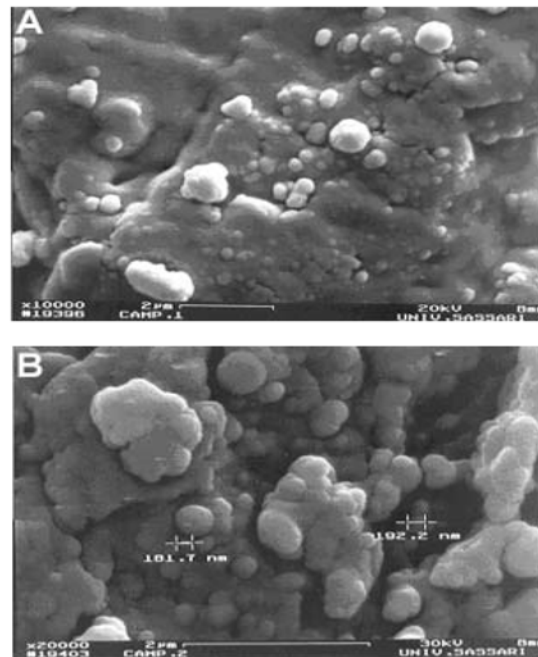


圖 3. 迷迭香精油微膠囊之 SEM 圖

濕 (A x 10000), 乾燥 (B x 20000)

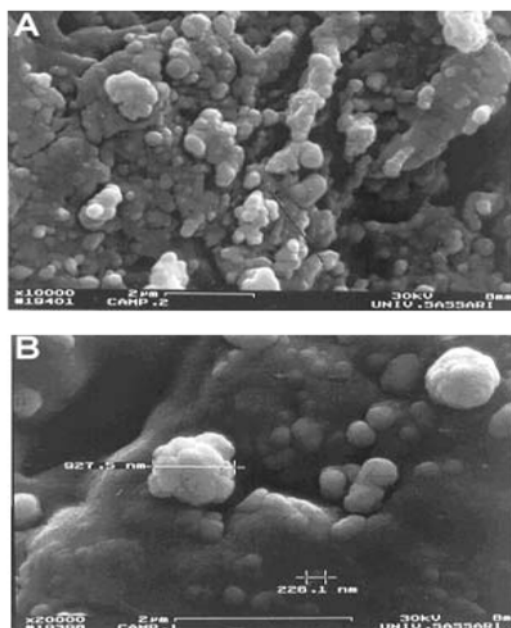


圖 4. 百里香精油微膠囊之SEM圖
濕 (A x 10000)，乾燥 (B x 20000)

(2) 精油微膠囊之釋放試驗

微膠囊中精油的釋放曲線顯示在圖 5 和圖 6 中。雖然使用不同的芯材，但兩者的釋放型態幾乎相同。當暴露於較濕的環境中 (60%)，微膠囊會先吸水。這會導致某些壁材的改變，例如外觀上變橡膠狀或黏稠感，在 24 hr 後樣品的重量不再增加：在這時候釋放速率增加，最大速率約為 45 mg/die (晶粒)。而在 48 hr 之後，速率遞減至 10 mg/die，並在試驗的最後階段變成穩定狀態。在30天的暴露之後，微膠囊仍然維持約 20% 的活性成分，而且重量幾乎不變，這表示環境濕度逐漸取代了內部油相。

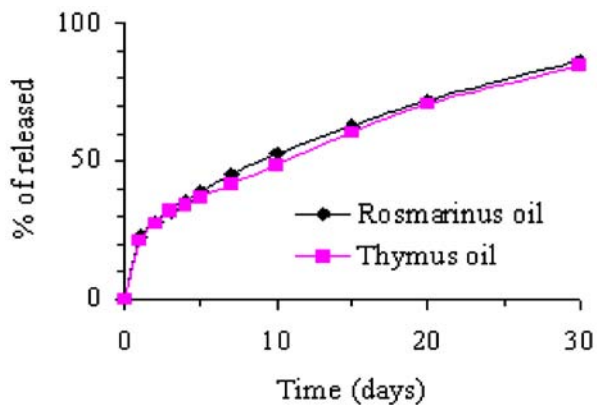


圖 5. 微膠囊的精油釋放百分比與時間之關係圖 (Moretti et al., 2002)

(平均值，標準差在3%以內)

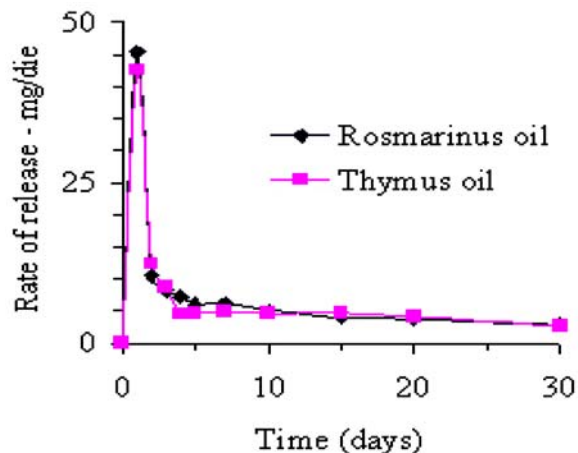


圖 6. 微膠囊的精油釋放速率與時間之關係圖 (Moretti et al., 2002)

(平均值，標準差在3%以內)

(3) 精油微膠囊之穩定性試驗

精油在製備微膠囊的過程中都沒有造成顯著的組成改變，而在穩定性試驗中，各組的精油含量沒有顯著的變化，表示微膠囊在暴露的環境濕度下能夠非常穩定 (表 7 及表 8)。

表 7. 比較製備精油微膠囊前後及穩定試驗後，百里香精油的成分含量 (Moretti et al., 2002)

Components	A	B	C
α -thujene	1.6	1.6	1.6
α -pinene	0.7	0.7	0.7
Camphene	0.2	0.2	0.2
β -pinene	0.1	0.1	0.1
β -myrcene	2.1	2.1	2.1
α -phellandrene	0.1	0.1	0.1
Δ -3-carene	1.5	1.5	1.5
p-cymene	6.2	6.1	6.1
Limonene	0.9	0.9	0.9
γ -terpinene	6.3	6.2	6.1
Terpinolene	1.1	1.1	1.1
Terpinen-4-ol	0.2	0.2	0.2
α -terpineol	0.1	0.1	0.1
Bornyl acetate	0.1	0.1	0.1
Thymol	10.4	10.3	10.4
Carvacrol	58.0	57.8	57.7
β -caryophyllene	5.0	4.9	4.8
Caryophyllene	0.2	0.2	0.2

A為包覆前、B為包覆後、C為穩定試驗後。

表 8. 比較製備精油微膠囊前後及穩定試驗後，迷迭香精油的成分含量 (Moretti et al., 2002)

Components	A	B	C
α -pinene	38.9	38.8	38.7
Camphene	8.0	7.9	7.8
β -pinene	1.1	1.1	1.1
β -myrcene	4.7	4.7	4.5
α -phellandrene	0.6	0.6	0.6
Limonene	4.2	4.2	4.2
1,8 cineol	8.6	8.6	8.6
γ -terpinene	0.5	0.4	0.4
p-cymene	1.6	1.5	1.5
Camphor	7.0	6.9	6.8
Linalool	1.0	0.9	0.9
Bornyl acetate	8.3	8.3	8.3
β -caryophyllene	0.1	0.1	0.1
Verbenone	3.0	2.9	2.9
Borneol	5.0	4.9	4.9
Geraniol	0.2	0.2	0.2

A為包覆前、B為包覆後、C為穩定試驗後。

(4) 精油微膠囊對舞毒蛾的毒性試驗

圖 7 為舞毒蛾的死亡曲線，其顯示出兩種精油造成舞毒蛾的死亡曲線相似。死亡率皆逐步上升，並在 7 hr 後達最大值。而控制組雖然有相同的微膠囊粘附在幼蟲毛髮上，但並沒有任何的死亡。而另外對無毛的印度穀蛾進行試驗，其死亡率是較低的，大約 10 hr 後有 5% 的死亡率。

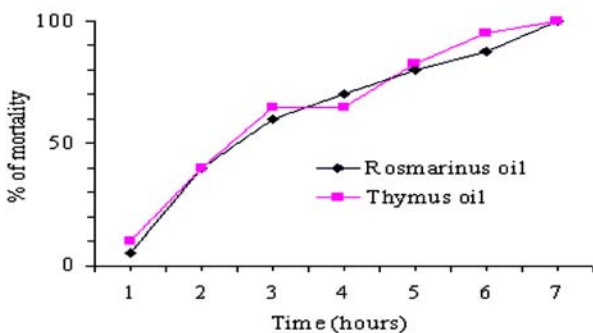


圖 7. 舞毒蛾在微膠囊試驗後的致死率 (Moretti et al., 2002)

3. 精油微膠囊對印度穀蛾的影響

(1) 銀斑百里香與迷迭香揮發性成分探討

表9顯示出銀斑百里香和迷迭香油經水蒸氣蒸餾後的組成化合物，以及其微膠囊包覆率、濕度百分比和微粒之平均直徑。迷迭香精油包含許多低極性化合物 (單萜類59%)，特別是 α -pinene (39%)。而極性化合物中，含有 1,8 cineole約 (8.6%)。銀斑百里香精油則含有較高的酚類化合物 (55.5%)，其中以麝香草酚 (Thymol) 占最多百分比 (49%)。其餘的為碳水化合物約 27% (p-cymene 18.5%)。

迷迭香和銀斑百里香油有較高的微膠囊包覆率 (超過98%)，並且其化學成分沒有任何明顯的改變，微膠囊內精油含量迷迭香精油為 68%，而銀斑百里香精油為 66%。相分離過程中所產生的顆粒尺寸範圍為 12 至 123 nm，平均直徑約 60 μ m。微膠囊中的水含量 (%濕度) 銀斑百里草精油為70%，而迷迭香精油為 60%。微膠囊是由直徑約 0.2 μ m 的球狀單元所組成，相互連接形成黑莓狀結構。每個單元的外表幾乎是平滑的 (圖 8)。

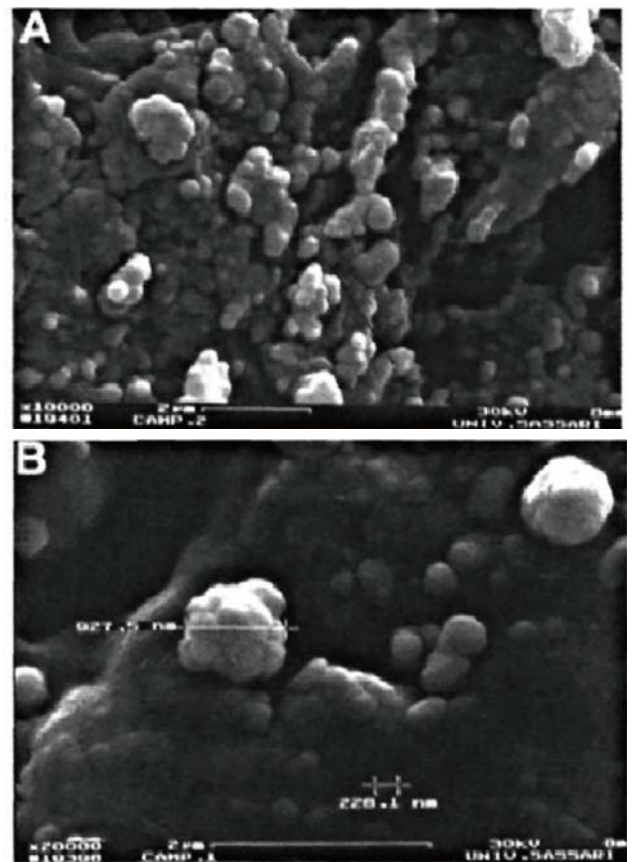


圖 8. 精油微膠囊的掃描顯微鏡圖 (Sanna Passino et al., 2004)

表 9. 兩種精油成分及其所製備的微膠囊特性 (Sanna Passino et al., 2004)

Main components	Thymus oil (% w/w)	Rosmarinus oil (% w/w)
σ -pinene	0.8	38.7
σ -phellandrene	n.d.	0.6
σ -thujone	1.3	n.d.
σ -terpynene	0.9	n.d.
γ -terpynene	n.d.	0.4
σ -pinene	0.6	1.1
σ -caryophyllene	2.5	0.1
σ -myrcene	1.7	4.5
Borneol	n.d.	7.0
Bomyl acetate	n.d.	8.3
Camphene	0.4	7.8
Camphor	n.d.	6.8
Carvacrol	6.5	n.d.
1.8cineole	n.d.	8.6
Geraniol	n.d.	0.1
Limonene	1.4	4.2
Linalool	2.1	0.9
Verbenon	a.d	2.9
p-cymene	18.5	1.5
Thymol	49.0	n.d.
Encapsulation yield (%)	98.6	99.2
Essential oil content (%w/w)	66.5	68.4
*		
Humidity (%)	70.3	60.3
Particle size (μ m)		
D10	12.6	13.2
D50	48.9	52.0
D90	116.5	123.9
Mean diameter (mm)	59.7	63.5

(3) 印度穀蛾活性試驗

表 10 和表 11 顯示，印度穀蛾幼蟲在餵食含精油微膠囊的玉米粉後之死亡率。結果顯示，I-II 期幼蟲比 III-IV 期較容易受到精油的影響，銀斑百里香和迷迭香的微膠囊造成較小幼蟲的死亡率約 32%至 87%，而較大的幼蟲的死亡率範圍約 7%至 50%。I-II 期幼蟲的 LC50 值分別為 1.3mg/g (銀斑百里香微膠囊) 和 2.1mg/g (迷迭香微膠囊)；III - IV 期齡幼蟲的 LC50 值分別為 83.5mg/g(銀斑百里香微膠囊) 和 141mg/g (迷迭香微膠囊)。

表 10. 印度穀蛾幼蟲在餵食含精油微膠囊的玉米粉七天後的死亡率 (Sanna Passino et al., 2004)

精油微膠囊	n*	死亡率平均值 (%)
迷迭香微膠囊	40	44.0b
銀斑百里香微膠囊	40	46.5b
控制組	8	7.5a
印度穀蛾幼蟲		
III-IV	20	28.0a
I-II	20	62.5b

(2) 精油微膠囊釋放曲線

圖 9 和圖 10 顯示微膠囊的釋放曲線，可以看出迷迭香精油的釋放量較大(25 days 後約 75%)。這可能是由於碳氫化合物的含量較高，這些低極性化合物在微膠囊水溶液中，會很迅速的釋放，相反的，銀斑百里香油釋放較慢(25 days 後約 25%)，因為其有較高含量的酚類化合物。

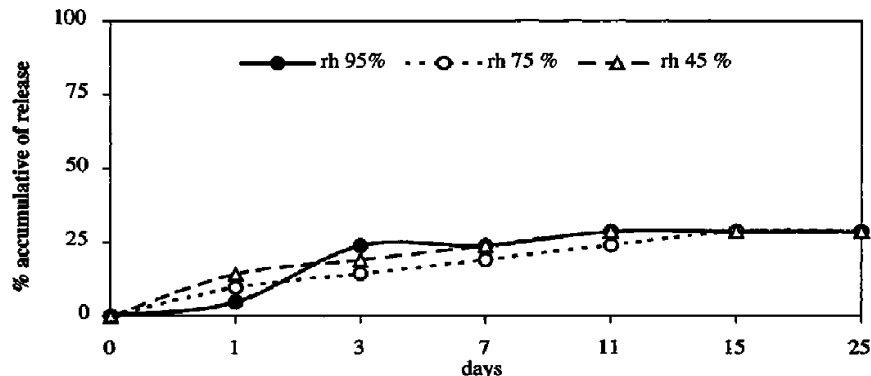


圖 9. 銀斑百里香精油在不同相對濕度下的釋放速率 (Sanna Passino et al., 2004)

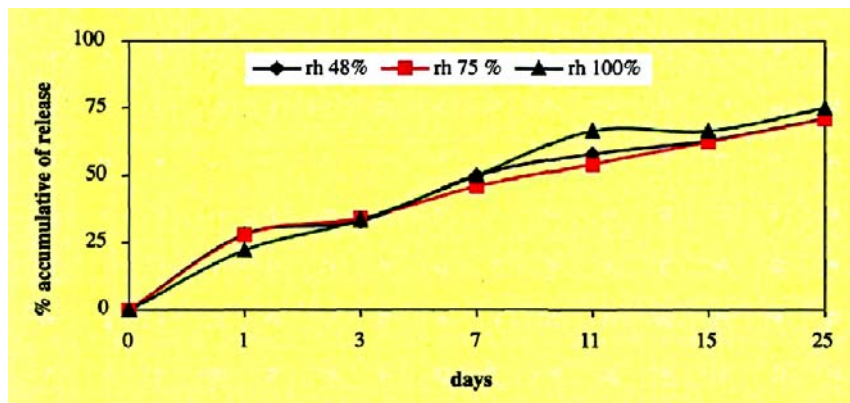


圖 10. 迷迭香精油在不同相對濕度下的釋放率 (Sanna Passino et al., 2004)

表 11. 食用精油微膠囊後對印度穀蛾幼蟲之影響 (Sanna Passino et al., 2004)

精油微膠囊	n*	死亡率平均值 (%)
迷迭香微膠囊	40	44.0b
銀斑百里香微膠囊	40	46.5b
控制組	8	7.5a
印度穀蛾幼蟲		
III-IV	20	28.0a
I-II	20	62.5b
精油微膠囊	n*	死亡率平均值 (%)

p<0.05 代表有顯著性的差異

*10隻幼蟲

表12顯示印度穀蛾 II-III 齡幼蟲暴露在微膠囊蒸氣下 7 days 的死亡率百分比，迷迭香的死亡率從 5% 至 17%，而銀斑百里香油的死亡率為 7~20%。但是在濃度 2.5 和 5.0% 時未顯示顯著性差異。

表 12. 印度穀蛾幼蟲在精油微膠囊蒸氣下暴露七天的死亡率 (Sanna Passino et al., 2004)

% of microcapsules with respect to the diet	Mortality (% ± s.e.)		
	1.0	2.5	5.0
迷迭香	5.0±0.9	12.5±0.8	17.5±1.5
銀斑百里香	7.5±0.8	15.0±1.3	20.0±0.9
對照組	0.0		

四、結論

試驗結果顯示，微膠囊適合用於包覆含不同化學成分的精油，其可降低活性的損失，並針對環境用藥提供保護，另外也可控制精油有效成分的釋放。在製備過程中，要確保被包覆之精油的組成化合物能夠不被改變。從釋放試驗的結果中可得知，微膠囊暴露於環境濕度時，活性成分會揮發，而因為測試的精油親水性的不同，會使得精油在釋放試驗中其釋放速率有所差異。實驗證實，銀斑百里香油中，極性化合物含量高，有利於將水相包覆在微膠囊內，並使其釋放速率較慢，而另一方面，迷迭香油中有高含量的低極性化合物，可能有利於更迅速的釋放。在 25 days 後，銀斑百里香微膠囊中仍含有約 75% 的精油，而迷迭香微膠囊則只有 25%，而如果微膠囊內有不同濃度的銀斑百里香和迷迭香精油，上述的影響會更明顯。經結果顯示微膠囊適合放置在密閉的環境中，而使用類似的方法製備合成農藥的微膠囊，因為可控制釋放活性成分，因此分別適用於速效和長效處理。

七種精油中，迷迭香和荷巴百里香精油對於舞毒蛾幼蟲之 LC50 較低，顯示其對於舞毒蛾幼蟲有影響，而將此兩種精油包覆於微膠囊後同樣能造成舞毒蛾的死亡。

而另一方面銀斑百里香和迷迭香油針對低齡印度穀蛾幼蟲 (I-II 齡) 較有影響力，在低濃度下死亡率高達 50%。添加不同微膠囊濃度於飼料中，可以發現在 5% 添加率下其死亡率高達 80%。從試驗中可知，微膠囊散發蒸氣接觸的毒性作用雖然較差，但這證實精油造成的毒性來源主要是微膠囊中釋放出活性成分於飼料上，幼蟲再攝食的結果。

鑑於這些令人鼓舞的結果，進一步的實驗正在進行

中，以評估活性成分包覆於微膠囊是否適合作為各種有害生物幼蟲的綜合防治配方。

五、參考文獻

1. Moretti, M. D. L., G. Sanna passion, S. Demontis, E. B. D. di Scienze del Farmaco, U. di Sassari and V. Muroi 2002 Essential Oil Formulations Useful as a New Tool for Insect Pest Control. American Association Of Pharmaceutical Scientists. 3 : 64-74
2. Sanna, P. G., E. Bazzoni and M. D. L. Moretti 2004 Microencapsulated essential oils active against indianmeal moth. Boletin di sanidad vegetal. 30 : 125-132
3. Allotey, J. and L. Goswami 1994 Damage caused to maize and groundnuts by the moths *Plodia interpunctella* (Hubn.) and *Ephestia cautella* (Wlk.) and control using local plant materials. Insect Science and its Application 15(3) : 323-329.
4. Grainge, M. and S. Ahmed 1988 Handbook of plants with pest-control properties. Wiley, New York.
5. Bouda, H., L. A. Tapondjou, D. A. Fontem and M. Y. D. Gumedzoe 2001 Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). Journal of Stored Products Research. 37(2) : 103-109.
6. Huang, M. Y., J. M. W. L. Tan, R. M. Kini and S. H. Ho 1997 Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais*. Journal of Stored Products Research. 33(4) : 289-298.
7. Lale N. E. S. and F. A. Ajayi 2000 Suppressing infestation of stored pearl millet *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. by *Tribolium castaneum* (Herbst) with insecticidal essential oils in Maiduguri, Nigeria. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 107(4) : 392-398.
8. Lee, B. H., W. S. Chol, S. E. Lee and B. S. Park 2001 Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). Crop Protection 20(4) : 317-320.
9. Padin, S., J. A. Ringuelet, D. Bello, E. L. Cerimele, M. S. Re, and C. P. Henning 2000 Toxicology and repellent activity of essential oils on *Sitophilus oryzae* L. and *Tribolium castaneum* Herbst. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants 7(4) : 67-73.
10. Tunc, I., B. M. Berger, F. Erler, and F. Dadli 2000 Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. Journal of Stored Products Research. 36(2) : 161-168.
11. Clancy, K. M., R. D. Foust, T. G. Huntsberger, J. G. Whitaker and D. M. Whitaker 1992 Technique for using microencapsulated terpenes in lepidopteran artificial diets. Journal of Chemical Ecology. 18(4) : 543-560.
12. Hamilton M. A., R. C. Russo and R. V. Thurston 1977 Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environmental Science & Technology 11(7) : 714-719.
13. Ulthee A, E. P. W. Kets and E. J. Smid 1999 Mechanisms of ac-tion of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology 65(10) : 4606-4610.
14. Knowless B. H. 1994 Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Advances in Insect Physiology 24 : 275-308.

* 蘇裕昌，國立中興大學森林學系教授

* Dr. Yu-Chang Su , Professor, Dept. of Forestry, National Chung-Hsing University

**鄒文心，中興大學森林學系碩士班研究生

**Wen-hsin Tsou, Master student, Dept. of Forestry, National Chung-hsing University.