

GC × GC/TOFMS 技术在皮暗斑螟性信息素研究中的应用

温秀军¹, 孙朝辉¹, KALINOVA Blanka², JIROŠ Pavel², 刘满光³

(1 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642; 2 捷克科学院生物有机化学研究所,
捷克 布拉格 16610; 3 河北省林业科学研究院, 河北 石家庄 050061)

摘要:通过收集皮暗斑螟 *Euzophera batangensis* 的处女雌蛾和雄蛾, 提取雌蛾性腺分泌物, 在室内通过气相色谱与触角电位测定相结合的方法, 测定皮暗斑螟雄蛾对来自雌蛾性腺的不同化合物的反应, 并应用全二维气相色谱飞行时间质谱分析技术(GC × GC/TOFMS), 弄清了皮暗斑螟性信息素组分为(Z9,E12)-十四碳-9,12-二烯-1-醇和(Z9)-十四碳-9-烯-1-醇. 研究过程发现, GC × GC/TOFMS 与传统气相色谱质谱(GC-MS)分析相比, 灵敏度和精度更高, 可以达到 0.01 ng/μL, 在昆虫信息素的研究中具有更大的优势.

关键词:皮暗斑螟; 性信息素; GC × GC/TOFMS

中图分类号:S767.33

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)02-0053-04

Studies on the Sex Pheromone of *Euzophera batangensis* by GC × GC/TOFMS Analysis

WEN Xiu-jun¹, SUN Zhao-hui¹, KALINOVA Blanka², JIROŠ Pavel², LIU Man-guang³

(1 College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic,

Prague 16610, Czech Republic; 3 Hebei Academy of Forestry Science, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract: Jujuba moth, *Euzophera batangensis* Caradja, is an important insect pest in jujube orchards. It may cause severe damage in jujube orchards and can attack many other plants, such as loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.), Horsetail Tree (*Casuarina equisetifolia* L.) and etc. The conventional gas chromatography with electroantennographic detection (GC-EAD) and two-dimensional (GC × GC) gas chromatography using a time-of-flight mass spectrometric detector (TOFMS), were combined to analyze the female sex pheromone gland extract of the borer. The GC-EAD analysis produced two EAD responses in GC areas where no compounds were detected by FID detection. The GC × GC/TOFMS analysis in this area indicated the presence of several chemicals, including (Z9,E12)-tetradeca-9,12-dien-1-ol and (Z9)-tetradec-9-en-1-ol, pheromone components closely related to *Euzophera* species. The spectral characteristics, retention behavior and the ability to elicit GC-EAD responses implied that both identified unsaturated alcohols were candidates for sex pheromone components of *E. batangensis*. The GC × GC/TOFMS facilitated the analysis of complex matrices in a high level and would be a great potential tool for analysis of insect pheromones.

Key words: *Euzophera batangensis*; sex pheromone; GC × GC/TOFMS

气相色谱(GC)及气质联用(GC-MS)分析方法广泛用于各种挥发性化合物的分析^[1-2]. 但当挥发物组成复杂, 且含量不均一时, 使用常规的 GC 与 GC-MS, 会出现分离能力不够, 低含量组分定性定量不准确的问题. 而多维色谱可以提高系统的分辨率与灵

敏度, 与质谱联用可以对组分进行准确的定性, 是复杂体系分离分析的好方法^[3-4]. 昆虫性信息素往往含量很低, 许多情况下一般的气相色谱质谱分析难以检测出其活性化合物成分^[5].

全二维气相色谱(GC × GC)是 20 世纪 90 年代诞

收稿日期:2008-05-12

作者简介:温秀军(1965—), 男, 教授, 博士, E-mail:wenxiujun@msn.com

基金项目:中捷政府间科技合作项目(38-14); 华南农业大学校长基金项目(4400-208012)

生的多维色谱分离技术,是把分离机制不同而又相互独立的2根色谱柱以串联方式连接在一起的二维系统^[6-7]. GC × GC 与 GC 相比具有分辨率高、峰容量大、灵敏度好、分析速度快和信息量大等优点^[8-10]. 飞行时间质谱(TOFMS)具有比常规的联用质谱仪更高的采集频率,可以很好地检测全二维气相色谱流出的信号. 全二维气相色谱/飞行时间质谱联用技术(GC × GC/TOFMS)凭借其高灵敏度、高分辨能力,能提供远多于一维 GC-MS 的样品信息,已被用于石油产品、精油、杀虫剂、中药挥发油、烟气等复杂体系领域的研究,且取得了满意的分析结果^[11-13]. 然而,目前在昆虫信息素化学成分分析中的应用还比较少^[14].

皮暗斑螟 *Euzophera batangensis* Caradja 属鳞翅目螟蛾科,分布我国,日本等亚洲国家也有分布,为害枣树、木麻黄、枇杷等多种林果树木^[15-16]. 近年来在我国枣树集中栽培区,皮暗斑螟危害严重,迫使农民每年使用剧毒农药多次涂抹甲口防治此虫,不仅成本高,而且污染环境. 应用性诱剂监测害虫发生和消长情况,具有灵敏度高、操作简便、无污染等特点. 我国已鉴定和合成了70多种害虫的性诱剂,有些已在测报和防治上大面积推广应用,但鲜见皮暗斑螟性信息素的研究报道. 本文应用 GC × GC/TOFMS 技术对皮暗斑螟性信息素进行了研究,初步弄清了该虫的雌性信息素组分.

1 材料与方法

1.1 虫源

由沧县朴寺枣园采集皮暗斑螟幼虫,带到捷克科学院生物有机化学研究所实验室进行饲养, $t_{\text{光照}}:t_{\text{黑暗}}$ 为 14:10,湿度为 70%~90%,在 15~25 °C 条件下用人工饲料喂养,直到化蛹. 把雌、雄蛹分开保存,羽化的雌成虫继续在恒温箱中饲养,雄成虫则转入 5 °C 条件下饲养,待用.

1.2 雌性腺分泌物提取

从羽化 1~2 d 的雌成虫中采集雌性腺(FE). 腺体的切除在喜暗结束期进行. 腺体切除前将雌成虫在 -20 °C 条件下至少冷冻 5 min,然后将雌性腺连同腹部第 7、8 体节一同切除,放入己烷中浸泡 2 h(每雌性腺 10 μL 己烷),提取物放在 -20 °C 条件下储存备用.

1.3 气相色谱-触角电位(GC-EAD)分析

用羽化 2~7 d 的雄成虫触角做 GC-EAD 试验. 将雌性腺提取物样品完整地注入装配有一个 DB-5 柱(生产商:J&W Scientific, Folsom, CA, USA;规格:长 30 m,内径 250 μm,膜厚 0.25 μm)的 5890A Hewlett-Paceard 气相色谱仪中. 柱中液体的分离由一个四臂 Graph-pack3D/2 分离器将洗提化合物输送到火焰离子化检测仪(FID)和触角电位仪(EAD). GC 柱箱起始

温度 50 °C(保持 2 min),以 10 °C/min 的速率升到 270 °C(保持 10 min). GC 进样口和检测器的温度分别设定为 200 和 260 °C. 将一组不同相对分子质量的正烷烃($C_{14} \sim C_{20}$, Sigma-Aldrich)与供试样品一同注入,以测定触角电位有反应的化合物的 Kovats 指数(I_K).

1.4 GC × GC/TOFMS 分析

GC × GC/TOFMS 分析在一台装配有静止四喷嘴低温调节器的 LECO Pegasus4D 设备上进行(生产商:LECO Corp., St. Joseph, MI, USA). 一个弱极性的 DB-5 柱用于 GC 的第 1 维. 第 2 维分析使用一个极性的 BPX-50 柱(生产商:SGE Inc., Austin, TX, USA;规格:长 2 m,内径 100 μm,膜厚 0.1 μm). 氮作为载体气体保持 1 mL/min 的流速. 主要 GC 炉的温度控制程序如下:50 °C 2 min,然后以 10 °C/min 的速率升至 300 °C,并在 300 °C 保持 10 min. 第 2 个 GC 炉的温度控制与第 1 个 GC 炉同步,但温度均高 5 °C. 各阶段之间调整期、高温脉冲持续期和低温时间分别设置为 3.0、0.4 和 1.1 s. 连接到 TOFMS 探测器源的传输线操作温度为 260 °C. 离子源温度为 250 °C,离子源电子能量 70 eV. 数据获得的扫描频率为 100 Hz,原子质量常量的范围为 29~400 u. 探测器电压为 1 750 V. 将 1 μL 样品一次性注入. 进样口温度为 200 °C. 在 60 mL/min 流速的条件下,净化时间为 60 s. 利用 LECO Chroma TOFTM 软件连续不断地对质谱数据进行 2D 和 3D 可视化处理分析. 与 GC-EAD 试验一样,将一组不同相对分子质量的正烷烃($C_{14} \sim C_{22}$, Sigma-Aldrich)与供试样品同时注入,以测定被测物的 Kovats 指数(I_K).

1.5 药品

分析用标准物在捷克科学院生物有机化学研究所实验室合成. 所有的标准物经过瞬间色谱仪提纯后,置于痕量分析用等级的己烷中保存,待用.

1.6 数量分析

为了测定系统探测的阈值,合成的(Z9,E12)-十四碳-9,12-二烯-1-醇(9Z,12E-14:OH)用己烷稀释为 0.01~2.00 ng/μL 的不同质量浓度后,各取 1 μL 注入 GC × GC/TOFMS 中进行分析. 人工地将各个峰综合起来,通过将峰区与相应的浓度标绘在一起,构建出一个校准曲线.

2 结果与分析

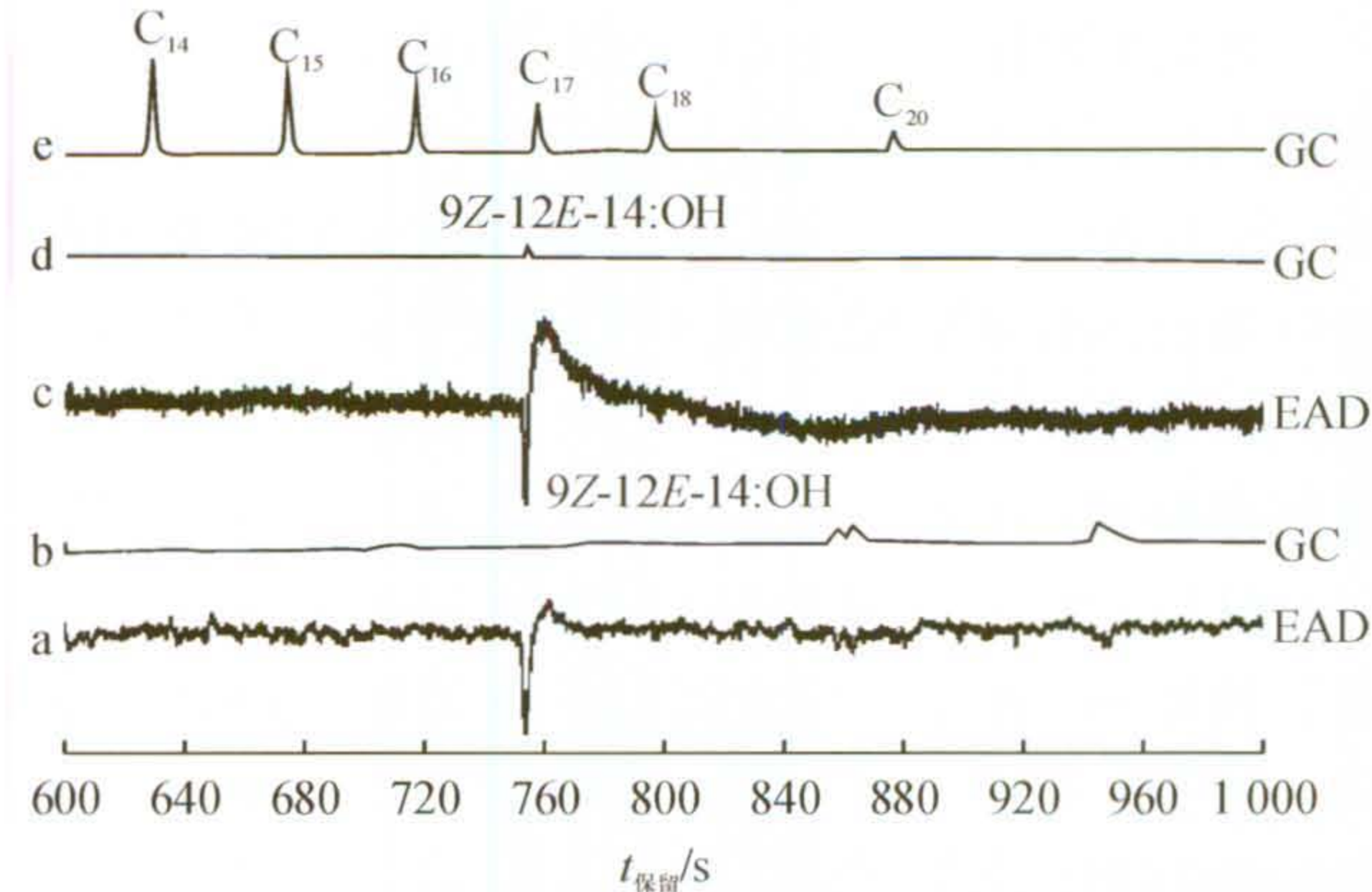
2.1 GC-EAD 分析

通过对皮暗斑螟 1 个雌性腺(1FE)提取物进行 GC-EAD 分析,结果清晰地显示出一个主要的 EAD 反应(图 1a). 但是引起 EAD 反应的活性物质在普通 GC 的 FID 中没有检测到(图 1b). 因为鳞翅目螟蛾科昆虫雌性激素通常含有 1 个或多个双键的直链

C₁₂ ~ C₁₄ 脂肪族酯、醇或醛类化合物,所以测定了 EAD 反应区的 Kovats 指数($I_{K,EAD}$),并将其与饱和及单不饱和的醇、酯和醛的 I_K 列表值比较. 使用 DB-5 柱测定的 $I_{K,EAD} = 1\ 681$ 与表中所列的 I_K 均不接近. 说明引起 EAD 反应的活性化合物与饱和或单不饱和的 C₁₂ ~ C₁₈ 醇、酯或醛之间没有关系. 这个结果表明活性化合物分子中可能存在额外的双键. 使用双不饱和合成标准物做进一步的 GC-EAD 试验,发现雌性腺提取物中未知化合物的 EAD 反应保留时间与合成化合物 9Z,12E-14:OH 的 EAD 反应保留时间完全一致(图 1c). 这个化合物已经在 *Euzophera* 属的其他种类和一些其他鳞翅目昆虫的信息素组分中发现过. 但是,提取物的一维 GC/MS 分析未能提供任何相关的质谱以确认对该物质的鉴定,因为 MS 信号被深深地埋藏在背景噪音之中.

2.2 GC × GC/TOFMS 分析

对 EAD 活性化合物区域的 GC × GC/TOFMS 分

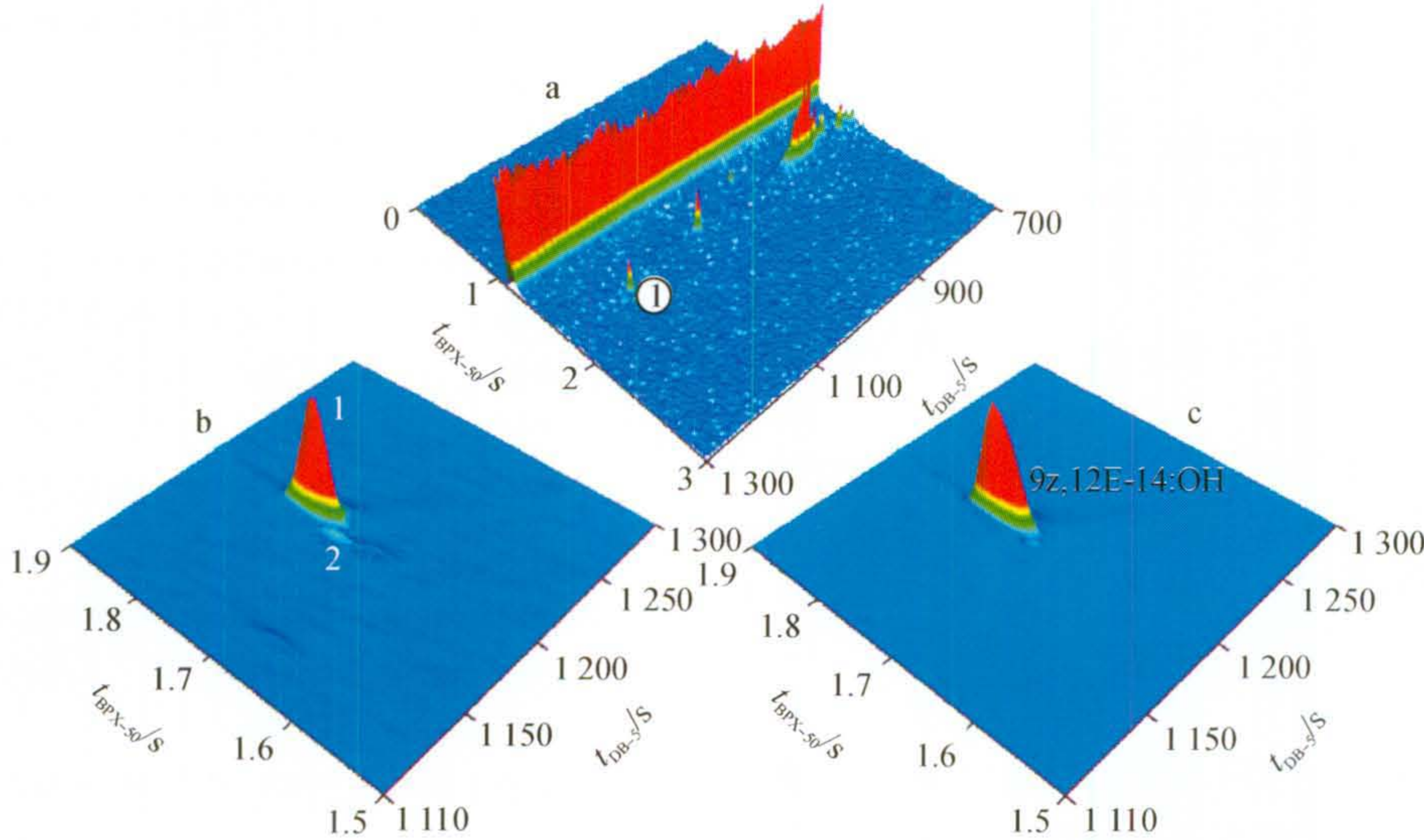


a, b: 皮暗斑螟 1 雌性腺的己烷提取物; c: 合成的 9Z,12E-14:OH (0.1 ng); d: 合成的 9Z,12E-14:OH (10 ng); e: C₁₄ ~ C₂₀ 正烷烃标准物

图 1 DB-5 柱的 GC-EAD/GC-FID 分析

Fig. 1 Sections of GC-EAD/GC-FID traces on DB-5 phase

析发现了包括 9Z,12E-14:OH 在内的几种化合物(图 2a). 图 2a 也显示出柱渗出物高“墙”,在一维 GC 分析中它可能掩盖了被测活性物的峰,但是,该



a: 皮暗斑螟 1 雌性腺提取物分析,其中,峰①对应的化合物为 9Z,12E-14:OH (NIST^[17], EAD 及保留时间); b: 雌性腺提取物 EAD 反应区的放大,其中,峰 1 示信息素的主要成分,峰 2 示 9Z-14:OH; c: 合成的 9Z,12E-14:OH (0.1 ng) EAD 反应区放大

图 2 GC × GC/TOFMS 3D 图

Fig. 2 GC × GC/TOFMS chromatograms (3D-surface plots)

峰在二维 GC × GC 试验中被很好地与背景噪声分离开了. 合成的 9Z,12E-14:OH 质谱和二维保留时间(图 2c、表 1)与雌性腺提取物中发现的活性成分完全一致. GC × GC/TOFMS 检测的 9Z,12E-14:OH 的阈值约为 0.01 ng(表 1). 这样的敏感性与 GC-EAD 的敏感性相当(0.01 ng 即可引起明显的 EAD

表 1 雌性腺提取物与标准物的参数分析
Tab. 1 Retention parameters of standards and extract of female pheromone gland

测定物	I_K (一维)	$t_{保留}/s$	
		DB-5 (一维)	BPX-50 (二维)
9Z-14:OH	1 676	1 188	1.700
9Z,12E-14:OH	1 681	1 194	1.750
提取物峰 2	1 676	1 190	1.711
提取物峰 1	1 681	1 194	1.761

反应). 在构建校准曲线的基础上进行定量分析测定,结果表明 1 个雌性腺中的 9Z,12E-14:OH 约为 0.1 ng(表 2).

表 2 9Z,12E-14:OH 检测阈值和雌性腺提取物定量分析
Tab. 2 9Z,12E-14:OH detection threshold and female pheromone gland quantitative analysis $n = 3$

化合物	$\rho/(ng \cdot \mu L^{-1})$	峰区(A)
9Z,12E-14:OH	2.000	198 667 ± 12 662
	1.000	96 782 ± 12 423
	0.500	40 336 ± 4 506
	0.100	9 737 ± 1 136
	0.010	937 ± 158
雌性腺提取物(1 FE)	0.115 ¹⁾	8 690

1) 该值为回归估计值, $A = (0.099\ 908 \pm 2.887)\rho - (2.842 \pm 2.961)$, $r^2 = 0.989\ 3$

对 EAD 活性区的 GC × GC/TOFMS 色谱的 3D 表面图区进行认真检查发现,除了 9Z,12E-14:OH 外(图 2b 峰 1,表 1),还有一种可能为信息素组分的物质出现在 9Z,12E-14:OH 稍微前面一点的地方(图 2b 峰 2,表 1).这种化合物的质谱和二维保留时间参数均与(9Z)-十四碳-9-烯-1-醇(9Z-14:OH)完全一致,说明皮暗斑螟的雌性信息素可能有 2 种组分.通过对合成的 9Z-14:OH(与 9Z,12E-14:OH 同时注入,图 1d 和 e)和浓度更高的雌性腺提取物(5FE,图 3)进行 GC-EAD 分析,结果证明了 9Z-14:OH 具有生理学功能.与 9Z,12E-14:OH 相比,10 ng 的 9Z-14:OH 引起的 EAD 反应虽然可以测出,但明显微弱.

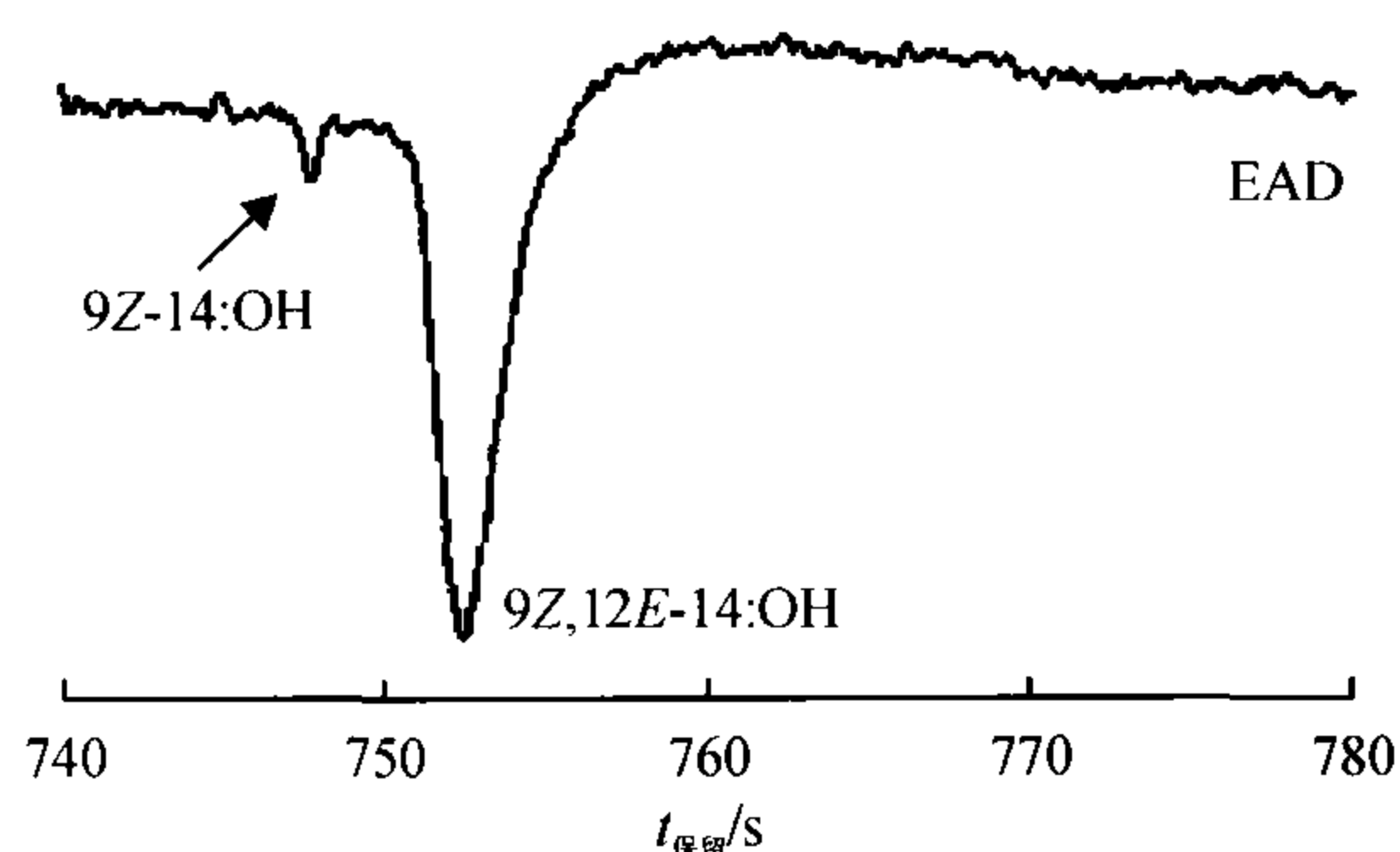


图3 皮暗斑螟雌性腺己烷浓缩后提取物(5 FE)的 GC-EAD/GC-FID 分析结果

Fig.3 Sections of GC-EAD/GC-FID traces; hexane extract of *Euzophera batangensis* female pheromone gland after concentration (5 FE)

3 结论

通过以上研究,可以初步得出结论:(1)全二维气相色谱/飞行时间质谱分析技术(GC × GC/TOFMS)较常用的普通气相色谱质谱分析技术(GC/MS)灵敏度和精度更好,在昆虫性信息素的研究中具有更大的优势;(2)皮暗斑螟雌性信息素可能包含 2 种化合物,主要成分是 9Z,12E-14:OH,其次为 9Z-14:OH.2 种组分相比,9Z,12E-14:OH 的触角电位反应较强,9Z-14:OH 反应较弱.关于皮暗斑螟性信息素的田间引诱效果以及在该虫预测预报和防治中的应用技术还有待于进一步的研究.

致谢:本研究主要试验分析工作在捷克科学院生物有机化学研究所天然活性产物中心实验室完成,研究过程中得到 Jan Žd'árek 博士和 Michal Hoskovec 博士的指导和帮助,在此深表感谢!

参考文献:

[1] PHILIP L. WYLIE. 吹扫-捕集/气相色谱/质谱分析水中挥发性有机化合物[J]. 环境化学, 2002, 21(2):

197-200.

- [2] 贺莉娟,梁逸曾,赵晨曦. 唇形科植物挥发油化学成分的 GC/MS 研究[J]. 化学学报, 2007, 65(3): 227-232.
- [3] 田晶,路鑫,杨军,等. 生物制药研究中的多维色谱[J]. 色谱, 2005, 23(1): 32-36.
- [4] 王丽春,徐伟箭,曾德金. 多维气相色谱法分析复杂组分高温气体[J]. 化学工业与工程技术, 2006, 27(2): 54-56.
- [5] 周维善,林国强. 昆虫性信息素的结构测定和手性昆虫信息素的合成[J]. 化学进展, 1990(3): 27-47.
- [6] VENKATRAMANI C J, XU J, PHILLIPS J B. Separation orthogonality in temperature-programmed comprehensive two-dimensional gas chromatography [J]. Anal Chem, 1996, 68: 1486-1492.
- [7] 鹿洪亮,赵明月,刘惠民,等. 全二维气相色谱/质谱的原理及应用综述[J]. 烟草科技, 2005(3): 22-25.
- [8] BLOMBERG J, SCHOENMAKERS P J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC) and its application to the characterization of complex (petrochemical) mixture [J]. J High Resolut Chromatogr, 1997, 20: 539-544.
- [9] DALLÜGE J, VREULS R J J, BEENS J, et al. Optimization and characterization of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection [J]. J Sep Sci, 2002, 25: 201-214.
- [10] 许国旺,叶芬,孔宏伟,等. 全二维气相色谱技术及其进展[J]. 色谱, 2001, 19(2): 132-136.
- [11] DEURSEN M, BEENS J, REIJENGA J, et al. Group-type identification of oil samples using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a time of flight mass spectrometer [J]. J High Resol Chromatogr, 2000, 23: 507-510.
- [12] DALLÜGE J, VAN RIJN M, BEENS J, et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection applied to the determination of pesticides in food extracts [J]. J Chromatogr A, 2002, 965: 207-217.
- [13] 鹿洪亮,赵明月,刘惠民,等. 全二维气相色谱飞行时间质谱分析烤烟半挥发性中性化学成分[J]. 中国烟草学报, 2007, 13(1): 20-24.
- [14] 孔祥波,张真,王鸿斌,等. 松毛虫性信息素微量成分鉴定方法的研究[J]. 色谱, 2005, 23(4): 370-373.
- [15] 黄金水. 木麻黄皮暗斑螟的发生与综合防治技术研究[J]. 林业科学, 1995, 31(5): 421-427.
- [16] 杨振江. 皮暗斑螟生物学特性及防治[J]. 昆虫知识, 1995, 32(6): 340-342.
- [17] The National Institute of Standards and Technology (NIST). NIST Chemistry WebBook-NIST Standard Reference Database Number 69 [EB/OL]. (2006-04-30) [2006-05-18]. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>.

【责任编辑 李晓卉】