

## 松毛虫性信息素共轭双键定位方法的研究

孔祥波<sup>1,2</sup>, 赵成华<sup>2</sup>, 张 真<sup>1</sup>, 王鸿斌<sup>1</sup>

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100080)

**摘要** : 亲二烯体试剂 4-甲基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮(MTAD)与共轭二烯成分形成衍生物,经气相色谱-质谱分析,衍生物质谱图中各种特征碎片离子简单、明显,可用于确定共轭双键在碳链中的位置。以鉴定云南松毛虫性信息素腺体成分的共轭双键位置为例,进一步探讨了反-5-,顺-7-十二碳二烯醇及相应的醛和乙酸酯与 MTAD 形成衍生物的化学反应特点及色谱分析中应注意的问题。

**关键词** : 4-甲基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮;共轭双键;气相色谱-电子轰击质谱;性信息素;云南松毛虫  
**中图分类号** : O658      **文献标识码** : A      **文章编号** : 1000-8713(2004)02-0097-04

## Determination of Double Bond Position in Conjugated Dienes in Sex Pheromones of *Dendrolimus* SPP.

KONG Xiangbo<sup>1,2</sup>, ZHAO Chenghua<sup>2</sup>, ZHANG Zhen<sup>1</sup>, WANG Hongbin<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091; 2. Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** : The dienophile 4-methyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (MTAD) adducts of conjugated diene compounds were used to locate the position of the conjugated double bonds in the parent compounds by high-resolution gas chromatography and electron impact mass spectrometry. Their mass spectra are marked by recognizable molecular ions and abundant diagnostic ions that allow the determination of the diene position. With the identification of the sex pheromone gland extracts of Yunnan pine caterpillar moth *Dendrolimus houi* as an example, the characteristics of reaction of (*E*/*Z*)-5,7-dodecadien-1-ol (*E*5,*Z*7-12 :OH) and its corresponding aldehyde and acetate with MTAD are discussed. Potential problems in gas chromatographic analysis are also discussed.

**Key words** : 4-methyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione; conjugated dienes; gas chromatography-electron impact mass spectrometry; sex pheromone; *Dendrolimus houi*

鳞翅目蛾类昆虫的一大类信息化学物质一般由含有 10 ~ 18 个偶数碳原子的直链醇、醛、酯化合物组成,碳链上含有 0 ~ 3 个双键,如含有 2 个双键,则多以共轭的方式存在<sup>[1]</sup>。信息化学物质的位置异构体、几何异构体、光学异构体的细微差异,都能导致其生物活性的很大改变<sup>[2,3]</sup>。例如,为了降低共轭二烯类信息化学物质在自然条件下发生异构化和以过氧化物的形式转变成呋喃体系的量,保持其持久的生物活性,通常在诱芯中加入紫外光吸附剂 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮和抗氧化剂丁基羟基苯甲醚或 2,6-二叔丁基对甲酚<sup>[4]</sup>。在鉴定蛾类昆虫的信息化合物时,确定双键在碳链中的位置是非常重要的。由于气相色谱分析双键位置不同的化合物可能有相同的色谱保留时间,电子轰击产生的质谱碎

片峰并不能确定烯烃分子中双键位置异构体(因为在裂解过程中往往发生双键位移),而采用异丁烷化学电离质谱分析方法确定共轭双键位置时,产生的特征离子碎片峰不明显且对酯类化合物分析效果不理想<sup>[5]</sup>,因此需要利用微量化学反应的方法结合质谱分析进行昆虫信息化学物质的双键定位。经典的确定双键位置的微量化学反应方法如臭氧解<sup>[6,7]</sup>、高碘酸氧化<sup>[8]</sup>以及与二甲二硫化物反应<sup>[9,10]</sup>等都存在样品前处理复杂(容易造成分析样品的严重损失)、反应时间长或质谱分析的特征离子不明显、杂质峰干扰严重等问题,因此这些方法不适宜鉴定共轭二烯化合物的双键位置。

已鉴定的几种松毛虫(鳞翅目枯叶蛾科松毛虫属)性信息素成分含量低,共同的化学结构特点是

在碳链的 5 位、7 位形成共轭双键,不同的是末端官能团及顺反异构体的差异<sup>[11-14]</sup>。同属昆虫的性信息素成分具有结构上的相似性。在鉴定松毛虫属其他种松毛虫性信息素成分时,为了确定性信息素腺体成分的共轭双键位置,我们需要一种样品前处理不复杂且用量少、反应快捷、灵敏度高的共轭双键定位方法。本文利用 4-甲基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮(MTAD)与共轭二烯化合物易于发生 Diels-Alder 环加成反应这一特点,并结合电子轰击质谱分析技术,鉴定了云南松毛虫性信息素腺体成分的共轭双键位置,并介绍了 MTAD 与反-5-,顺-7-十二碳二烯醇及相应的醛和乙酸酯的化学反应特性及各自的质谱特征。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验昆虫

云南松毛虫虫茧采自云南省镇沅县,寄主是云南松和思茅松。虫茧置于 16 h 光期、8 h 暗期,在 24~26 °C 和 70%~80% 相对湿度条件下待其羽化后,雌雄蛾立即分开。云南松毛虫雌蛾进入暗期 2 h,在其求偶召唤的高峰期进行性信息素腺体成分的提取。

### 1.2 性信息素腺体成分的提取

用手轻轻挤压雌蛾腹部,迫使其伸出性信息素腺体,用镊子将腺体取下,置于滤纸上并用镊子轻轻挤压去除体液及脂肪体。然后将腺体放入微型尖底玻璃管中,注入 10  $\mu\text{L}$  重蒸的正己烷,浸提 20~30 min。全部浸提液用 10  $\mu\text{L}$  注射器转移到干净的玻璃管中,用微弱的氮气流浓缩至少于 2  $\mu\text{L}$ 。浸提液直接与 MTAD 进行衍生化反应。

### 1.3 标样及性信息素腺体成分与 MTAD 的衍生化反应

向顺-5-,反-7-十二碳二烯醇及相应的醛和乙酸酯 3 种标准化合物(Chemtech B V, Amsterdam, The Netherlands)的混合物以及云南松毛虫性信息素腺体的正己烷提取物中分别加入 4  $\mu\text{L}$  MTAD 的二氯甲烷溶液(质量浓度为 1 g/L),室温条件下反应 30 min,粉红色的反应溶液在微弱的氮气流下浓缩至少于 2  $\mu\text{L}$ ,直接进样进行气相色谱(GC)或 GC-质谱(GC-MS)分析。

### 1.4 衍生物的气相色谱分析

标样的 MTAD 衍生物或性信息素腺体成分的 MTAD 衍生物在 HP5890 Series II GC 仪上进行分析。氮气作载气,无分流进样(0.75 min 后开阀),检测器为火焰离子化检测器(FID)。分析条件是:HP-5 毛细管柱(30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ),以

12 °C/min 的升温速率从 80 °C 升至 260 °C,保持 30 min,进样器温度 300 °C,检测器温度 300 °C,柱头压力 100 kPa。应用 HP3365 Series II Chemstation (for HP Vectra, IBM PC, and compatible software products of USA)软件进行数据采集及处理。

### 1.5 衍生物的气相色谱-质谱分析

标准化合物及云南松毛虫(12 雌虫当量)腺体成分的 MTAD 衍生物在 Finnigan Trace2000-Voyage 型 GC-MS 仪(70 eV)上分析(软件 WindowsNT/Xcalibur)。分析条件如下:HP-1 毛细管柱(50 m  $\times$  0.2 mm  $\times$  0.33  $\mu\text{m}$ ),以 15 °C/min 的升温速率从 80 °C 升至 280 °C,保持 20 min。全扫描( $m/z$  41~401),每 0.5 s 扫描一次。无分流进样(1 min 后开阀),5 min 后开始数据采集。氦气为载气,流速是 0.6 mL/min。进样器温度是 280 °C,界面温度是 250 °C,离子源温度是 200 °C,灯丝电流是 150  $\mu\text{A}$ ,检测器电压是 350 V。

## 2 结果与分析

顺-5-,反-7-十二碳二烯醛及相应的醇和乙酸酯 3 种标准化合物在 HP-5 色谱柱上的保留时间分别为 7.033,7.835 和 9.154 min;而其 MTAD 衍生物在同样分析条件下分别形成 3 个色谱峰,峰形与 3 种标准化合物一致,色谱保留时间分别为 15.161,15.744 和 16.671 min(见图 1)。MTAD 与共轭二烯化合物生成的衍生物的分子质量是两者之和,极性很强,使衍生物的气相色谱保留时间延长。当性信息素腺体成分与 MTAD 发生衍生化反应时,由于衍生物的色谱峰已迁移到受其他杂质干扰较小的区域,所以可以不必对腺体提取物进行样品前处理而直接与 MTAD 反应,这降低了分析样品的损耗,可

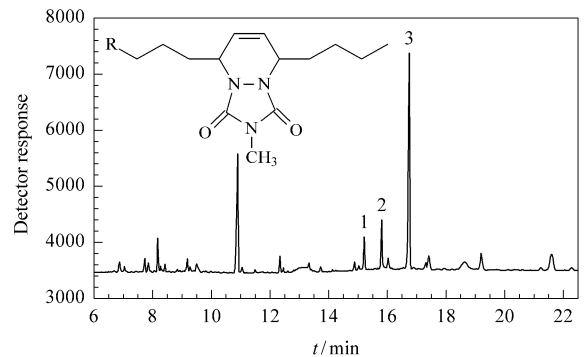


图 1 顺-5-,反-7-十二碳二烯醛及相应的醇和乙酸酯标准品与 MTAD 形成的衍生物在 HP-5 毛细管柱上分析的气相色谱图

Fig.1 Gas chromatogram of MTAD adducts of (*Z*/*E*)-5,7-dodecadienal and its corresponding alcohol and acetate on an HP-5 capillary column

1. R = CHO; 2. R = CH<sub>2</sub>OH; 3. R = CH<sub>2</sub>OAc.

用于微量样品的分析。在 MTAD 过量、反应时间充足(最长 90 min)的条件下,衍生化反应完全,未检测到剩余的未参与反应的醇、醛、酯化合物。该衍生化反应快捷,产物具有较高的 FID 及 MS 响应,醛、醇和酯 3 种标准化合物的进样量分别为 0.5、1.6 和 2.2 ng。

云南松毛虫性信息素腺体成分的 MTAD 衍生物的总离子流质谱图(图 2)表明,在保留时间 18.45 和 19.80 min 处分别发现 5,7-十二碳二烯醇及相应的乙酸酯与 MTAD 形成衍生物的色谱峰(共轭化合物的 4 种立体异构体与 MTAD 形成的衍生物具有相同的质谱图)。云南松毛虫性信息素腺体提取物在不同极性毛细管柱上的气相色谱分析发现了反-5-,顺-7-十二碳二烯醇及相应的醛和乙酸酯 3 种腺体成分,但在其 MTAD 衍生物的质谱分析中未发现相应的醛与 MTAD 形成衍生物的色谱峰。

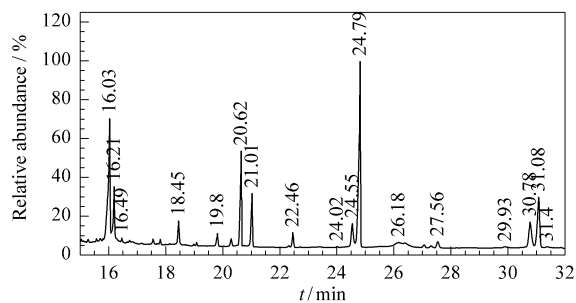


图 2 云南松毛虫性信息素腺体成分与 MTAD 形成衍生物的总离子流质谱图

Fig. 2 Total ion chromatogram of MTAD adducts of sex pheromone gland extracts of *D. houii*

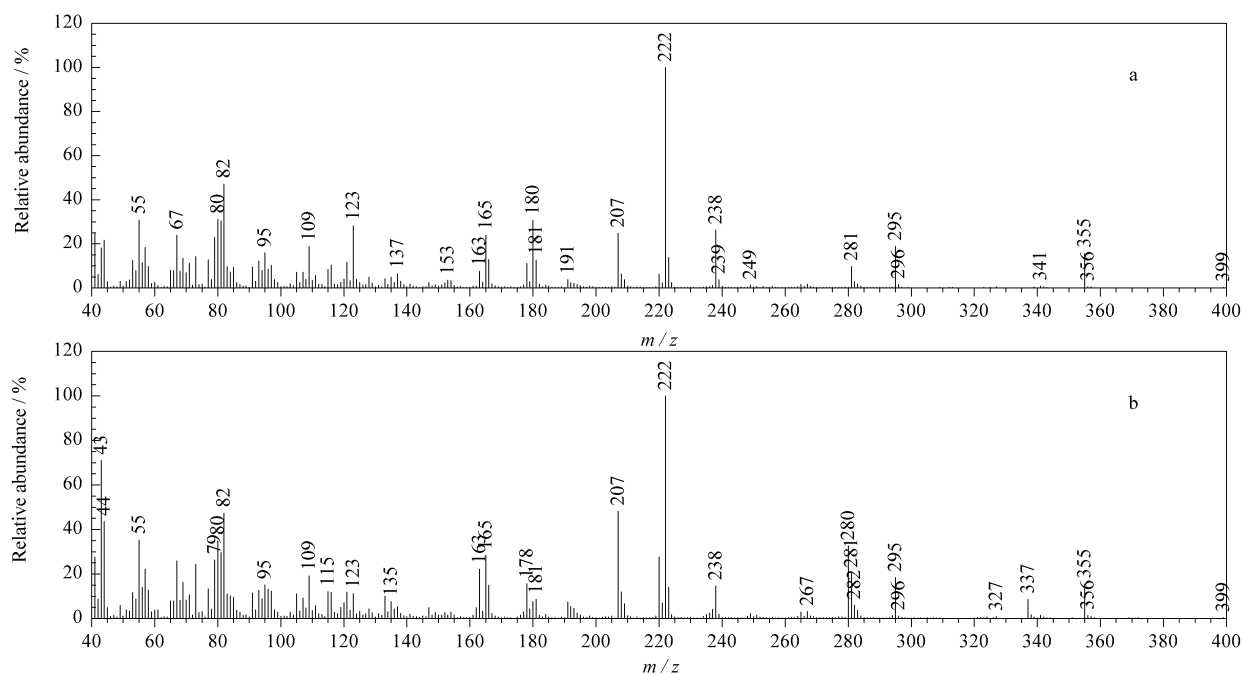


图 3 云南松毛虫性信息素腺体成分与 MTAD 形成衍生物的质谱图

Fig. 3 Electron impact mass spectra of MTAD derivatives of conjugated dienes from pheromone gland extracts of *D. houii*

a. MTAD derivative of (*E,Z*)-5,7-dodecadien-1-ol; b. MTAD derivative of (*E,Z*)-5,7-dodecadien-1-yl acetate.

云南松毛虫性信息素腺体成分的 MTAD 衍生物被电子轰击形成的质谱图特征性强(见图 3)。在 18.45 min 处的化合物分子离子峰是  $m/z$  295 ( $M^{+}$ , 相对丰度 7%), 比较明显; 基峰是  $m/z$  222 ( $[M-73]^{+}$ , 相对丰度 100%), 这主要是由共轭二烯体系一端的烃基侧链断裂形成, 采取何种断裂方式是由烃基侧链的碳原子数目决定的; 第三主要特征离子峰是  $m/z$  165 ( $[222-CH_3NCO]^{+}$ , 相对丰度 26%), 它主要是从基峰碎片离子上进一步裂解下异氰酸甲酯( $CH_3NCO$ )碎片形成的, 这种断裂是由于共轭体系张力和带正电荷的亚氨基不稳定势能的释放造成的; 其他主要特征离子是  $m/z$  238 ( $[M-57]^{+}$ , 相对丰度 25%) 和 181 ( $[238-CH_3NCO]^{+}$ , 相对丰度 12%) (图 3-a); 各种特征碎片离子的相对丰度与反-5-, 顺-7-十二碳二烯醇和 MTAD 形成的衍生物的质谱特征碎片离子的相对丰度一致。在进行质谱图分析时, 只要找到相对分子质量相差 57( $CH_3NCO$ ) 的两个特征离子峰, 然后以分子离子峰的相对分子质量(295)减去基峰的相对分子质量(222), 就能准确判断出该化合物的共轭双键位于碳链的 5 位、7 位。同理, 在 19.80 min 处的化合物有明显的分子离子峰  $m/z$  337 ( $M^{+}$ , 相对丰度 8%), 基峰是 222 ( $[M-115]^{+}$ ), 其他特征碎片离子是  $m/z$  280 ( $[M-57]^{+}$ , 相对丰度 20%)、223 ( $[280-CH_3NCO]^{+}$ , 相对丰度 14%) 和 165 ( $[222-CH_3NCO]^{+}$ , 相对丰度 30%), 这些特征碎

片离子的相对丰度与反-5-、顺-7-十二碳二烯乙酸酯和 MTAD 形成的衍生物的质谱特征碎片离子相对丰度一致(图 3-b)。根据这些特征碎片离子能准确判定性信息素腺体中该化合物的共轭双键位于碳链的 5 位、7 位。

### 3 讨论

亲二烯体化合物 4-甲基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮与松毛虫性信息素腺体成分中的共轭二烯化合物在室温条件下很容易发生 Diels-Alder 环加成反应<sup>[15-18]</sup>,形成的衍生物色谱峰峰形良好。色谱分析发现,由于形成的衍生物相对分子质量比性信息素腺体成分中共轭二烯化合物的相对分子质量大,为了使相对分子质量大的化合物更容易气化和检测,需将气相色谱进样器温度设为 280~300℃,检测器温度设为 300℃;另外,由于形成的衍生物有很强的极性,因此需要用非极性毛细管色谱柱分析衍生物,且非极性色谱柱对极性强的样品进行分析不宜产生拖尾现象,这样才有利于微量成分的分析。虽然在云南松毛虫性信息素腺体提取物中发现了反-5-、顺-7-十二碳二烯醛成分,但腺体成分与 MTAD 形成衍生物的总离子流质谱图中未观察到明显的醛的衍生物色谱峰(见图 2)。这是由于虽然 MTAD 在室温条件下与脂肪族共轭二烯化合物亲和力强、反应迅速,但是乙酸酯最易反应(10 min),醇类次之(15~20 min),而醛类反应较慢,常需较长时间(90 min)。另外,腺体提取物的气相色谱分析发现反-5-、顺-7-十二碳二烯醛化合物在腺体中的含量最少。对乙酸酯和醇类化合物,其在腺体中的含量为 1 ng 或小于 1 ng 即可获得明显的 MTAD 衍生物的色谱峰,但醛类往往需要 2~3 ng。这说明在 3 类化合物共存的腺体提取物中,醛类化合物需要更高含量才能发现其明显的衍生物色谱峰及分子离子峰。还可能是由于所配制的 MTAD 溶液部分发生了水解(MTAD 溶液必须放在干燥器中避光保存),致使 MTAD 成分中的 N=N 双键变为 N—N 单键,导致其与醛衍生化反应效果不好。分析性信息素腺体成分与 MTAD 形成衍生物的质量色谱图,发现醛与 MTAD 生成衍生物的 4 种特征离子  $m/z$  222, 165, 179 和 236 在 16.03 min 处均有色谱峰出现,且 4 种特征离子的积分面积之比为 5.3: 3.5: 2.2: 1,这与反-5-、顺-7-十二碳二烯醛与 MTAD 生成衍生物的 4 种特征离子保留时间相同,积分面积比基本一致(6.0: 3.9: 2.1: 1),这可以确认性信息素腺体提取物中含有醛的成分且共轭双键位于 5 位、7 位;但由于醛与 MTAD 形成衍生物分子离子峰很弱,

质量色谱分析时亦未发现其分子离子峰  $m/z$  293。

由于衍生物的色谱保留时间延长,其色谱峰已迁移到受其他杂质干扰较小的区域,所以在进行双键定位时,不需像其他方法那样纯化待分析样品。质谱分析时,衍生物分子离子峰易于识别,易于推测共轭二烯成分的相对分子质量;决定共轭二烯化合物双键位置的特征离子简单、明显,根据质谱的特征碎片离子能够很容易地确定性信息素成分中共轭双键的位置。这种微量的衍生化反应方法结合生物测定可进一步确认云南松毛虫性信息素腺体中生物活性物质的存在。

致谢 感谢美国加利福尼亚大学昆虫系 Jocelyn G. Millar 教授提供 4-甲基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮(MTAD)试剂。

### 参考文献:

- [1] Arn H, Tóth M, Priesner E. The Pherolist. <http://www.nysaes.cornell.edu/pheronet/>
- [2] Silverstein R M. In: Ritter F J, ed. Chemical Ecology: Odour Communication in Animals. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979. 133
- [3] Mori K. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60(12): 1925
- [4] Ideses R, Shani A. J Chem Ecol, 1988, 14(8): 1657
- [5] Doolittle R E, Tumlinson J H, Proveaux A. Anal Chem, 1985, 57: 1625
- [6] Jain S C, Dussourd D E, Conner W E, Eisner T, Guerrero A, Meinwald J. J Org Chem, 1983, 48: 2266
- [7] Hill A S, Kovalev B G, Nikolaeva L N, Roelofs W L. J Chem Ecol, 1982, 8(2): 383
- [8] Ohmasa Y, Wakamura S, Kozai S, Sugie H, Horiike M, Hirano C, Mori S. Appl Ent Zool, 1991, 26(1): 55
- [9] Buser H, Arn H, Guerlin P, Rauscher S. Anal Chem, 1983, 55: 818
- [10] Dunkelblum E, Tan S H, Silk P J. J Chem Ecol, 1985, 11(3): 265
- [11] Ando T, Vu M H, Yoshida S, Takahashi N, Tatsuki S, Katagiri K, Yamane A, Ikeda T, Yamazaki S. Agric Biol Chem, 1982, 46(3): 709
- [12] Priesner E, Bogenschutz H, Albert R, Reed D W, Chisholm M D. Z Naturforsch, 1984, 39c: 1192
- [13] Kong Xiangbo, Zhao Chenghua, Gao Wei. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(24): 2077
- [14] Kong Xiangbo, Zhao Chenghua, Sun Yongping, Feng Shiqiang, Wu Haishan. Acta Entomologica Sinica ( 孔祥波, 赵成华, 孙永平, 冯世强, 吴海山. 昆虫学报 ), 2003, 46(2): 131
- [15] Young D C, Vouros P, Holick M F. J Chromatogr, 1990, 522: 295
- [16] McElfresh J S, Millar J G. J Chem Ecol, 1999, 25(4): 687
- [17] McElfresh J S, Millar J G. J Chem Ecol, 1999, 25(5): 1067
- [18] McElfresh J S, Millar J G. J Chem Ecol, 1999, 25(11): 2505