

松毛虫性信息素微量成分鉴定方法的研究

孔祥波¹, 张 真¹, 王鸿斌¹, 赵成华²

(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 :采用气相色谱-质谱分析确认了顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯是思茅松毛虫性信息素腺体的主要成分(次要成分由于含量极微且受杂质干扰,未能获得全扫描质谱图)。利用高分辨率毛细管气相色谱分析了思茅松毛虫性信息素腺体提取物的酯基转移和乙酰化反应的衍生物,进一步确认了顺-5-,反-7-十二碳二烯醇是思茅松毛虫性信息素腺体中的微量成分。探讨了功能团相互转换微量化学反应法鉴定松毛虫性信息素腺体中微量成分功能团和立体构型的优点。强调了性信息素微量成分鉴定工作在昆虫化学通讯系统研究中的重要性。

关键词 :毛细管气相色谱;气相色谱-质谱;微量化学反应;性信息素;微量成分;思茅松毛虫

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)04-0370-04

Study on Trace Component in Sex Pheromones of *Dendrolimus* spp.

KONG Xiangbo¹, ZHANG Zhen¹, WANG Hongbin¹, ZHAO Chenghua²

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

Abstract : Two compounds were isolated, as sex pheromone components, from the abdominal tips of the female pine caterpillar moth, *Dendrolimus kikuchii*. The major component was identified as (*Z,E*)-5,7-dodecadien-1-yl acetate by gas chromatography and mass spectrometry. There are some difficulties to elucidate the structure of the minor component due to its trace and coelution with other components. The derivatives of alkaline methanolysis and reacetylation of pheromone gland extracts of *D. kikuchii* were analyzed by high-resolution gas chromatography, which was performed to verify the functional group and stereo isomers of the trace component in the pheromone gland extracts. The trace component was characterized as (*Z,E*)-5,7-dodecadienol via microchemical reaction. The advantages of the conversion of acetates to corresponding alcohols or of alcohols to the corresponding acetates in identifying the trace component of pheromone gland extracts of *D. kikuchii* were discussed. The importance of identifying the trace component in pheromone chemical communication system of insects is emphasized.

Key words : capillary gas chromatography; gas chromatography-mass spectrometry; microchemical reaction; sex pheromone; trace component; *Dendrolimus kikuchii*

昆虫性信息素收集技术是性信息素结构鉴定中非常关键的一步,采用不同的收集技术(如溶剂提取^[1]、气味收集^[2]和固相微萃取^[3]等)都是为了获得含量最大、成分最全且杂质干扰尽可能少的性信息素成分。但是由于有些昆虫性信息素成分,特别是微量成分,在腺体中的含量极微,且可能具有多种异构体,因而极大地限制了性信息素的结构鉴定工作。随着分辨能力强且分析灵敏度高的毛细管气相色谱(CGC)、气相色谱-质谱(GC-MS)技术的发展,

其在昆虫性信息素结构鉴定工作中得到了广泛应用。但是仅依靠高灵敏度的分析仪器来鉴定昆虫性信息素,还不能完全解决性信息素成分的功能团、双键位置鉴定等^[4,5]问题。通过微量化学反应(如皂化(羰基)、酰化(羟基)、苯肼试验(醛基)、加氢(双键)、加成反应(双键)等)可将昆虫性信息素腺体提取物衍生化,利用气相色谱可测定色谱峰漂移或消失,或利用质谱进一步对腺体成分定性。将仪器分析和微量化学反应有机结合起来,互相补充,可极大

地提高性信息素成分结构鉴定的准确性,特别是对微量成分的定性分析。在昆虫的化学通讯系统中,微量成分虽然含量极微,但其在昆虫的繁殖、近缘种的生殖隔离等方面可能具有重要的生物学功能,因此阐明性信息素的微量成分具有重要的生物学意义。

松毛虫属昆虫性信息素有一个共同特点,即性信息素分子具有顺-5-,反-7-十二碳二烯的碳架结构,碳链末端具有醇、醛或酯的功能团^[1,6-9]。本文以思茅松毛虫性信息素微量成分鉴定为例,首先利用质谱确认其性信息素腺体中的主要成分是顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯,再根据松毛虫属昆虫性信息素分子的结构特点,应用酯基转移和乙酰化反应微量化学分析方法,确认了思茅松毛虫性信息素腺体成分中微量成分的功能团和立体构型,同时阐明了性信息素微量成分鉴定的重要性。

1 材料和方法

1.1 性信息素腺体成分的提取

思茅松毛虫处女雌蛾进入暗期6~7 h后,选取正在求偶召唤的雌蛾,用镊子将其性信息素腺体取下。将去除了体液的腺体放入微型尖底玻璃管中,注入10 μL重蒸正己烷进行浸提。为保证浸提液体积不减少,将微型尖底玻璃管放入带密封螺帽的样品瓶内,并在瓶内注入50 μL重蒸正己烷。20~30 min后将全部浸提液用10 μL注射器转移到干净的微型玻璃管中,用微弱的氮气流将其浓缩至2 μL,然后进行气相色谱、气相色谱-质谱分析或微量化学反应。

1.2 标准化合物的准备

已鉴定的松毛虫性信息素成分和顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯及其他3种立体异构体的标准品购自荷兰的Chemtech BV公司。将其他松毛虫性信息素成分和顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯4种立体异构体样品分别配成一定浓度的混合标样进行GC和GC-MS分析。在相同的分析条件下,通过比较思茅松毛虫性信息素腺体提取物成分与标样在毛细管柱上的色谱保留时间或质谱图来确定性信息素腺体成分及其立体异构体。

1.3 性信息素腺体成分的衍生化反应

(1)酯基转移:用微弱的氮气流将性信息素腺体提取物(14个雌虫当量,14 FE)中的溶剂吹干后,加入15 μL 0.5 mol/L甲醇-氢氧化钾溶液,室温条件下反应0.5 h后加入15 μL 1 mol/L盐酸水溶液进行中和;加入20 μL重蒸的正己烷进行萃取,萃取2次,合并萃取液;加入20 μL蒸馏水进行水洗;回

收正己烷相,用无水Na₂SO₄干燥12 h,浓缩至4 μL。取1 μL进行GC分析。

(2)乙酰化反应:用微弱的氮气流将上述发生酯基转移后留下的3 μL正己烷萃取物中的溶剂吹干后,加入20 μL乙酰氯,室温条件下乙酰化反应20 min。再用微弱的氮气流将乙酰化反应液中的溶剂吹干(吹至基本上无乙酰氯气味止);加入2 μL重蒸的正己烷溶解残留物,将溶解液全部用于GC分析。

1.4 GC及GC-MS分析

性信息素腺体提取物(2个雌虫当量,2 FE)及其衍生物(14 FE)和标准化合物均在HP5890 Series II GC上分析。氮气作载气,无分流进样(0.75 min 开阀);检测器为火焰离子化检测器(FID)。分析条件:BP-20毛细管柱(极性柱,25 m × 0.22 mm i. d. × 0.25 μm,SGE公司,澳大利亚)程序升温80 °C下保持1 min,以10 °C/min的速率升至200 °C,保持30 min;进样器温度250 °C,检测器温度280 °C。应用HP3365 Series II Chemstation软件采集数据。性信息素腺体提取物(2 FE)及标准品的质谱分析在Finnigan Voyager质谱仪(与Trace 2000气相色谱仪连接)上进行。GC条件与前述GC条件相同,MS条件为:在电子轰击离子源(70 eV)条件下进行全扫描质谱分析,氮气作载气,流速1.0 mL/min,无分流进样,进样器温度为220 °C,离子源温度为200 °C,界面温度为200 °C。用Windows NT Xcalibur软件进行数据的采集和分析。

2 结果与分析

用高分辨毛细管气相色谱分析思茅松毛虫性信息素腺体提取物(2 FE)和松毛虫属其他昆虫性信息素成分标样,发现性信息素腺体提取物在13.028 min处的色谱峰(见图1)是顺-5-,反-7-十二碳二烯

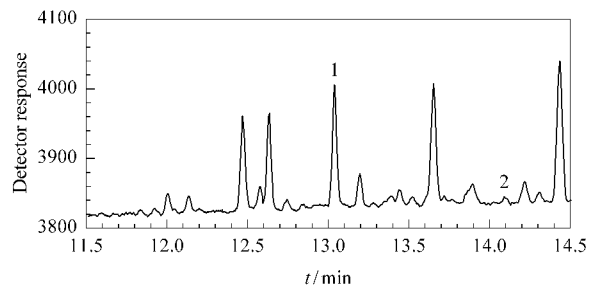


图1 思茅松毛虫性信息素腺体提取物的气相色谱图(2 FE)

Fig.1 Gas chromatogram of sex pheromone gland extracts of *D. kikuchii* (2 FE)

1. (Z,E)-5,7-dodecadien-1-yl acetate; 2. (Z,E)-5,7-dodecadien-1-ol.

乙酸酯。进一步比较性信息素腺体提取物与 4 种立体异构体标准品的色谱保留时间(见图 2),确定腺体成分中具有顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯的立体构型。腺体中未发现顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯的其他 3 种立体异构体成分(反-5-,顺-7-十二碳二烯乙酸酯 $t_R = 13.139$ min;顺-5-,顺-7-十二碳二烯乙酸酯 $t_R = 13.307$ min;反-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯 $t_R = 13.535$ min)的存在。质谱分析表明,性信息素腺体提取物中与顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯有相同保留时间的色谱峰也具有与其完全相同的质谱图。由于与顺-5-,反-7-十二碳二烯醇有相同保留时间($t_R = 14.084$ min)的组分在性信息素腺体提取物中的含量很低(0.05 ~ 0.35 ng),其色谱峰很弱(见图 1 中的峰 2),且 GC-MS 分析时有其他杂质干扰,因此未能获得全扫描质谱图。但是在与顺-5-,反-7-十二碳二烯醇有相同保留时间的色谱峰组分中检测到了这种物质的特征离子 m/z 182(M^+ , 相对丰度 5%)和 164($M^+ - H_2O$, 相对丰度 10%)。

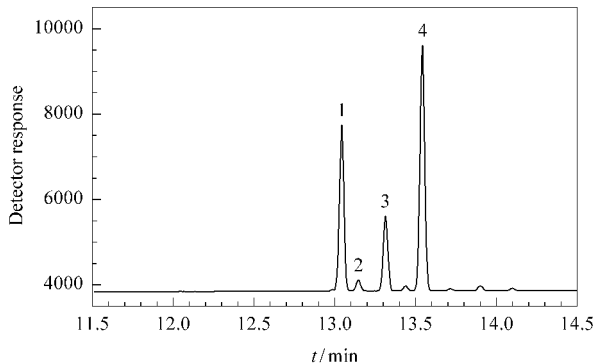


图 2 5,7-十二碳二烯乙酸酯 4 种立体异构体标准品的气相色谱图

Fig.2 Gas chromatogram of 5,7-dodecadien-1-yl acetate stereoisomer standards

1. (*Z,E*)-5,7-dodecadien-1-yl acetate; 2. (*E,Z*)-5,7-dodecadien-1-yl acetate; 3. (*Z,Z*)-5,7-dodecadien-1-yl acetate; 4. (*E,E*)-5,7-dodecadien-1-yl acetate.

性信息素腺体提取物的质谱分析结果认为图 1 中峰 2 是顺-5-,反-7-十二碳二烯醇成分。为了进一步确认图 1 中峰 2 化合物的功能团及立体构型,将腺体提取物(14 FE)进行酯基转移和乙酰化微量化学反应。结果表明,性信息素腺体提取物经甲醇-氢氧化钾溶液处理后,顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯的色谱峰消失(见图 3 中保留时间为 13.028 min 处),而顺-5-,反-7-十二碳二烯醇保留时间处的色谱峰增强(见图 3 中 14.084 min 处的峰 2)。将甲醇-氢氧化钾溶液处理后的性信息素腺体提取物再进行乙酰化反应,顺-5-,反-7-十二碳二烯醇保留时间处的色谱峰消失(见图 4 中保留时间为 14.084 min 处),而顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯保留时间处的

色谱峰又重现(见图 4 中保留时间为 13.028 min 处的峰 1)。

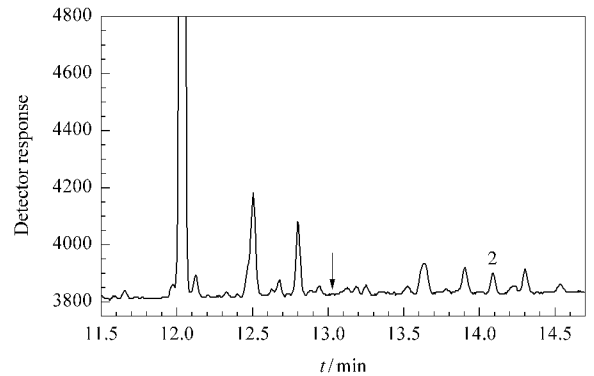


图 3 思茅松毛虫性信息素腺体提取物酯基转移微量化学反应后的色谱图

Fig.3 Gas chromatogram of sex pheromone gland extracts of *D. kikuchii* by alkaline methanolysis

The arrow mark indicates the retention time of (*Z,E*)-5,7-dodecadien-1-yl acetate where the peak disappears due to alkaline methanolysis.

Peak 2: (*Z,E*)-5,7-dodecadien-1-ol.

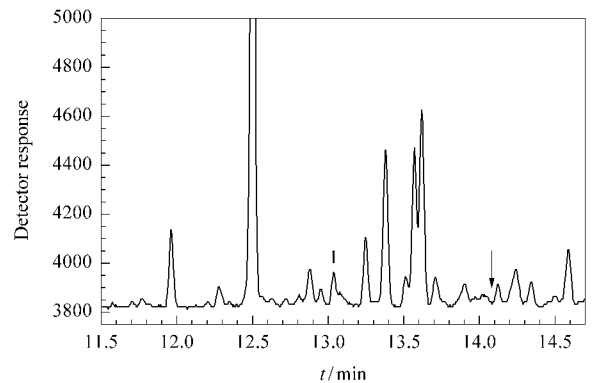


图 4 思茅松毛虫性信息素腺体提取物酯基转移后再乙酰化的色谱图

Fig.4 Gas chromatogram of sex pheromone gland extracts of *D. kikuchii* by alkaline methanolysis followed by reacylation

The arrow mark indicates the retention time of (*Z,E*)-5,7-dodecadien-1-ol where the peak disappears due to the reacylation.

Peak 1: (*Z,E*)-5,7-dodecadien-1-yl acetate.

3 讨论

由于蛾类昆虫性信息素的含量都极少,这使得早期的性信息素研究面临了很多困难。如阐明第一个昆虫性信息素蚕蛾醇时,历时 20 年,耗用了 50 万只雌蚕蛾。随着高灵敏度检测方法、高分辨率分离技术和微量化学分析技术的发展,昆虫性信息素的结构鉴定工作已发展到了能利用单个性信息素腺体研究昆虫的性信息素成分,阐明性信息素系统中各成分的准确比例,比较昆虫个体间性信息素含量的差异,这些工作均为配制高效的仿生诱芯奠定了基础。在很多情况下,昆虫性信息素系统中的微量成

分因含量极微而不易被鉴定,然而微量成分的缺失能在很大程度上影响其生物活性^[7,8],因为只有完整的性信息素系统才能激起同种昆虫其他个体的最大行为反应^[2,10]。

松毛虫属昆虫性信息素主要成分在腺体中的含量低于 2 ng,微量成分的含量更低(0.03 ~ 0.5 ng)^[6,7],所以自马尾松毛虫、赤松毛虫和欧洲松毛虫性信息素鉴定近 20 年来,该属昆虫性信息素的研究一直未获重大突破^[1]。思茅松毛虫性信息素腺体提取物中顺-5-,反-7-十二碳二烯醇的含量很低(0.05 ~ 0.35 ng),即使采用质谱分析也不能获得很好的全扫描质谱图,但根据松毛虫性信息素分子的结构特点,首先确认含量高的性信息素腺体成分顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯的功能团和立体构型,然后再通过酯基转移和乙酰化微量化学反应的方法进一步确认性信息素腺体中微量成分的功能团和立体构型,从而对微量成分进行鉴定。这种微量化学反应方法原理简单,且性信息素腺体提取物不需要进行样品前处理,在室温条件下就容易发生反应,而在温和的反应条件下反应物不容易发生异构化,因此只利用高分辨的毛细管气相色谱就能确定微量成分的功能团和立体构型。针对研究对象的特点,巧妙应用这种微量化学反应方法对性信息素分子的功能团进行相互验证,从而准确分析性信息腺体中的微量成分。利用性信息素分子功能团相互转换的微量化学反应方法对性信息素腺体中的微量成分进行定性分析,对其他鳞翅目昆虫性信息素的结构鉴定工作有很好的借鉴意义。将思茅松毛虫性信息素腺体提取物进行酯基转移微量化学反应后,观察性信息素腺体微量成分保留时间处的色谱峰是否增强,顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯保留时间处的色谱峰是否完全消失(见图 3);然后将酯基转移微量化学反应后的产物重新乙酰化,观察腺体中微量成分保留时间处的色谱峰是否完全消失,顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯保留时间处的色谱峰是否重现(见图 4);以此判断思茅松毛虫性信息素腺体微量成分是否具有醇的功能团。另外,由于已经确认了思茅松毛虫性信息素腺体主要成分顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯的立体构型,其标样的酯基转移和再乙酰化

微量化学反应都未发现产生异构化现象,通过观察相互验证主要成分和微量成分色谱峰周围有无异构峰的变化,能提供很好的证据证明性信息素微量成分也具有顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯的立体构型。进一步的生物试验证明,单独应用顺-5-,反-7-十二碳二烯乙酸酯或顺-5-,反-7-十二碳二烯醇都没有生物活性,而这两种成分以一定的比例混合后才有很强的生物活性(数据未发表)。

昆虫通过时空差异、形态差异、行为差异等方式实现生殖隔离。但对于松毛虫近缘种之间实现生殖隔离的方式主要是依赖于多组分性信息素系统的特异性,而不是依赖于其性信息素系统中某一特定的化合物成分。这反映出昆虫利用性信息素作为化学通讯系统的复杂性。阐明松毛虫性信息素的微量成分,对于从性信息素的角度研究松毛虫属昆虫物种之间的关系和进化方向,以及利用性信息素进行害虫综合治理都具有重要意义。

参考文献:

- [1] Kong X B, Zhao C H, Gao W. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(24): 2 077
- [2] Bjostad L B, Linn C E, DU J W, Roelofs W L. J Chem Ecol, 1984, 10(9): 1 309
- [3] Ginzl M D, Millar J G, Hanks L M. Chemoecology, 2003, 13(31): 135
- [4] Kong Xiangbo, Zhao Chenghua, Zhang Zhen, Wang Hongbin. Chinese Journal of Chromatography (孔祥波, 赵成华, 张真, 王鸿斌. 色谱), 2004, 22(2): 97
- [5] Buser H R, Arn H, Guerin P, Rauscher S. Anal Chem, 1983, 55(6): 818
- [6] Priesner E, Bogenschütz H, Albert R, Reed D W, Chisholm M D. Z Naturforsch, C: Biosci, 1984, 39c: 1 192
- [7] 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
- [8] 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
- [9] Zhao C H, Adlof R O, Löfstedt C. Insect Biochem Mol Biol, 2004, 34(3): 261
- [10] Linn C E Jr, Campbell M G, Roelofs W L. J Chem Ecol, 1986, 12(3): 659