

## 糖蜜草挥发性成分 HS-SPME-GC-MS 分析

高广春, 郑许松, 徐红星, 吕仲贤\*

浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所 杭州 310021

**摘要:** 本文首次采用顶空固相微萃取技术(HS-SPME)提取该植物挥发性成分,然后通过气质联用技术(GC-MS)结合保留指数以及标样对照对化学成分进行了定性,并通过峰面积归一化法计算出各组分的相对百分含量。试验确定了PDMS/DVB固相微萃取对糖蜜草挥发物的萃取效果最好,并从中鉴定出33种化合物占总挥发性成分的90.94%,主要为烷烃和萜烯类化合物。该研究为开发糖蜜草作为水稻螟虫的驱避植物进行害虫安全有效防治提供理论依据,并为驱避性挥发物的田间应用奠定基础。

**关键词:** 糖蜜草; 固相微萃取; 气质联用; 挥发性成分;

中图分类号: S345.1; Q946.91

文献标识码: A

Analysis of Volatile Compounds from *Melinis minutiflora* by HS-SPME-GC-MS

GAO Guang-chun, ZHENG Xu-song, XU Hong-xing, LV Zhong-xian\*

Institute of Plant Protection and Microbiology Zhejiang Academy of Agriculture Science Hangzhou 310021, China

**Abstract:** In this study, a head-space solid phase microextraction (HS-SPME) method was developed for extracting the volatile compounds from *Melinis minutiflora*. Then gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) coupled with retention indicator and comparison with standard samples was used to characterize the components of the volatile compounds. Then the relative proportion of each component was calculated by the peak area normalization method. The results showed that Polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) SPME fibers based on the number of peaks performed well for extracting volatile compounds from *M. minutiflora*. Thirty-three compounds were obtained which accounted for 90.94% of the total peak areas with alkanes and terpenes as the dominant components. This study lays the foundation for developing *M. minutiflora* as the repellent plant for rice stem borer in terms of effective pest prevention. Also, it is the ground work for applying the evading volatiles to the rice field.

**Key words:** *Melinis minutiflora*; SPME; GC-MS; volatile constituents

植物与植食性昆虫之间存在着复杂的联系,它们共同进化、共同发展<sup>[1]</sup>。植物为了抵御害虫的侵害在进化过程中成功的“制造”出一系列天然的次生代谢物,其中包括具有直接毒性或是驱避性化合物和对天敌具有引诱作用的化合物等<sup>[2]</sup>。植物释放的易挥发性化合物是植食性昆虫寻找寄主植物的重要线索,它调控着昆虫的定向、识别、取食等行为<sup>[3]</sup>。农业上可以利用目标作物与害虫的这一化学信息联系对害虫进行引诱、驱避、迷向等外界干扰达到害虫的安全防治。在我国鳞翅目害虫大螟(*Sesamia inferens*, 夜蛾科)和二化螟(*Chilo suppressalis*, 螟蛾科)是危害水稻最重要的常发性害虫,也是

茭白、甘蔗、玉米等作物上的重要害虫。近年来,由于优质高产水稻品种和免耕栽培等新技术的推广、全球变暖、大量使用农药导致抗药性产生等原因使水稻螟虫的种群数量和成灾面积大幅度上升,给我国的农业生产造成了重大损失。目前螟虫防治主要通过施用化学农药,但随着害虫抗药性的增加以及用药对环境安全和人类健康的危害等问题的出现化学农药的安全性面临着挑战,其有效性也由于大螟和二化螟幼虫具有很好的隐蔽性成虫是夜间活动的特点大大折扣,通过寄主植物挥发物调控螟虫行为进行害虫防治<sup>[4]</sup>应运而生,成为一项新的研究领域。

糖蜜草(*Melinis minutiflora* P. Beauv)属于禾本科(Poaceae)糖蜜草属,它的茎和叶片上密生腺毛能分泌甜味粘液,具有香味。在非洲的肯尼亚地区糖蜜草被用作驱避植物间作于玉米田中防治班禾草螟(*Chilo partellus*)和玉米楷夜蛾(*Busseola fusca*)<sup>[5]</sup>取

收稿日期: 2010-02-23 接受日期: 2010-06-13

基金项目: 农业部公益性行业科研专项; 水稻螟虫防治技术研究(200803004); 浙江省优先主题: 稻田农药减量增效安全使用关键技术(2008C1207-2)

\* 通讯作者 E-mail: luzxmh2004@yahoo.com.cn

得了很大的经济效益。螟虫行为驱性试验证明间作于玉米田中糖蜜草的挥发物不仅能够驱避雌蛾而且能够增加寄生性天敌大螟盘绒茧蜂的寄生率<sup>[6,7]</sup>,有效的减小了害虫的危害并增加了作物的产量。室内试验发现该植物水蒸气提取物对班禾草螟怀卵雌成虫的产卵量为 2.2(对照产卵量为 40.9),田间试验发现玉米单一种植虫害率为 39.2%,而间作糖蜜草后虫害率降低到 4.6%<sup>[6]</sup>。大螟和二化螟同玉米螟一样都是钻蛀性害虫,对于该植物对以上两种螟虫是否具有驱避作用以及驱避作用成分的研究还未见报道。本研究通过固相微萃取技术采集糖蜜草的挥发物,然后利用 GC-MS 结合保留指数以及标样对照对挥发性成分进行分离鉴定,为下一步更好地利用糖蜜草挥发性成分驱避水稻螟虫奠定基础,也为合理进行水稻种植提供理论依据。

## 1 仪器与材料

GCMS-QP2010 气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司);手动固相微萃取(SPME)装置(美国 Supelco 公司),萃取头(Polyacrylate (PA) 85  $\mu\text{m}$ ; polydimethylsiloxane (PDMS) 100  $\mu\text{m}$ ; polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) 65  $\mu\text{m}$ );毛细管色谱柱 Rtx-5MS(0.25  $\mu\text{m}$   $\times$  30.0 m  $\times$  0.25 mm)。

标准样品芳樟醇(美国 Alfa, 97%)、壬醛(美国 Alfa, 98%)、别罗勒烯(日本 TCI, > 90%)、萘(上海)、水杨酸甲酯(上海, 98%)、癸醛(美国 Alfa, 96%)、吡啶(上海)、 $\alpha$ -雪松烯(Sigma, 99%)、石竹烯(日本 TCI, > 90%)、 $\alpha$ -葎草烯(日本 TCI, > 93%)、柏木脑(98%),正十四烷(Sigma-Aldrich,  $\geq$  99%)和正十六烷(Sigma-Aldrich,  $\geq$  98%)。C8 ~ C40 混标(含植烷和姥鲛烷)购于上海西域公司(美国 Accustandard)。

糖蜜草于 2009 年 8 月采自浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所试验田。

## 2 实验方法

### 2.1 样品制备

取样前先将试验用三种萃取头在气相色谱进样口老化 0.5 h,老化温度 250  $^{\circ}\text{C}$ 。选取新鲜干净的糖蜜草放入 2 L 的广口瓶内,用封口膜封口后,置于 45  $^{\circ}\text{C}$  的水浴锅内,将固相微萃取装置的针头穿透封口膜,插入瓶内植物体上方,然后小心的推出纤维头,同时用铁架台固定固相微萃取装置的手柄,自萃取

纤维头推出后开始计时,待吸附完毕后(60 min)立即在 GC-MS 进样口(250  $^{\circ}\text{C}$ )解吸附(1 min)进行化学成分分析。各标准样品气质分析采用气相微量注射器(5  $\mu\text{L}$ )顶空吸取样品直接进样(1  $\mu\text{L}$ )。

### 2.2 GC-MS 分析

色谱条件:色谱柱为 Rtx-5MS(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ )石英毛细管柱;载气氦气(99.999%);色谱柱起始温度为 40  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 2 min,然后以 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 150  $^{\circ}\text{C}$ ,然后再以 3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 250  $^{\circ}\text{C}$ ,恒温 5 min。不分流进样。

质谱条件:电离方式为 EI 源,电离能量 70 eV;离子源温度 200  $^{\circ}\text{C}$ ;接口温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ;质量扫描范围为  $m/z$  45 ~ 500;谱图检索:采用 NIST08.L 和 NIST08s.L 进行检索。

### 2.3 KI 测定

取正构烷烃烷烃混标(C8-C40)按照上述气相色谱和质谱条件进样分析,测定各正构烷烃的保留时间,再在完全相同的气相色谱和质谱条件下对采集的样品进行分析,测定各组分的保留时间,根据下面公式计算出各组分的 Kovats 保留指数<sup>[8]</sup>。

$$KI_{\text{样品}} = KI_{\text{前}} + (Rt_{\text{样品}} - Rt_{\text{前}}) \times 100 / (Rt_{\text{后}} - Rt_{\text{前}})$$

式中  $KI_{\text{样品}}$ —样品色谱峰的 KI;  $KI_{\text{前}}$ —样品色谱峰前面烷烃标样的 KI;  $Rt_{\text{样品}}$ —样品色谱峰的 Rt;  $Rt_{\text{前}}$ —前面烷烃标样的 Rt;  $Rt_{\text{后}}$ —后面烷烃标样的 Rt。

### 2.4 分析方法

在同一固相微萃取和 GC-MS 分析条件下,比较三种不同涂层的纤维头所得到的总离子流色谱图,选择最佳色谱图利用岛津 QP2010 所配备的 NIST08.L 和 NIST08s.L 自动检索,选取质谱匹配度高的前 6 种物质的 KI 值,将质谱匹配度和 KI 值匹配度最高的化学结构确定为该物质的化学结构。无 KI 值匹配性和无文献 KI 值可参照且质谱匹配度低的成分均定为未知物质,未列于表中。部分化合物通过标准样品的质谱图和保留时间进行确认。单个化合物的相对百分含量用总峰面积归一化后,用其峰面积的相对百分比来表示。

## 3 结果与分析

### 3.1 纤维头的选择

在其它条件恒定情况下,本实验比较了通过三种不同涂层的纤维头聚丙烯酸酯(PA)、聚二甲基硅氧烷(PDMS)和聚二甲基硅氧烷/二乙烯基苯(PDMS/DVB)所萃取的糖蜜草挥发性成分的 GC-

MS 分析结果如图 1 所示,发现 PDMS/DVB 萃取头对糖蜜草挥发性成分吸附能力最强,因此本实验选用 PDMS/DVB 涂层纤维萃取头。

### 3.2 糖蜜草挥发性成分分析

按上述试验方法和条件对糖蜜草挥发性成分进行气相色谱-质谱分析,计算机质谱数据系统检索得到相似度高的化合物,然后根据计算的保留指数值以及标准样品保留时间鉴定了 33 个化合物,按照峰面积归一化法确定了各成分的相对含量,结果见表 1。鉴定出的 33 个化合物占色谱总馏分出峰面积的 90.94%,主要为烷烃(55.06%)以及单萜或倍半萜烯类(26.89%)化合物。邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二异丁酯应该是由于使用 parafilm 封口膜而引入的外源污染物。

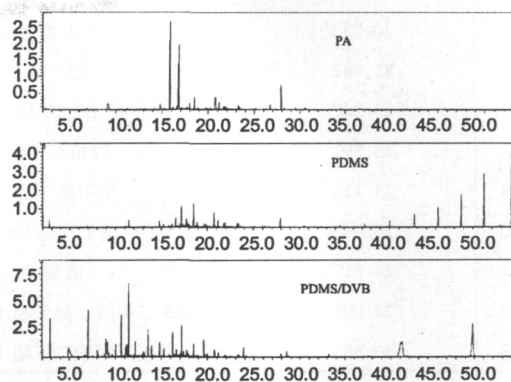


图 1 PA、PDMS 和 PDMS/DVB 三种纤维头所吸附的挥发性成分的总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of the volatile compounds by PA, PDMS and PDMS/DVB fibers

表 1 糖蜜草主要挥发性成分及其相对含量

Table 1 Composition of the volatile constituents from *M. minutiflora*

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	化合物 Compound	相似度 Similarity	保留指数 Retention index	相对含量 (%) Relative content
1	9.142	乙酸叶醇酯 (3Z)- $\beta$ -Hexenyl acetate	97	980	6.16
2	9.283	乙酸己酯 <i>n</i> -Hexyl acetate	96	985	1.39
3	10.042	$\beta$ -罗勒烯 $\beta$ -Ocimene	97	998	5.72
4	10.496	辛醇 1-Octanol	98	1059	0.14
5	11.100	芳樟醇 $\beta$ -Linalool	96	1101	3.00
6	11.183	壬醛 Nonanal	97	1104	3.71
7	11.450	紫苏烯 Perillen	91	1118	24.77
8	11.950	别罗勒烯 Allo-ocimene	95	1145	0.66
9	12.833	萘 Naphthalene	93	1191	1.16
10	13.017	水杨酸甲酯 Methyl salicylate	96	1201	1.93
11	13.150	癸醛 Decanal	97	1208	1.28
12	14.817	吲哚 Indole	97	1301	4.41
13	15.175	1-甲基萘 1-Methyl naphthalene	92	1322	0.40
14	16.567	正十四烷 <i>n</i> -Tetradecane	95	1400	1.77
15	16.742	月桂醛 Dodecanal	95	1411	0.48
16	17.067	$\alpha$ -雪松烯 $\alpha$ -Cedrene	93	1428	1.42
17	17.175	石竹烯 Caryophyllene	97	1433	11.04
18	17.733	法尼烯 Farnesene	93	1462	2.02
19	17.833	$\alpha$ -葎草烯 $\alpha$ -Humulene	95	1468	1.62
20	18.125	7-十六烯醛 (Z)-7-Hexadecenal	96	1483	0.24
21	18.345	十五烯 1-Pentadecene	94	1494	0.17
22	18.500	十五烷 Pentadecane	93	1500	6.06
23	19.883	2-甲基十五烷 2-Methylpentadecane	93	1564	0.36
24	20.308	金合欢醇 (2E,6E)-Farnesol	94	1583	0.14

25	20.733	正十六烷 Hexadecane	95	1600	0.89
26	21.142	柏木脑 Cedrol	95	1618	1.27
27	23.242	正十七烷 Heptadecane	98	1700	1.13
28	23.392	降植烷 Norphytane	97	1706	1.80
29	25.125	苯甲酸苄酯 Ascabin	95	1771	1.09
30	25.942	正十八烷 Octadecane	96	1800	0.59
31	26.217	植烷 Phytane	97	1830	1.11
32	27.908	邻苯二甲酸二异丁酯 Isobutyl phthalate	98	1878	1.58
33	30.583	邻苯二甲酸二丁酯 Butyl phthalate	98	1965	0.32

## 4 讨论

糖蜜草在乌干达和肯尼亚等地已被应用于 Push-Pull 害虫防治策略,它对钻蛀性害虫驱避作用明显<sup>[9]</sup>。Kimani 等对该植物挥发性成分进行了 GC 和 GC-MS 分析,共鉴定了 16 个化合物<sup>[5]</sup>,部分化合物与该研究得到化合物不同,这可能与挥发物的采集方法、分析条件以及植物生境的不同等因素有关。糖蜜草通过气相色谱耦合触角电位仪(GC-EAG)以及 GC-MS 分析发现其挥发性萜烯类成分(*E*)- $\alpha$ -cymene、 $\alpha$ -terpinolene、 $\beta$ -caryophyllene、humulene、(*E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene、 $\alpha$ -cedrene 对玉米梢夜蛾(*B. fusca*)和班禾草螟(*C. partellus*)有电位反应<sup>[10]</sup>。不同于前人采用的吸附剂吸附方法<sup>[5]</sup>,本研究采用固相微萃取技术采集挥发物,分析鉴定出了更多的挥发性成分,对于它们对水稻螟虫大螟和二化螟的行为反应及其作用机制仍需进一步的探讨。寄主植物通过植物挥发物与昆虫发生化学联系,它能调节害虫的行为反应使其处在利于自身生长发育的生境条件下,这些挥发物为人类提供安全、无公害的防虫治虫新途径,也必将在未来的绿色农业生产中发挥重要的作用。

### 参考文献

- 1 Wheat CW, Vogel H, Wittstock U *et al.* The genetic basis of a plant-insect coevolutionary key innovation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104: 20427-20431.
- 2 Gordon-Weeks R and Pickett JA. *Plant-derived Natural Products*. New York: Springer 2009. 321-347.
- 3 Du JW(杜家纬). Plant-insect chemical communication and its behavior control. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), 2001, 27: 193-200.
- 4 Landis DA, Wratten S, Gurr M. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annu Rev Entomol* 2000, 45: 175-201.
- 5 Kimani SM, Chhabra SC, Lwande W *et al.* Airborne volatiles from *Melinis minutiflora* P. BeauV., a non-host plant of the spotted stem borer. *J Essent Oil Res* 2000, 12: 221-224.
- 6 Khan ZR, Ampong-Nyarko K, Chiliswa P *et al.* Intercropping increases parasitism of pests. *Nature* 1997, 388: 631-632.
- 7 Gohole LS, Overholt WA, Khan AR *et al.* Effects of molasses grass *Melinis minutiflora* volatiles on the foraging behavior of the cereal stemborer parasitoid, *Cotesia sesamiae*. *J Chem Ecol* 2003, 29: 731-744.
- 8 Van Den Dool H, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr*, 1963, 11: 463-471.
- 9 Cook SM, Khan ZR, Pickett JA. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annu Rev Entomol*, 2007, 52: 375-400.
- 10 Khan ZR, Pickett JA, Berg JVD *et al.* Exploiting chemical ecology and species diversity: stem borer and striga control for maize and sorghum in Africa. *Pest Manag Sci* 2000, 56: 957-962.