

春尺蠖性信息素活性成分的提取和 GC-MS 鉴定

闫 祺^{1,3}, 韦 卫², 侯雪玲^{1,*}, 马纪萱¹, 阿吉艾克拜尔·艾萨¹

(1. 中国科学院新疆理化技术研究所, 中国科学院干旱区植物资源化学重点实验室, 乌鲁木齐 830011;

2. 中国科学院动物研究所, 农业虫害综合治理国家重点实验室, 北京 100080; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 为了寻求高效无污染的防治害虫春尺蠖 *Apocheima cinerarius* Erschoff 的方法, 本实验对春尺蠖雌性信息素进行了初步研究。本研究采取正己烷溶剂浸提法提取春尺蠖处女雌性信息素腺体中的性信息素, 运用气相色谱-触角电位联用仪 (gas chromatography-electroantennographic detection, GC-EAD) 测定春尺蠖雄蛾触角对雌蛾性信息素腺体提取物中性信息素成分的活性反应, 并运用气相色谱-质谱联用仪 (gas chromatograph-mass spectrum, GC-MS) 鉴定信息素成分。GC-EAD 结果显示雄蛾触角对雌蛾性信息素腺体提取物中的一种成分有较好的反应。GC-MS 分析结果表明能引起雄蛾触角电生理反应的成分为含有十四个碳原子直链结构的不饱和乙酸酯, 但其双键位置有待合成标准化合物进一步分析鉴定。该研究结果为春尺蠖雌性信息素备选化合物的筛选提供了方向, 为其结构的确定奠定了基础。

关键词: 春尺蠖; 腺体提取物; 性信息素; 成分鉴定; 气相色谱-触角电位联用仪;

中图分类号: Q968 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)03-0368-05

Extraction and GC-MS identification of active components of sex pheromone from *Apocheima cinerarius* Erschoff (Lepidoptera: Geometridae)

YAN Qi^{1,3}, WEI Wei², HOU Xue-Ling^{1,*}, MA Ji-Xuan¹, Haji Akber AISA¹ (1. The Key Laboratory of Chemistry of Plant Resources in Arid Regions, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to find an efficient and pollution-free method to control the *Apocheima cinerarius* Erschoff, a polyphagous defoliator pest, the sex pheromone was extracted from sex pheromone glands of virgin female moth of *A. cinerarius* by n-hexane, the sensitive reaction of male moth antenna to the hexane extracts from sex pheromone glands of virgin female moth was analyzed by GC-EAD, and the components of the pheromone were identified by GC-MS. The GC-EAD results indicated that male moth antenna was detected to have sensitive reaction to one component in the extracts. Based on GC-MS data of authentic standards, an unsaturated acetate with 14 carbons was identified as the active component of sex pheromone, but the position of double bond should be further identified through synthesizing more standard compounds. The results will provide the direction in screening tests of synthetic pheromone candidates and establish the foundation for determining the sex pheromone structure of female *A. cinerarius*.

Key words: *Apocheima cinerarius*; gland extract; sex pheromone; component identification; GC-EAD

春尺蠖 *Apocheima cinerarius* Erschoff 属鳞翅目 (Lepidoptera) 尺蠖科 (Geometridae), 又名沙枣尺蠖、榆尺蠖等, 是暴发性食叶害虫。该虫一年发生 1 代, 在新疆的南部地区每年 5 月下旬至翌年 2 月以蛹在树下 20~40 cm 的土壤中越夏和越冬。当日

平均气温达到 0~5℃ 时开始羽化, 3 月中旬或稍晚开始见到虫卵, 4 月上中旬卵开始孵化为幼虫, 4 月下旬至 5 月上旬是发生危害盛期, 5 月中下旬开始老熟, 下地化蛹 (尹奉涛等, 2004)。国外主要分布于中亚地区, 国内在三北地区如新疆、甘肃、内

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目 (0729361401); 中国科学院国家外国专家局“创新团队国际合作伙伴计划”项目
作者简介: 闫祺, 男, 1985 年 9 月生, 河南项城人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫信息素的结构鉴定及天然产物合成, E-mail: yanshu198@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xlhou@ms.xjb.ac.cn

收稿日期 Received: 2010-09-09; 接受日期 Accepted: 2010-12-19

蒙古、河北、山西等地区的防护林带分布较为广泛,但危害尤以新疆最为严重。主要危害树种为胡杨、榆树、沙枣树等,苹果、梨树等果树以及果树附近的小麦、玉米、苜蓿的叶片也被取食(于江南,2003)。从2000年起,春尺蠖在新疆胡杨林树上零星发生,由于对春尺蠖的危害了解不深,没有采取行之有效的防治措施,致使春尺蠖的虫口基数一年比一年增加(白彬等,2008)。目前对春尺蠖的研究多停留在其生物学特性(娄国强等,2006;马建军等,2010)和传统防治方法(张涛和孙建华,2006)上,对其性信息素的研究还未见有文献报道。本实验以春尺蠖为研究对象,对处女雌蛾性信息素腺体提取物进行分析,找出性信息素活性成分并初步确定其结构类型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试虫源: 实验所用春尺蠖 *A. cinerarius* Erschoff 采自于新疆乌鲁木齐周边地区。2010年4月1日当地日平均气温为 0°C 以上时,于乌鲁木齐至昌吉高速公路旁的榆树林树冠下挖蛹,当时已有部分雄蛾羽化出土。将蛹单独存放于装有湿土的高2.8 cm的棕色玻璃瓶(高6 cm,内径2.5 cm)内,用纱布封口。将玻璃瓶带回室内逐日检查羽化情况,室内温度 $16 \pm 3^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $60\% \pm 5\%$ 。待蛹羽化后每天于纱布上喷以10%的蜂蜜水,并给予其原本的光周期(13L:11D),雄蛾待用于GC-EAD分析,处女雌蛾待用作提取性信息素。

1.1.2 主要仪器: 美国 Agilent Technologies 公司 HP6890N/5973N 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS); 美国 Agilent Technologies 7890A 气相色谱仪-荷兰 Syntech 触角电位联用仪(GC-EAD)。

1.2 雌蛾性信息素粗提物提取时间

将装有羽化的春尺蠖处女雌蛾的玻璃瓶旁边放1~2头春尺蠖雄蛾,经观察雌蛾在羽化后第2天晚上进入暗期3~5 h,或者第3天晚上进入暗期1~2 h后进入求偶期,此时雌蛾性信息素腺体部分外伸,周围雄蛾振翅欲飞相当活跃,此时为雌蛾性信息素提取最佳时间。

1.3 雌蛾性信息素粗提物的提取

本实验采取溶剂浸提法,所用溶剂为重蒸正己烷。于羽化后第2天20:00-23:50和第3天19:15-22:00两个时间段共采集处于求偶期的处女雌蛾

16头,待其性信息素腺体外伸时用手轻轻挤压雌蛾腹部,迫使其完全伸出性信息素腺体,用手术剪剪下腺体,将腺体放入预先装有1.5 mL重蒸正己烷的样品瓶(内径1.3 cm,高3.5 cm,购于安捷伦公司)内,室温下静止浸提30 min后将腺体取出。等第16头雌蛾性信息素腺体浸提结束后,将浸提液干燥过滤,然后用氮气浓缩至0.3 mL,用瓶塞密封后置入冰箱中低温(-6°C)保存备用。

1.4 雌蛾性信息素提取物的 GC-EAD 分析

将羽化后2-3 d的春尺蠖雄蛾触角用解剖剪剪下,将触角顶端剪除约0.5 mm,处理后触角长度约10 mm,用导电硅胶将触角与EAG探头(PRG-2)叉状触角固定器的两个银电极联接,然后将电极插入EAG探头中。分离提取物的毛细柱为DB-5MS毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm , J&W Scientific, Folsom, CA),出口端接分流器(OSS-2, SGE, 澳大利亚),分流比1:2,分流的化合物一部分导入FID氢火焰离子检测器,另一部分经过加热套吹向触角(EAD),用GC-EAD软件(Syntech, The Netherlands)同步记录气相色谱和触角电位图。

气相色谱检测器为FID氢火焰离子检测器,载气为氮气,无分流进样,进样量2 μL 。升温程序为:起始温度 50°C ,保持2 min,以 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率程序升温至 280°C ,保持2 min,最后以 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 320°C ,保持10 min。进样口温度 220°C ,检测器温度 280°C 。记录到的信号经放大器(UN-06, Syntech)连接到IDAC转换器(Auto Spike, IDAC2/3, Syntech)再接到计算机的硬件采集卡上,通过计算机软件(EAD版本2.3, Syntech)采集和分析数据。至少记录到5头春尺蠖雄蛾触角在同一保留时间对处女雌蛾性信息素腺体提取物的反应。

1.5 雌蛾性信息素成分的 GC-MS 分析

春尺蠖处女雌蛾性信息素腺体提取物(16个雌虫当量,16FE)的组分鉴定在Agilent 6890N-5937N GC/MS上进行,色谱柱为DB-5MS毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm , J&W Scientific, Folsom, CA),进样量3 μL ,无分流进样。升温程序为起始温度 50°C ,保持2 min,以 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率程序升温至 280°C ,保持2 min,最后以 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 320°C 。电离方式EI,电离能量为70 eV,离子源发生器温度为 250°C ,质量扫描范围为30~350 amu。活性成分的鉴定是通过GC-MS总离子流色谱图与GC-EAD图谱比较之后,根据联机的Nist02数据库检索并结合质谱图中分子离子峰和碎片离子峰来定性。

2 结果与分析

用 GC-MS 分析春尺蠖处女雌性信息素腺体提取物(16FE),发现提取物中含有较多的杂质,其中多为长链烷烃和油酸类。由 GC-EAD 图谱(图 1)可知,在保留时间 36.62 min 时存在着能引起春尺蠖雄蛾触角电生理反应的活性物质,但由于含量较少,没有明显的色谱峰。我们按照 GC-EAD 测试中同样的毛细管气相色谱分析条件对春尺蠖处女雌性信息素腺体提取物进行了 GC-MS 分析,得到提取物的总离子流色谱图(图 2),考虑到数据采集频率、色谱柱老化程度以及仪器型号等因素的差异可能导致保留时间的漂移,由于峰 a 在图 1 和图 2 均显示出明显的色谱峰,故我们以峰 a 为参照,将图

2 与图 1 进行了对比分析,于对应的质谱总离子流图(图 2)中在 34.21 min 左右得到图 1 中的活性色谱峰 b,并得到该峰的质谱图(图 3),对该质谱图进行 Nist02 数据库检索,鉴于昆虫性信息素结构有较大的相似性,多数为长链不饱和醇、乙酸酯、醛或酮类,链长一般为 10~18 碳,其中以 12,14 和 16 碳为最多(韦卫等,2006),我们从检索结果中锁定了顺-10-十四碳烯乙酸酯。然后将质谱图与所合成的顺-10-十四碳烯乙酸酯标准品的质谱图进行对比分析(图 3),两者都具有较弱的分子离子峰 m/z 254; 烯烃的特征碎片离子峰 m/z 41 55 69 83...在两图中都比较明显; 乙酸酯的特征碎片离子峰 m/z 60, 61 (Ando *et al.*, 1998) 和 $[M-60]^+$ m/z 194 (Komoda *et al.*, 2000) 均在质谱图中出现。

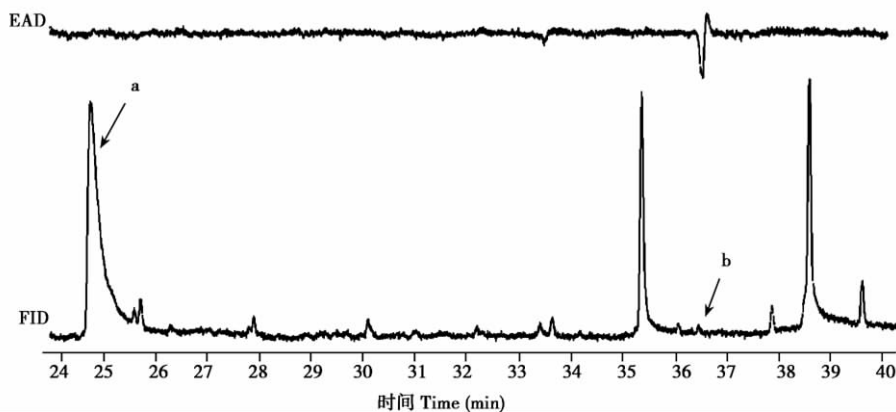


图 1 春尺蠖雄蛾触角对处女雌性信息素腺体提取物的 GC-EAD 反应

Fig. 1 GC-EAD responses of *Apocheima cinerarius* male antennae to sex pheromone gland extracts from virgin females

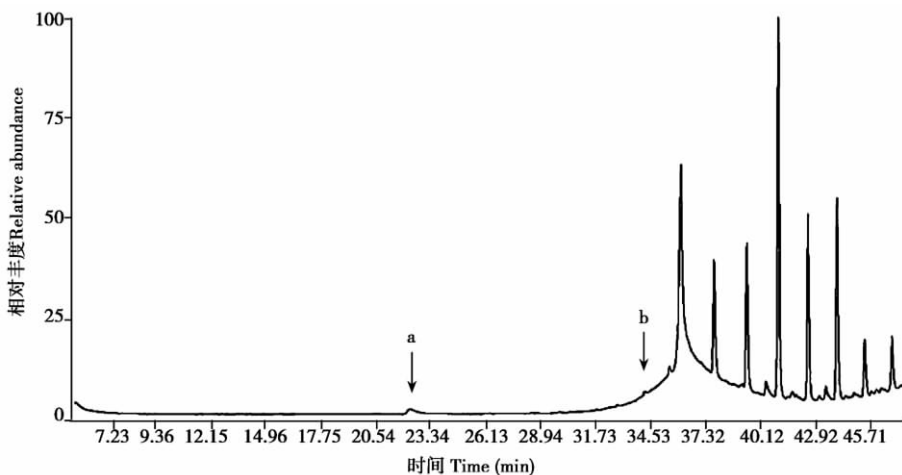


图 2 春尺蠖处女雌性信息素腺体提取物的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of sex pheromone gland extracts from virgin females of *Apocheima cinerarius*

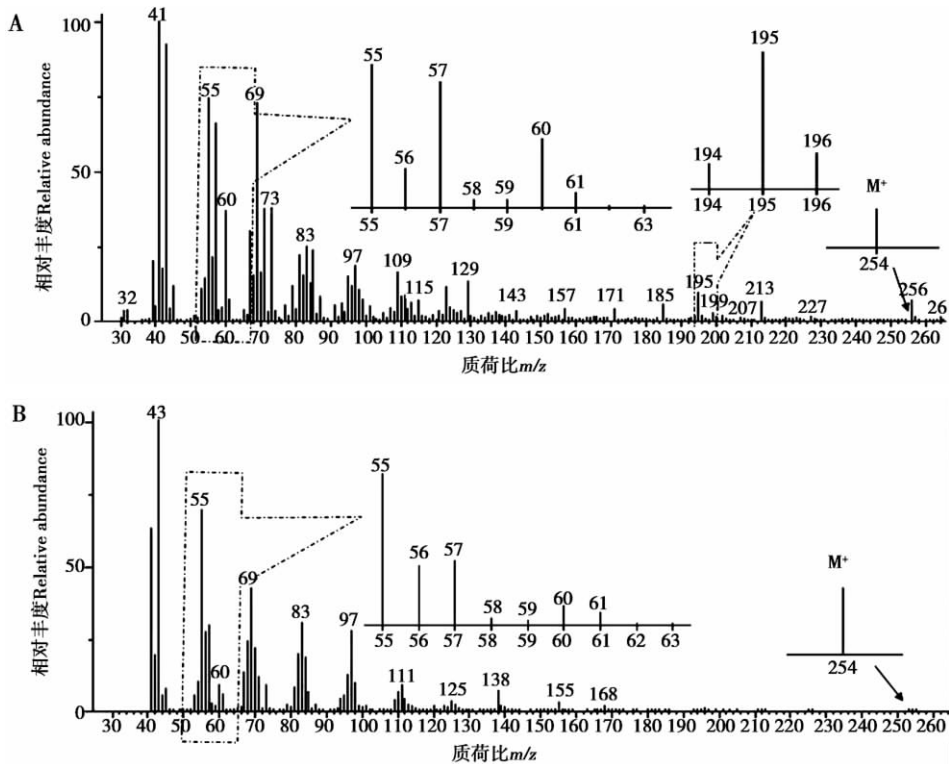


图3 春尺蠖处女雌蛾性信息素腺体成分“b” (A) 和 Z10-14: OAc 标准品 (B) 的质谱图

Fig. 3 Mass spectra of sex pheromone gland extracts from virgin females of *Apoclypea cinerarius* “b” (A) and synthetic Z10-14: OAc (B)

3 讨论

综上所述,本研究采用正己烷溶剂浸提春尺蠖处女雌蛾性信息素腺体的方法取得了春尺蠖雄蛾触角具有显著电生理反应的活性粗提物,初步掌握了性信息素的最佳提取时间。从 GC-EAD 和 GC-MS 图谱来看,所采用的传统信息素提取方法——溶剂浸提法可能造成性信息素成分受杂质干扰较大和可能造成微量成分的缺失,但因该方法操作方便、方法成熟,在性信息素结构鉴定工作中一直发挥着重要作用。利用空气吸附法(邵颖等,2006)和固相微萃取法(solid-phase microextraction, SPME)(Kataoka *et al.*, 2000; 孔祥波等, 2010)在提取信息素时,具有使性信息素成分受杂质干扰少,组分更具有代表性等优点,也逐渐被广泛应用。当虫源充足时,我们拟采用 3 种不同的方法进行深入研究,通过对比分析确定最佳提取方法。

从昆虫信息素数据库来看,在鳞翅目昆虫中已鉴定的尺蠖科的性信息素多为直链不饱和烷烃和含有氧环的直链不饱和烷烃,但也有青突尾尺蛾 *Jodis lactearia* Linnaeus 的性信息素为 Z11-14: OAc Z9, E11-14: OAc(Witzgall *et al.*, 2004), 由于在质谱电

子轰击(EI)条件下,不饱和脂肪族化合物碳碳双键不容易发生裂解,化合物在形成分子离子后氢原子容易发生沿碳链重排(Carlson *et al.*, 1989), 所以从 GC-MS 测试的质谱图中难以确定双键位置和顺反结构,双键位置和顺反结构有待合成更多的标准化合物进行野外引诱和核磁共振分析确定。如果能对昆虫性信息素成分进行分离提纯,然后利用高分辨率质谱(high resolution-mass spectrum, HR-MS)、核磁共振谱(nuclear magnetic resonance, NMR)结合 GC-EAD 进行鉴定,那么准确性是非常可靠的,但由于性信息素在昆虫腺体内含量极少,很难对所提取的信息素成分进行分离提纯。昆虫性信息素研究先驱 Butenandt 带领其团队经过 20 年研究,从 50 万头雌蚕蛾性信息素腺体中获得 12 mg 结晶,分离鉴定出第一个昆虫性信息素 Bombykol 结构(Butenandt *et al.*, 1959), 因此目前对于昆虫信息素的鉴定仍以 GC-EAD 和 GC-MS 为主,结合风洞实验和田间诱捕试验进行验证。这种鉴定方法对于春尺蠖这种一年 1 代的昆虫而言,因其蛹期滞育长达 180~210 d(梁成杰等, 1998), 鉴定周期至少两年,如能人工打破滞育,将蛹提前羽化和繁殖,那么可以大大缩短鉴定周期。

暴发性食叶害虫春尺蠖近年来在新疆胡杨防护

林带危害严重,胡杨林在新疆主要分布于塔里木盆地和准噶尔盆地,其面积约占全国胡杨林总面积的90%。对于面积较大的胡杨防护林带,防治春尺蠖的方法主要为由飞机喷洒农药,但采用该方法进行防治难度大、成本高,而且环境污染严重,可能破坏整个区域生态环境。另外,因春尺蠖雌成虫无翅(萧刚柔,1992),相对其他雌成虫具有飞行能力的昆虫种类来说,利用性信息素进行防治应该具有较好的效果,因此鉴定春尺蠖雌蛾性信息素的成分,对于利用性信息素进行害虫综合治理具有重要意义。

致谢 本实验的 GC-EAD 分析和 GC-MS 分析分别在中国科学院动物研究所电生理实验室和化学分析室完成,并得到了中国科学院动物研究所王睿老师和秦小微老师在实验测试方面的技术帮助,谨致谢意。

参考文献 (References)

- Ando T, Inomata SI, Shimada R, Nomura M, Uehara S, Pu GQ, 1998. Sex pheromones of *Thysanoplusia intermixta* and *T. orichalcea*: identification and field tests. *J. Chem. Ecol.*, 24 (6): 1105 - 1115.
- Bai B, Chen SJ, Geng QL, Zeng YJ, 2008. Relationship between space distributions of *Apocheima cinerarius* Erschoff and the habitats in Tarim River Basin. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 20 (5): 56 - 58. [白彬,陈蜀江,耿庆龙,曾雅娟,2008.塔里木河流域春尺蠖发生空间分布与生境关系研究.江西农业学报,20(5): 56 - 58]
- Butenandt A, Beckmann R, Stamm D, Hecker E, 1959. Über ber den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*: Reindarstellung und Konstitution. *Z. Naturforschung*, 14B: 283 - 284.
- Carlson DA, Roan CS, Yost RA, Hector J, 1989. Dimethyl disulfide derivatives of long chain alkenes, alkadienes, and alkatrienes for gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 61: 1564 - 1571.
- Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J, 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatography A*, 880: 35 - 62.
- Komoda M, Inomata SI, Ono A, Watanabe H, Ando T, 2000. Regulation of sex pheromone biosynthesis in three Plusiinae moths: *Macdunnoughia confusa*, *Anadevidia peponis*, and *Chrysodeixis eriosoma*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(10): 2145 - 2151.
- Kong XB, Zhao LL, Zhang Z, Wang HB, Bai FH, Yu GM, 2010. Solid-phase microextraction of pheromone components of *Dendrolimus houi* (Lepidoptera: Lasiocampidae) and their characterization by gas chromatography-mass spectrometry and GC-electronnographic detection. *Acta Entomol. Sin.*, 53(8): 857 - 863. [孔祥波,赵莉茜,张真,王鸿斌,柏芳华,于国民,2010.松毛虫性信息素的固相微萃取及质谱和触角电位分析.昆虫学报,53(8): 857 - 863]
- Liang CJ, Zhao L, Wu Y, Wang GC, 1998. Relationship between respiratory metabolism and diapause of pupae of *Apocheima cinerarius*. *Forest Research*, 11(3): 339 - 341. [梁成杰,赵玲,吴燕,王贵成,1998.春尺蠖蛹呼吸代谢与滞育关系的研究.林业科学研究,11(3): 339 - 341]
- Lou GQ, Lu WY, Yu H, Wang DY, Wang YB, 2006. Distribution pattern and dynamics of *Apocheima cinerarius* Erschoff populations studied with GS and GIS. *Acta Entomol. Sin.*, 49(4): 613 - 618. [娄国强,吕文彦,余昊,王登元,王运兵,2006.基于GS和GIS的春尺蠖种群分布动态研究.昆虫学报,49(4): 613 - 618]
- Ma JJ, Yao H, Qi ZL, 2010. Emergence characteristics of overwintering *Apocheima cinerarius* and its larval spatial distribution pattern. *Forest Pest and Disease*, 29(1): 10 - 12. [马建军,姚虹,齐志利,2010.春尺蠖越冬蛹羽化特性及幼虫空间分布研究.中国森林病虫,29(1): 10 - 12]
- Shao Y, Lu YJ, Wei ZF, 2006. Study on methods of extraction and bioassay test sex pheromone of adult female of psocids *Liposcelis entomophila*. *Acta Ecol. Sin.*, 26(7): 2148 - 2153. [邵颖,鲁玉杰,魏宗烽,2006.嗜虫书虱性信息素的提取方法和生物活性测定方法.生态学报,26(7): 2148 - 2153]
- Wei W, Zhao LL, Sun JH, 2006. Recent advances on lepidopterous (moths) sex pheromone. *Acta Entomol. Sin.*, 49(5): 850 - 858. [韦卫,赵莉茜,孙江华,2006.蛾类性信息素研究进展.昆虫学报,49(5): 850 - 858]
- Witzgall P, Lindblom T, Bengtsson M, Tóth M, 2004. The Pherolist. www-pherolist.slu.se.
- Xiao GR, 1992. Forest Insects of China. China Forest Publishing House, Beijing. 890 - 892. [萧刚柔,1992.中国森林昆虫.北京:中国林业出版社.890 - 892]
- Yin FC, Qin LF, Yu HL, 2004. Observation and control of emergence (eclosion) of spring cankerworm (*Apocheima cinerarius* Erschoff). *Xinjiang Agricultural Science*, 41(5): 385 - 387. [尹奉淳,秦利芳,余虹丽,2004.春尺蠖羽化监测及防治措施的探讨.新疆农业科学,41(5): 385 - 387]
- Yu JN, 2003. Agricultural Entomology of Xinjiang. Xinjiang Science and Technology Press, Urumqi. 209 - 293. [于江南,2003.新疆农业昆虫学.乌鲁木齐:新疆科学技术出版社.290 - 293]
- Zhang T, Sun JH, 2006. Aerial spray of Bt WP against *Apocheima cinerarius* in the natural forests of *Populus euphratica*. *Forest Pest and Disease*, 25(3): 38 - 40. [张涛,孙建华,2006.飞机喷洒Bt粉剂防治天然胡杨林春尺蠖技术.中国森林病虫,25(3): 38 - 40]

(责任编辑:赵利辉)