化学生态学专题

收集挥发性样品的吸附剂法和固相微萃取法*

黄翠虹[1] 李静静[2] 周 琳[2] 闫凤鸣[2**]

（1. 顺德职业技术学院，广东 528333；2. 河南农业大学植物保护学院，郑州 450002）

摘 要 本文介绍挥发性信息化学物质的两种收集方法——吸附剂收集法和固相微萃取收集法，以植物挥发性化学物质收集为例为例，详述了两种方法的原理、步骤、注意事项和实例，最后比较了两种收集方法的优缺点，供相关工作者使用时参考。

关键词 挥发性信息化学物质，收集方法，吸附剂收集法，固相微萃取（SMPE）收集法

Adsorbent trap and solid-phase microextraction methods for the collection of volatile infochemicals

HUANG Cui-Hong[1] LI Jing-Jing[2] ZHOU Lin[2] YAN Feng-Ming[2**]

(1. Shunde Polytechnic College, Guangdong 528333, China; 2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract This paper introduces two techniques for the collection of volatile infochemicals, the absorbent method and the solid-phase microextraction (SPME) method. Principles, procedures, key points and examples of the two collection methods are described in detail, followed by a comparison of their advantages and disadvantages.

Key words volatile infochemicals, collection method, adsorbent trap method, solid-phase microextraction (SPME) method

信息化学物质的样品制备是进行定量分析和生物活性测定研究的前提和基础。挥发性化学物质是最常见的信息物质类型，如昆虫性信息素、植物挥发性次生物质等。昆虫性信息素的样品常常是采取解剖腺体、在试剂中浸泡而获得，但如果要了解信息素的自然情况比如释放量或释放节律，就需要在不干扰昆虫的情况下收集昆虫释放到空气中的信息素（Leonhardt and Beroza, 1982）。同样，在植物与昆虫相互作用关系的研究中，收集植物挥发性的次生物质是进行许多相关研究的前提。选取有效的方法收集这些信息物质是顺利开展研究的关键。根据试验材料、目标化合物性质以及后续实验目的的不同，信息化学物质的提取方法各不相同，因此在制备样品之前要对这些条件进行充分调研，综合考虑选择合适的样品制备方法（图 1）。本文以植物挥发性化学物质为例，介绍样品收集最常用的“吸附剂收集法”和“固相微萃取（SMPE）收集法”。昆虫性信息素和其它类别的挥发性化学物质的收集，都可以采取类似的装置和步骤。

1 吸附剂收集法

1.1 原理

吸附剂收集法，又称动态顶空收集法，是把植物整体或部分放入密闭的塑料袋或容器中，让

* 资助项目：国家公益性行业（农业）科研专项（201203036）

**通讯作者，E-mail: fmyan@henau.edu.cn

收稿日期：2014-01-20，接受日期：2014-03-06

气流不断通过吸附柱，从中收集植物挥发性的化学成分。动态顶空收集法基本装置包括以下几个部分：供气泵、气体净化瓶、采样室、吸附柱、流量计及抽气泵（图 2）。供气泵和抽气泵均可以采用大气采样仪，气体净化瓶可以根据实际需要用装有活性炭、硅胶的孟氏洗瓶组成，如对活体植物的挥发性次生物质进行收集，还可增加装有蒸馏水的孟氏洗瓶以提高进气的湿度。

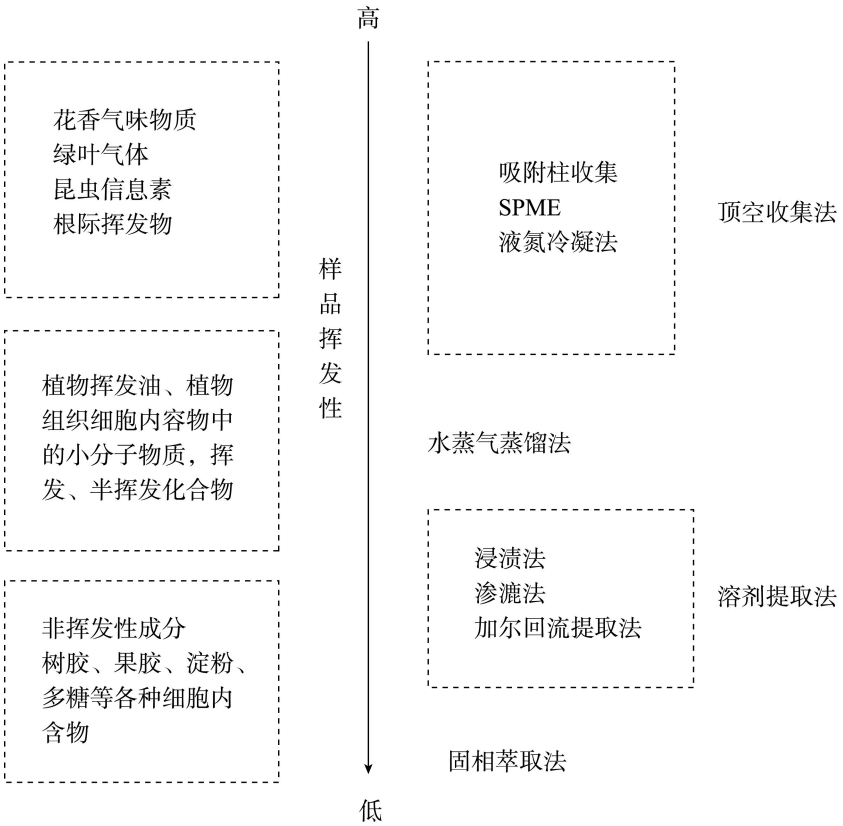

图 1　常用样品收集方法
Fig. 1　Methods for infochemical collections

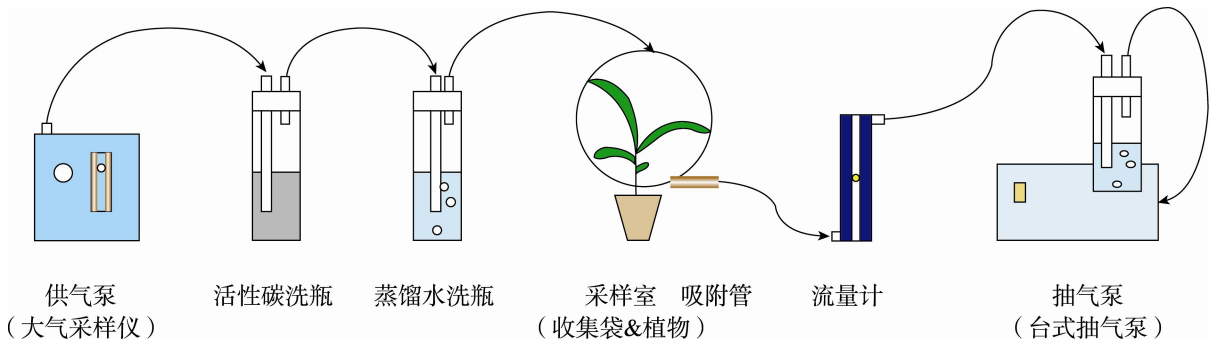

图 2　吸附剂收集法示意图（引自黄翠虹，2006）
Fig. 2　The assembly of absorbent collection method (from Huang, 2006)

此法的优点是既可对采摘下来的叶、花等植物器官采样，又能够对活体植物进行采样，对象可以是整株植物也可以是植物的一个枝条，还可以进行时间轴的跟踪测定。样品后续定量测定方法可以是气相色谱也可以是液相色谱；测定结果能够较真实地反映出被测植物所释放的化学组分及其比例，可用来进行昆虫行为的生物测定。此法的缺点是所需收集时间较长。

1.2 吸附柱的制备

吸附柱可以根据需要订制玻璃管或不锈钢管自己填装吸附剂。吸附管可采用内径 3.5~4.0 mm、长 80~180 mm 的玻璃管，也可以用内径 5 mm、长 90 mm（或 180 mm）内壁抛光的不锈钢钢管，取适量吸附剂进行装柱，依次用乙醚、甲醇、正己烷清洗，氮气吹干；或进行热解活化。吸附剂为多孔高聚物合成树脂，具体选用的吸附剂要根据目标物质的理化性质进行选择，常用的吸附剂种类及其特性见表 1。

以 Paropak Q 吸附柱的制备为例，吸附柱的装填过程如下：吸附剂 Paropak Q（Waters Associate Inc，USA, 50-80 目）60 mg 在洁净的小烧杯中依次用约 10 mL 乙醇、乙醚和正己烷冲洗一遍，然后放入 10 mL 色谱纯正己烷封口放置过夜，第 2 天倒去正己烷，分别用三氯甲烷（色谱纯）和正己烷再冲洗一遍，晾干。取洁净的玻璃管（直径 5 mm，长 60 mm），先用玻璃纤维将管的一端封堵，用医用硅胶管接上微型台式真空泵；另一头插入小玻璃漏斗，开动真空泵把 Paropak Q 吸入玻璃管中，另一端也用玻璃纤维封堵，做成吸附柱。吸附柱用干净的锡箔包好，塑料袋密封，放置于 4℃冰箱备用。吸附柱在使用之前再用 2~3 mL 色谱纯正己烷淋洗，然后用

表 1 常用吸附剂及其特性

Table 1 Commonly used absorbents and their properties

名称 Name	化学组成 Chemical component	适用对象 Applicable	极性 Polarity	最高温度 Max Temperature (℃)	洗脱剂 Eluents
XAD-2 树脂	聚苯乙烯型 Polystyrene	适用于疏水化合物分离；酚、有机物分离；表面活性剂；芳香烃化合物	非极性	150	甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯，0.5-5 mL/min
GDX-101	二乙烯苯交联共聚物 Divinylbenzene crosslinked copolymer	气体及低沸点化合物	非极性	270	
Tenax-TA/GC	苯呋喃多孔聚合树脂 Benzene-furan porous polymeric resin	大气、呼吸气、香精香料和室内空气的高沸点化合物，如醇、酚、胺、醛、酮和卤代芳烃等。	非极性	350	

* 资助项目：国家公益性行业（农业）科研专项（201203036）

**通讯作者，E-mail: fmyan@henau.edu.cn

收稿日期：2014-01-20，接受日期：2014-03-06

Porapak Q	乙基乙烯苯、二乙烯苯共聚物 Copolymer of ethyl vinyl benzene and divinylbenzene	适合分析乙烯、乙炔、烷烃、芳烃、含氧有机物、卤代烷等	最小极性	250	正己烷
HayeSep P		广泛分离羰基化合物二醇类和醇类	最小极性	250	

99.999% N_2 吹干。使用过的吸附柱可以经高温热脱附或把用索氏提取器把残留成分洗净。

1.3 采样室的选择

采样室可以根据收集对象的特点选择采样瓶、收集袋和玻璃钟罩等。

若收集植物较小体积的器官，如小麦或水稻穗释放的挥发性气体，可采用特制的锥形瓶（高 18 cm，底部直径 10 cm，上瓶口内径 2.5 cm，侧部斜面左边上方有一个内径 5 mm 的进气口，右边下方有一个内径 5 mm 的出气口）作为采样器。

如果收集目标植物的器官较大，需要制作较大体积的收集瓶；若对整个地上部分收集可做玻璃钟罩作为采样室把整个植株罩起来进行采样。玻璃钟罩适用于单茎秆的植物地上部分挥发性代谢物的收集，用两块金属垫板把植物地下部分与地上部分隔开，金属垫板中间有小圆孔可以让茎秆穿过（Halloran *et al.*，2013），茎秆与金属垫板之间的空隙用脱脂棉填满，罩上玻璃钟罩，洁净空气从钟罩顶部吹下。玻璃采样瓶、钟罩在使用前必须先用洗液浸泡，再用乙醇、重蒸水清洗，然后于 180℃下烘 2 h 确保无杂质。

对于比较大的植株或枝条，也可以利用质量较好的无挥发性物质的收集袋作为采样室，如微波炉加热用袋（Oven bag，Large size 型，美国 Reynolds 公司出品），或者 Tedlar 采样袋（大连德霖气体包装有限公司）。收集袋需用塑料防尘袋包装，从而保持使用前的清洁。新的采样袋使用前要用正己烷及酒精进行反复擦拭以及老化，减少塑料中挥发性成分对测量结果的影响。无论是用采样瓶、钟罩还是收集袋，与植物茎秆接触的部分均要用脱脂棉衬垫后封紧，以免对植物造成机械损伤。

植物地下部分的挥发性气体也是近年的研究热点，植物根际挥发性化合物对植物和地下昆虫、线虫等起着化学通讯分子的作用，其样品制备与地上部分稍有不同。收集根际挥发性气体可以把植物种在一个容器中，里面装上已经灭菌过的洁净海砂（Ali *et al.*，2010），培养若干天后，接上吸附柱进行抽气，其他操作与地上部分相同。

1.4 采样注意事项

（1）收集装置各部分（包括连接管）实验前需用溶剂彻底清洗、晾干；(2）对活体植物采样时需注意植物挥发性次生代谢物的释放节律，每次采样应在一天的相同时段进行；(3）活体植物挥发性次生代谢物的释放受光合作用影响，每次采样应进行照度测定，以保证在相同照度下收集；(4）收集前应进行预抽气，即连接收集系统，暂时不接入吸附柱，预运行一段时间后再接入吸附柱，以确保采样室内的空气洁净；(4）采样后吸附柱最好能马上用溶剂进行洗脱，用样品瓶收集洗脱液进行分析；或接入热脱附装置-GC（或 GC-MS）进行分析。如在野外收集，吸附柱收集气体后需用铝箔包裹密封并用冰盒带至实验室进行处理；(5）收集时间的选择：一般用于 GC 分析的样品，抽气 30 min 即可；如果用于溶剂洗脱，则需 4~6 h；若要用于生物测定，则需收集更长时间或合并样品以满足实验用量。

1.5 示例

玉米挥发性化学物质的收集（黄翠虹，2006；Huang *et al.*，2009）。

吸附剂选用 Paropak Q（Waters Associate

Inc，USA，50~80 目)，收集使用耐高温塑料袋（Reynolds，Richmond，Virginia，USA；406 mm×444 mm)，使用前用正己烷浸泡的脱脂棉反复擦洗 3~5 遍，在室温下打开袋口晾干，尽量减少塑料袋本身的挥发性气体的干扰。

收集装置的连接如下：在玉米苗的茎上缠上一圈棉花作为保护，用耐热塑料袋把玉米苗地上部分罩起来，用耐热塑料袋配备的塑料封口带在茎部扎紧，塑料袋上部开口接进气管，下部开口接吸附剂管。完整气路如图 1 所示：室内空气→大气采样仪（QC-1，北京劳动保护研究所）→装有蒸馏水的孟氏洗瓶（加湿）→装有活性碳的孟氏洗瓶（净化）→罩有玉米苗的塑料袋→吸附柱→流量计→微型台式真空泵。大气采样仪的气流量为 1 L/min，流量计的气流量为 800 mL/min，多余的气体从植物的茎秆封口处排出，以保证塑料袋内为正压，使室内未经净化的空气不能进入收集气路。所有玻璃管的连接管路都采用无挥发性气体的医用硅胶管，用 Parafilm 和棉绳密封，塑料袋由支架支撑，植物本身不承担其重量。收集温度 28ºC，光照 1 000 lx，收集时间 6 h（1:00 pm 到 7:00 pm)。收集完毕后用 500 μL 正己烷淋洗吸附柱，所得液体装入 GC 样品瓶中，加入 200 ng 正辛烷和壬酸乙酯作内标密封，－20 ºC 保存待测。空的耐热塑料袋（不罩植物）连接到气路中收集 6 h 作为空白对照。

2　固相微萃取（SPME）收集法

2.1　原理

固相微萃取（Solid-phase microextraction, SPME）由手柄和萃取头两部分构成，外形似一支色谱注射器，萃取头是一根涂有固定相或吸附剂的熔融石英纤维，接不锈钢丝，外套细的不锈钢针管（保护石英纤维不被折断及进样)，纤维头可在针管内伸缩（Jocelyn *et al.*，1998)。固相微萃取是利用涂有吸附剂的纤维收集挥发性化学物质后直接将纤维插入 GC 进样口或 SPME/HPLC 接口解吸池进行脱附、分析。该技术具有简单、方便、快速的特点，适合于收集各种气体、液体、固体以及生物样品中各类挥发性或半挥发性物质，有时还可收集其他方法不能收集的物质，如氨和挥发性胺。这种方法不使用溶剂，避免了溶剂对样品的污染。SPME 适合于收集已知结构或结构简单的化合物，对于痕量分析灵敏度稍嫌不足。

使用 SPME 时应注意不同纤维在吸附剂种类和涂层厚度各不相同，纤维头上的吸附剂对化学物质的吸附性依分子大小、极性和官能团不同而异，必须根据分析对象选择合适的纤维头（表 2)。

2.2　SPME 萃取样品过程

将 SPME 针管穿透样品瓶隔垫或采样室（可参考顶空收集法)，插入密闭系统中，推手柄杆使纤维头伸出针管，纤维头可以浸入水溶液中（浸入方式）或置于样品上部、活体植物上部空间（顶空方式)，吸附时间短的几分钟，长的可数小时。收集后缩回纤维头，然后将针管退出样品瓶或采样室后可不经任何处理，将萃取头直接插入到 GC 进样口或 SPME/HPLC 接口解吸池进行脱附、分析。在 GC 中进样口的解吸过程主要受进样口温度、解吸时间、起始柱温和待测物的性质影响，较高的进样口温度可以缩短解吸时间，但会使某些热不稳定物质发生热降解，而且过高的进样口温度会引起待测物于气相色谱柱

表 2　常用 SPME 纤维及其特性
Table 2　Commonly used SPME fibers and their properties

纤维涂层 Coating	厚度 Thickness (μm)	适用对象 Applicable	备注 Remark
聚二甲硅烷 Polydimethylsiloxane (PDMS)	100	低分子量或挥发性组分	溶剂不可用正己烷
	30，7	较大分子量或半挥发性组分	

聚丙烯酸酯 Polyacrylate	85	从极性样品中提取强极性成分
聚二甲硅烷/二乙烯基苯 Polydimethylsiloxane/ divinylbenzene (PDMS/DVB)	65	挥发性的极性化合物，如醇类、胺
聚二甲硅烷/碳分子筛 PDMS/Carboxen	75	痕量挥发物
二乙烯基苯-碳分子筛 Divinylbenzene/ Carboxen	50/30	C3-C20

入口部分的低温聚集。在 HPLC 进样中，一定要考虑萃取头对溶剂的承受能力，部分萃取头不能直接浸泡在有机溶剂中，会造成萃取头脱落，如需在 HPLC 中使用要购买专用型号。

3 吸附剂收集法和固相微萃取收集法的比较

两种方法都可以用于收集植物的或昆虫的化学物质，但各具特点。下面是作者在工作中体会到的两种方法的优缺点（闫凤鸣，2011），供大家选择收集方法时参考：

第一，吸附剂收集法用于收集挥发性气味物质，而 SPME 既可以收集挥发性化学物质，也可以收集非挥发性的化学物质；

第二，吸附剂收集法用时较长，一般要几个小时甚至几天，而 SPME 收集时间一般可以几分钟到几十分钟，最长也不超过 3 个小时；

第三，吸附剂收集的化学物质，经淋洗后可以分成几份，可分别用于化学分析、行为测定和后续的验证；而 SPME 收集的样品，或者直接用于化学分析，或者用于行为测定，不能备份验证；

第四，吸附剂收集的样品数量较多，在测试时可以使用较高的浓度；而 SPME 收集的物质相对较少，不能满足较高浓度试验的需要；

第五，SMPE 收集方法无需使用溶剂，收集后直接在 GC 上热脱附分析，可以避免由于溶剂不纯而造成的污染。

参考文献 (References)

Ali JG, Alborn HT, Stelinski LL, 2010. Subterranean herbivore-induced volatiles released by citrus roots upon feeding by *Diaprepes abbreviatus* Recruit entomopathogenic nematodes. *J. Chem. Ecol.*, 36: 361–368.

Huang CH, Yan FM, Byers J, Wang RJ, Xu CR, 2009. Volatiles induced by the larvae of the Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*) in maize plants affect behavior of conspecific larvae and female adults. *Insect Science*, 16(4):311–320.

Halloran ST, Mauck KE, Shelby FF, Tumlinson JH, 2013. Volatiles from intact and *Lygus*-damaged *Erigeron annuus* (L.) Pers. are highly attractive to ovipositing *Lygus* and its parasitoid *Peristenus relictus* Ruthe. *J. Chem. Ecol.*, 39: 1115–1128.

Millar JG, Haynes KF, 1998. Methods in Chemical Ecology: Chemical Methods. Kluwer Academic Publishers. 8–19.

Leonhardt BA, Beroza M, 1982. Insect Pheromone Technology: Chemistry and Applications. Washington DC: American Chemical Society. 260.

黄翠虹, 2006. 亚洲玉米螟取食对玉米次生代谢物质的诱导研究. 博士学位论文. 北京: 北京大学.[Huang CH, 2006. Studies on the Asian corn borer on feeding to induct of the secondary metabolites in Maize. Doctoral Dissertation.. Beijing: *Peking University*.]

闫凤鸣(主编), 2011. 化学生态学(第二版). 北京：科学出版社. 242－299.[Yan FM, 2011. Chemical Ecology (Second Edition). Beijing :*Science Press*. 242–299.]