信息物质的化学分析技术*

李静静[1] 雷彩燕[1] 黄翠虹[2] 周 琳[1] 闫凤鸣[1**]

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

摘 要 化学生态学研究中最常应用的化学分析技术是气相色谱-质谱联用技术（GC-MS）和高压液相色谱技术（HPLC）。本文根据实践经验和体会，重点介绍样品制备要点、GC-MS 和 HPLC 的基本原理、如何选择化学分析技术、信息化学物质定性和定量分析的要点以及示例等。

关键词 化学分析，气相色谱-质谱，高压液相色谱，样品制备，定性分析，定量分析

Chemical analysis techniques for infochemicals

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

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002,China;

2. Shunde Polytechnic College, Guangdong 528333, China)

Abstract Gas chromatography-mass spectrum (GC-MS) and high pressure liquid chromatography (HPLC) are the two techniques most frequently used in research on chemical ecology. Drawing on the authors' experiences, this paper discusses key points related to sample preparation, the principles of GC-MS and HPLC, how to select techniques for chemical analysis, the qualification and quantification of samples, and describes and discusses some examples in detail.

Key words chemical analysis, GC-MS, HPLC, sample preparation, qualification and quantification

化学生态学研究的基本程序包括田间观察、化学物质的提取和分析、生物测定和田间试验等步骤，其中化学分析是至为关键的一步。化学分析方法很多，既有定量分析方法，又有定性分析方法。用于定量的方法有气相色谱法、液相色谱法（张启元，1992）和分光光度法等；而应用于定性分析的方法除常规化学法外，还有紫外光谱法、红外光谱法、质谱法和核磁共振波谱法等，被称为有机化合物鉴定的四大谱，在有机化合物的鉴定领域发挥着重要作用。本文根据实践经验和体会，重点介绍样品制备要点、气相色谱-质谱联用技术（GC-MS）和高压液相色谱技术（HPLC）的基本原理、如何选择化学分析技术、信息化学物质定性和定量分析的要点以及示例等。

1 样品制备要点

化学分析前，化学物质的制备非常关键，否则很可能因为数量或纯度不够，无法达到检测的预期效果。因此，样品的准备需要满足三方面的要求：一是需要足够的量；二是在多数情况下需达到足够的纯度；三是样品在上机前作一定处理等。样品制备过程中非常有必要注意以下几点（闫凤鸣，2011）：

第一是稳定性问题：天然化学物质稳定性各不相同，多数稳定性差，必须有一些减少降解的特殊方法；提取的化学物质一定要密封后冷冻保存。

* 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

第二是数量问题：在一次提取或收集中，很难得到足够数量的目的化合物，也就是很难在分析中检测到，解决的办法是可以把几次收集到的化学物质合并或进行浓缩，如果是收集到的植物挥发性气味物质浓度太低，也可以通过延长收集时间来解决。通过反复比较探索，选出最佳制备方法，利用最少的材料得到最多（或全部）目的化合物。不过，现代分析技术检测灵敏度都很高，需要的样品量很少，如质谱的可达 10^{-9} mg，固体样品 1 mg 以内也可测定，液体样品几个微升即可。

第三是污染问题：一定要防止对提取物质的污染。特别要注意玻璃器皿的清洁，用洗涤剂浸泡后再用蒸馏水、丙酮或乙醇淋洗，最后放入烘箱烘干（125℃以上，8~12 h）。

2 GC-MS 和 HPLC 原理

2.1 气相色谱-质谱联用分析（GC-MS）

气相色谱（Gas chromatography，GC）是指用气体作为流动相的、自动化程度较高的柱色谱法，是先分离后测定，可同时给出多组分混合物中各组分的定性定量结果。气相色谱法具有分离效率高、灵敏高、选择性好、分析速率快及应用范围广等特点。在化学生态学研究中，特别适合于分析信息素、植物挥发性化学物质。

质谱（Mass spectrum，MS）是指样品分子或原子离子化为各种质-荷比的离子，经质量分析器分离后，被检测器记录而成的谱图。根据质谱图来分析样品所属化合物的类别及其结构，叫做质谱解析。在实际工作中，最常用的和最可靠的方法是和已知化合物的质谱进行比较对照，即检索质谱库。在有机结构鉴定的 4 大方法（核磁，紫外、红外和质谱）中，质谱法是唯一可以确定化合物分子结构的方法，并且具有灵敏度高的特点，用样量可以小至 10^{-10}~10^{-14} g。

气相色谱-质谱联用分析（Gas chromatography-mass spectrum，GC-MS），样品通过气相色谱分离、纯化后直接进入质谱系统，实现质谱分析，则可大大提高分析的效率。可对样品中的全部或指定成分进行定性和定量分析，不仅可以确定化合物的元素组成，而且可以鉴定其分子结构。

2.2 高压液相色谱（HPLC）

高压液相色谱法（High pressure liquid chromatography， HPLC）自 20 世纪 60 年代末以来，以其分析速度快、分离效率高和灵敏度高等特点，广泛应用于化工、医药、农业等领域。与气相色谱相比，高压液相色谱可以分析的化学物质的范围更广，不受样品挥发度和对热稳定性的限制，非常适合于分析大分子、高沸点、强极性、离子性及热不稳定和具有生物活性的化学物质，而且可以在室温下操作，柱容量高，特别适用于样品的制备和分离（张启元等，1992）。

液相色谱法以液体作为流动相。分析前，选择适当的色谱柱和流动相，开泵，冲洗柱子，待柱子达到平衡而基线平直后，用微量注射器把样品注入进样口，流动相把试样带入色谱柱进行分离，分离后的各组分依次通过检测器，检测信号输入到记录仪，得到色谱图。

2.3 气相色谱柱的选择

1）选择的原则

根据“相似相溶”原理，首先要大致确定所分析化学物质的极性，再决定选择哪种类型的色谱柱。一般来说，只包含碳氢的化合物是非极性的，既包含碳氢又包含氧、氮或卤原子的化合物属于极性的（如醇、酮等），而包含不饱和键的化合物则属于可极性化的（如烯、炔、芳香族）。分析极性化合物选择极性柱，对象是非极性化合物选择非极性柱。

如果不清楚所分析化合物的极性，就使用当前 GC 上的现有色谱柱，根据分离效果，再尝试其它色谱柱类型。例如，你可以选择极性不同的 3 根柱子（例如 DB-5，DB-17，DB-wax）用待测样品进行试验，根据出峰是否对称、出峰多少等，基本可以判断你的样品所需要的色谱柱类型了。

2）色谱柱主要类别

对于大多数化学生态学的样品（如挥发性化

学物质、昆虫信息素）的分析，一般使用 30 m 长、内径 0.25mm 的非极性毛细柱。表 1 是一些色谱柱的极性及应用。

3 分析方法的选择

很多初始做化学生态学工作的工作者，常为选择哪种化学分析方法而纠结。这里，我们提供一些自己的体会，供大家参考。

3.1 根据分析对象

化学生态学所要研究的信息化学物质包括 3 类，第一类是蛋白和多肽，第二类是昆虫信息素（性信息素、聚集信息素等），第三类是植物次生物质（包括挥发的和非挥发的）。三类物质所用的分析方法各有不同：

对第一类（蛋白和多肽）来说，应用生物化学和分子生物学方法进行分析，这不是本文要叙述的内容；

对第二类物质（昆虫信息素）和第三类物质，可以应用气相色谱或者液相色谱进行分析。一般来说，挥发性的物质（如昆虫信息素和小分子的植物次生物质），用气相色谱；而非挥发性的植物次生物质（大分子）或者热不稳定的物质，可以选择使用液相色谱。

3.2 根据对化合物的了解程度

如果所要分析的化学物质是非常熟悉的，如是挥发性的，例如昆虫性信息素（通常只包括几个化学组分）和某类植物次生物质（比如乙烯类），使用 GC 就可以了；如果是非挥发性的大分子植物次生物质，例如环氧肟酸类（单子叶中所含的丁布 DIBMOA 类），使用 HPLC 比较合适。这类分析一般有标准品进行对比，利用单独的色谱技术就可以定性和定量，没有必要使用质谱。

如果所要分析的化学物质比较复杂而且有许多未知成分，比如某类植物释放的挥发性的植物次生物质，其化学组分一般有几十个甚至上百个，这种情况下必须使用 GC-MS 才能解决问题。

4 化学分析过程

由于现代分析技术的自动化，化学分析过程变得越来越方便和快捷，使用也越来越简单。

4.1 昆虫信息素

通过查找文献，如果相近种类的信息素组分有过报道并有现成的信息素成分标准品，利用 GC 分析就可以了。首先把提取的信息素样品进样分析，再把标准品配成一定浓度的溶液用 GC 分析一次，对照二者出峰顺序和时间，即可确定信息素组分。

4.2 挥发性植物次生物质

由于这类物质种类较多，最好先进行 GC-EAD 筛选（Zhang *et al.*，1999），确定几种对昆虫有电生理活性的物质，再用 GC-EAD 中相同的 GC 分析条件和升温程序进行一次 GC-MS 分析，找出活性成分的 GC 峰，在对应的质谱图中查出质谱库给出的建议化合物的结构和名称，再购置相应的标准品，依相同 GC 条件进行分析，如果出峰顺序和质谱结果相同，就可以鉴定出活性物质。

但很多情况下，植物挥发性化学物质中的活性成分难以购置到标准品，这是活性化学物质鉴定中最常遇到的问题。这个问题可以通过两种办

表 1 一些 GC 色谱柱的性质和可用于分析的化学物质类别
Table 1 Properties and applications of some GC columns

极性 Polarity	适用对象 Applicable	色谱柱举例 Examples of columns
非极性 Non-polar	生物碱，小分子挥发物等	DB-5，HP-5，EP-5
中极性 Medium-polar	醇类，酚类，芳香烃，多环芳烃，甾类化合物等	DB-1701，OV-1701，BP-10

极性 Polar	醛类，酮类，有机酸，芳香族等	DB-Wax， HP-20M

法解决：自己分离和提纯，经四大谱鉴定后作为标准品；委托公司进行合成。如果在 MS 中找不到相应的图谱，就需要进行人工解析，只有化学分析的专业人员才能完成这项任务。

4.3　化合物的定量

待测化合物的含量或浓度，一般是通过标准样品的量进行换算。标准样品的进样分析分为内标和外标两种，内标是在待测样品中加入一定量的标准样品，外标是只单独利用相同色谱条件对标准样品进行分析，二者的标准品都要制成标准曲线，待测样品与之对照进行换算。还有一种相对峰面积百分率法，即以色谱中所得各种成分的峰面积的总和为 100，按各成分的峰面积总和之比，求出各成分的组成比率。

5　应用实例

5.1　GC-MS 分析转 Bt 基因棉挥发性化学物质

经 GC-EAD 检测过的挥发性化学物质，用 GC-MS 做进一步分析。质谱仪为 Finnigan Mat TSQ700，气相色谱为 HP 5890，内置长 30 m，内径为 0.25 mm 的色谱柱（DB-Wax column，J&W Scientific，Folsom，CA 96830，USA）。温度程序为：50℃保持 5 min，然后以 8℃/min 上升到 220℃。进样温度为 200℃。样品化学成分通过与标准样品的滞留时间和质谱图谱来确定（闫凤鸣等，2002）。

5.2　HPLC 分析芥菜中芥子油苷成分和含量

使用 30 mm 预置柱和 250 mm × 4 mm C18RP 高压液相色谱分析柱（Nucleosil 120-5 C18，颗粒大小 5 μm）（Macherey and Nagel 公司），注样 20 μL，以 25%乙醇和 0.005 M TAS(硫酸四丁铵) (Tetrabutylammonium hydrogen sulfate) 的均匀混合溶液作流动相，流速为 1 mL/min，运行 25 min。使用 Varian 2050 紫外记录仪和 HP-3395 综合仪在 227 nm 波长下检测样品，以纯芥子油苷溶液做对照，比较紫外光谱、滞留时间和峰面积，对样品中的芥子油苷进行定性和定量（闫凤鸣，2000）。

5.3　HPLC-MS 分析玉米中环氧肟酸类化合物的含量

制备好的样品用高效液相色谱质谱联用仪 (Aglient 1100 series HPLC，DAD detector， Mass Spectrum)进行分析，具体分析条件如下：上样量 20 μL；色谱柱为 Sepax HP-C18 column (250 mm × 4.6 mm，填料厚度 5 μm)；柱温 30℃，流速 1 mL/min；检测波长 263 nm，洗脱体系甲醇-水（0.027%TFA/ L H_2O）（黄翠虹，2006; Huang *et al*.，2006）。

HPLC 洗脱梯度见表 2。

表 2　环氧肟酸类化合物 HPLC 分析洗脱梯度*
Table 2　Gradient elution for HPLC analysis of cyclic hydroxamic acids

时间 Time（min）	B (%)
0-6	35-40
6-9	40
9-11	95
11-18	35

*洗脱体系：A=H_2O 含 0.027%TFA；B=MeOH.

*Elutent system: A=H_2O with 0.027%TFA；B=MeOH.

环氧肟酸类化合物的鉴定是通过紫外吸收全波长扫描图谱（扫描波长从 200 nm 到 400 nm）和质谱图来进行的。这些物质的含量是用外标法进行定量，样品中的 DIMBOA、HMBOA 和 DIBOA 用 263 nm 波长的紫外扫描计算吸收峰面积，然后根据标准曲线算出含量。每个样品进样 3 次，取其平均值。

参考文献 (References)

Huang CH, Yan FM, Wang XY, Xue K, Wang RJ, Xu CR, 2006. Distribution and variation of cyclic hydroxamic acids in maize induced by the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*. *Z. Naturforsch*., 61c (3/4): 257–263.

Zhang QH, Birgersson G, Zhu J, Löfstedt C, Löfqvist J, Schlyter F, 1999. Leaf volatiles from nonhost deciduous trees: variation by tree species, season and temperature, and electrophysiological activity in *Ips typographus*. *J. Chem. Ecol.*, 25(8): 1923–1943.

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，2000．芥子油苷在甘蓝蚜寄主部位选择行为中的作用．昆虫学报, 43 (3): 297–304. [Yan FM, 2000. Role of glucosinolates in the host plant part preferences by the cabbage aphid, brevicoryne brassicae. *Acta Entomologica Sinica*, 43(3): 297-304.]

闫凤鸣, 2011．化学生态学（第二版）．北京：科学出版社. 242–334. [Yan FM, 2011. Chemical Ecology (Second Edition). Beijing :*Science Press*. 242–299.]

闫凤鸣，许崇任，Bengtsson M, Witzgall P, Anderson P, 2002. 转 Bt 基因棉挥发性气味的化学成分及其对棉铃虫的电生理活性．昆虫学报，45(4): 425–429. [Yan FM, Xu CR, Bengtsson M, Witzgall P, Anderson P, 2002. Volatile compositions of transgenic Bt cotton and their electrophysiological effects on the cotton bollworm. *Acta Entomologica Sinica*, 45(4): 425-429.]

张启元, 李素文, 张鸿卿等, 1992. 现代生物学实验技术. 北京: 北京师范大学出版社. 108–139.[Zhang QY, Li SW, Zhang HQ, 1992. Modern biological experiment technology. Beijing: *Beijing Normal University press*. 101-139.]