



生物实验室

基于硅胶管吸附萃取的热脱附-气相色谱-质谱联用法测定真菌的挥发性有机化合物

毛黎娟^{1,2} 葛洋¹ 周文武¹ 祝增荣¹ 章初龙^{*1}

1 浙江大学农业与生物技术学院 水稻生物学国家重点实验室 浙江 杭州 310058

2 浙江大学农生环测试中心 浙江 杭州 310058

摘要:【背景】真菌代谢产生的挥发性有机化合物(Volatile organic compounds, VOCs)具有重要的生物学功能。高通量的 VOCs 测定方法对于 VOCs 产生菌的筛选非常重要。【目的】建立一种简单可靠、基于硅胶管吸附萃取(Silicone tube sorptive extraction, STSE)的热脱附-气相色谱-质谱(Thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, TD-GC-MS)联用法测定真菌培养物 VOCs 的高通量分析技术。【方法】选择代表性的包括酯、酮、醇、醛、烯等 21 种 VOCs 作为对照品建立标准曲线;将对照品滴加于 PDA 培养基,基于 STSE 进行 TD-GC-MS 分析,测定其专属性;将木霉菌 T552 接种于 PDA 培养基,基于 STSE 进行 TD-GC-MS 分析,测定方法的重复性;在以上基础上,用上述试验条件对 6 株木霉菌产生的 VOCs 进行筛选。【结果】在全扫描和提取离子条件下,21 种对照品分别在 1.0–10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1–10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。基于 STSE 的 TD-GC-MS 分析发现,滴加在 PDA 培养基上的对照品分离良好,且 PDA 培养基平板中的其它物质不干扰 VOCs 的测定,表明该方法专属性良好;对 PDA 培养的木霉菌 T552 进行的 VOCs 重复测定鉴定的 5 种 VOCs 相对标准偏差均小于 10%,表明该方法重复性良好。用建立的基于 STSE 的 TD-GC-MS 方法从 6 株供试木霉菌中鉴定出包括酸、醇、酯、烯等共 37 种 VOCs。【结论】建立了一种简单可靠、基于 STSE 的 TD-GC-MS 分析测定真菌培养物 VOCs 的高通量分析技术,可用于真菌 VOCs 的分析测定。

关键词: 挥发性有机化合物, 硅胶管吸附萃取, 热脱附-气相色谱-质谱

Determination of fungal volatile organic compounds by thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry analysis based on silicone tube sorptive extractionMAO Li-Juan^{1,2} GE Yang¹ ZHOU Wen-Wu¹ ZHU Zeng-Rong¹ ZHANG Chu-Long^{*1}

1 State Key Laboratory for Rice Biology, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

2 Analysis Center of Agrobiology and Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

Abstract: [Background] Volatile organic compounds (VOCs) produced by fungi have important

Foundation items: Special Foundation for the Basic Work of Science and Technology (2014FY120900); Experimental Technique Research Project of Zhejiang University (SJS201915)

*Corresponding author: Tel: 86-571-88982291; E-mail: clzhang@zju.edu.cn

Received: 04-03-2019; Accepted: 13-05-2019; Published online: 20-05-2019

基金项目: 科技基础性工作专项(2014FY120900); 浙江大学实验技术研究项目(SJS201915)

*通信作者: Tel: 0571-88982291; E-mail: clzhang@zju.edu.cn

收稿日期: 2019-03-04; 接受日期: 2019-05-13; 网络首发日期: 2019-05-20

biological functions. The high-throughput VOCs analysis method is required for the screening of VOCs producing fungi. **[Objective]** To establish a robust, simple, high-throughput analysis technique for VOCs produced in petri dishes by thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry (TD-GC-MS) analysis based on silicone tube sorptive extraction (STSE). **[Methods]** Twenty-one representative VOCs including esters, ketones, alcohols, aldehydes and alkenes were selected as reference substances to establish the standard curve. TD-GC-MS analysis based on STSE was performed by dropping the reference substances into the PDA medium to determine the specificity and by inoculating *Trichoderma* strain T552 into the PDA medium to determine the repeatability. On this basis, the VOCs produced by 6 strains of *Trichoderma* were screened with the above method. **[Results]** The linear relationships of 21 reference substances were good in the range of 1.0–10.0 $\mu\text{g/mL}$ and 0.1–10.0 $\mu\text{g/mL}$ under the conditions of full scanning and extraction ion. TD-GC-MS analysis based on STSE showed that the reference substances dropped into the PDA separated well, and other substances in the PDA petri dish did not interfere with the determination of VOCs, indicating that the method had good specificity. Repeated determination of VOCs produced by *Trichoderma* strain T552 cultivated in the PDA medium was carried out, the relative standard deviation of the five VOCs identified were less than 10%, indicating that the method had good repeatability. A total of 37 VOCs including acid, alcohol, ester and alkene were identified from 6 *Trichoderma* strains were screened out by the established TD-GC-MS analysis based on STSE. **[Conclusion]** A robust, simple, high-throughput analysis technique for VOCs produced in petri dishes by TD-GC-MS analysis based on STSE was established, which can be used for the determination of fungal VOCs.

Keywords: Volatile organic compounds, Silicone tube sorptive extraction, Thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry

挥发性有机化合物(Volatile organic compounds, VOCs)是指低分子量、低沸点、易挥发的有机化合物,已报道的由真菌和细菌产生的 VOCs 有 800 多种,包括醇类、醛类、酮类、萜烯类、烯烃类、烷烃类和酯类等,它们是多种代谢途径的中间产物和终产物^[1-2]。VOCs 赋予微生物特殊的气味,如蘑菇风味由一系列含有 8 个碳的挥发性物质组成,包括 1-辛醇、3-辛醇、3-辛酮、1-辛烯-3-醇、2-辛烯-1-醇和 1-辛烯-3-酮等^[3]。另外, VOCs 可作为微生物与微生物、微生物与动植物交流的化学信号,如木霉产生的 6-戊基-2H-吡喃-2-酮(6-Pentyl-2H-Pyran-2-one, 6-PP)不仅可以抑制立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)等植物病原真菌的生长^[4],还可促进植物生长和诱导植物抗病性^[5]。

微生物产生 VOCs 受到基因型以及培养环境的影响,为了了解不同微生物产生的 VOCs 及其生理和生态功能,首先进行 VOCs 样品制备,然后通过气相色谱-质谱(Gas chromatography-mass

spectrometry, GC-MS)进行检测。VOCs 样品制备大致可分为溶剂法和顶空法^[2]。用有机溶剂可以从生物样品(如真菌菌丝体或培养液)中萃取得到更多的 VOCs,但这种样品制备方法不仅费时费力,而且溶剂提取物往往含有非挥发性物质以及溶剂或实验室设备中的杂质^[6]。因此, VOCs 样品制备方法逐渐向直接从生物样品的顶空收集气相挥发物的无溶剂萃取方法转变^[7],其中以固相微萃取(Solid phase microextraction, SPME)为代表的被动顶空采样法被广泛应用于微生物培养物的 VOCs 测定^[8-14]。被动顶空采样法大多采用由聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)或 PDMS 与其它吸附材料如二乙烯基苯(Divinylbenzene, DVB)等制成的混合物作为吸附剂直接从生物样品的顶空吸附 VOCs^[2]。硅胶管(Silicone tube)是用 PDMS 制造的,用一次性使用的硅胶管进行 VOCs 的被动顶空采样是一种价格低廉、灵活可靠的替代方案。与使用 PDMS 的 SPME 法相比,硅胶管吸附萃取法(Silicone tube sorptive extraction, STSE)的吸附容

量高, 允许对 $\text{Log}K_{ow}>5$ 的分析物进行极限萃取, 对 $\text{Log}K_{ow}<4$ 的分析物回收率更高, 因此 STSE 适用于广泛极性范围内分析物的吸取萃取^[15]。STSE 操作简单, 用硅胶管对分析物进行吸附萃取时, 首先将一定尺寸和容量的硅胶管切割成相同长度的短硅胶管, 以确保每次使用相同的体积, 然后将硅胶管在氮气流中加热清洗或用溶剂进行清洗。萃取时, 将硅胶管放入需要萃取的气相或水相样品中, 萃取时间取决于样品、硅胶管容量以及分析物。萃取后, 将硅胶管置于石英样品管中, 用热脱附-气相色谱-质谱 (Thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, TD-GC-MS) 联用仪进行解吸附并进行检测^[15]。

基于 STSE 的 TD-GC-MS 技术常应用于空气、水、牛奶等样品中有机化合物的检测^[15], Kallenbach 等率先将这一技术应用于田间条件下植物 VOCs 的分析^[16], 目前这一技术还未应用于真菌培养物 VOCs 的测定。木霉是一种典型的产生 VOCs 的真菌, 用溶剂法萃取了木霉菌株 FA1132 的 VOCs, GC-MS 分析发现 278 个可挥发性组分, 包括由二甲基烯丙基二磷酸 (Dimethyl allyldiphosphate, DMAPP) 与异戊烯基二磷酸 (Isopentenyl diphosphate, IPP) 通过香叶基二磷酸 (Geranyl diphosphate, Geranyl-PP) 和法尼基二磷酸 (Farnesyl diphosphate, Farnesyl-PP) 结合而成单萜和倍半萜, 由脂肪酸分解而成的烷烃、烯烃、甲基酮、C8 初级醇和 6-PP^[17]。本文以木霉菌为研究对象, 建立了一种简单可靠、基于 STSE 的 TD-GC-MS 分析测定真菌培养物 VOCs 的高通量分析技术, 可用于真菌 VOCs 的分析测定。

1 材料与方法

1.1 主要材料

硅胶管 (内径 1.0 mm, 外径 1.8 mm, 壁厚 0.4 mm), Carl Roth 公司; Tenax-TA 吸附管, Superlab 公司; TD100-xr 自动热脱附仪, Markes International 公司; Trace 1300 GC/ISQ 7000MSD 气

相色谱仪-质谱仪, Thermo Scientific 公司。

1.2 硅胶管、Tenax-TA 吸附管和空石英样品管预处理

用管线切割器将硅胶管切割成 1 cm 长的硅胶管, 然后在乙腈:甲醇溶液 (4:1, 体积比) 中浸泡 3 h 以上或过夜, 在通风柜中晾干, 于真空电热恒温干燥箱中 100 mL/min N_2 流下 210 °C 老化 3 h, 冷却到室温后分装到棕色玻璃瓶中, 充氩气保存备用。

将 Tenax-TA 吸附管和空石英样品管置于老化仪中, 在 60 mL/min N_2 流下 335 °C 老化 30 min 备用。

1.3 对照品溶液配制

选择 21 种代表性的 VOCs, 包括酯、酮、醇、醛、烯等作为对照品 (表 1)。分别精密移取对照品适量, 用乙醇作为稀释液进行稀释, 并配制成浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列对照品溶液。

1.4 标准曲线制备

对照品溶液以进样量 1.0 μL 直接注入 Tenax-TA 吸附管, 通过 C-SLR 通入吹扫气去除溶剂。Tenax-TA 吸附管放入热脱附仪自动进样盘, 用自动热脱附仪-气相色谱仪-质谱仪进行 TD-GC-MS 分析。

色谱条件: 石英毛细管柱 TG-5SILMS (5% 苯甲基硅氧烷: 0.25 mm \times 30 m, 0.25 μm); 载气为氦气, 柱流量为 1.0 mL/min; 热脱附条件: 传输线温度 205 °C; 预解析 1 min; 一级解析 200 °C, 8 min; 二级解析预吹扫 1 min, 低温 -10 °C, 高温 230 °C, 5 min。色谱柱初始温度 30 °C, 保持 3 min, 以 5 °C/min 升温速率升至 210 °C; 不分流。

质谱条件: EI 电离源, 电离电压 70 eV, 离子源温度 300 °C; 质谱范围 20-450 amu。通过 NIST17 数据库比较鉴定挥发性物质。对照组检测到的色谱峰将在处理组获得的峰中扣除。

表 1 供试对照品

Table 1 Reference substances in this study

对照品序号 Serial number of reference substances	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	CAS 号 CAS number	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	特征质量离子 Characteristic mass ion
1	6.34	乙酸丁酯 Butyl acetate	123-86-4	C ₈ H ₁₆ O ₂	116	43
2	7.54	(E)-2-己烯醛 Trans-2-hexenal	6728-26-3	C ₆ H ₁₀ O	98	41
3	8.47	2-甲基丁基乙酸酯 2-Methylbutyl acetate	624-41-9	C ₇ H ₁₄ O ₂	130	43
4	8.78	庚酮 2-Heptanone	110-43-0	C ₇ H ₁₄ O	114	43
5	9.25	庚醇 2-Heptanol	543-49-7	C ₇ H ₁₆ O	116	45
6	10.22	(1R)-(+)- α -蒎烯 (1R)-(+)- α -Pinene	80-56-8	C ₁₀ H ₁₆	136	93
7	11.17	苯甲醛 Benzaldehyde	100-52-7	C ₇ H ₆ O	106	77
8	11.95	1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	3391-86-4	C ₈ H ₁₆ O	128	57
9	12.10	3-辛酮 3-Octanone	106-68-3	C ₈ H ₁₆ O	128	43
10	12.79	乙酸顺式-3-己烯酯 (Z)-3-Hexen-1-ol acetate	3681-71-8	C ₈ H ₁₄ O ₂	142	43
11	13.05	乙酸己酯 Acetic acid hexyl ester	142-92-7	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	43
12	13.54	D-柠檬烯 D-Limonene	5989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	136	68
13	15.43	萜品油烯 Terpinolene	586-62-9	C ₁₀ H ₁₆	136	93
14	15.45	3-壬酮 3-Nonanone	925-78-0	C ₉ H ₁₈ O	142	43
15	15.93	芳樟醇 Linalool	78-70-6	C ₁₀ H ₁₈ O	154	71
16	16.20	1-辛烯-3-醇乙酸酯 1-Octen-3-yl-acetate	2442-10-6	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	43
17	19.62	β -环柠檬醛 β -Cyclocitral	432-25-7	C ₁₀ H ₁₆ O	152	41
18	21.82	2-十一酮 2-Undecanone	112-12-9	C ₁₁ H ₂₂ O	170	58
19	25.31	α -柏木烯 α -Cedrene	469-61-4	C ₁₅ H ₂₄	204	119
20	25.40	β -石竹烯 β -Caryophyllene	87-44-5	C ₁₅ H ₂₄	204	93
21	25.52	β -柏木烯 β -Cedrene	546-28-1	C ₁₅ H ₂₄	204	161

1.5 专属性测定

在直径 6 cm 的玻璃平皿中加 PDA 培养基, 将其打开盖子放在另一套空的直径 9 cm 的玻璃平皿中, 备用。取无菌滤纸片置于 6 cm 玻璃平皿的 PDA 培养基上, 滴加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液 10 μL (0.05 μg) 于滤纸片上, 然后取一根老化好的 1 cm 长硅胶管置于 9 cm 玻璃平皿中, 用封口膜将 9 cm 玻璃平皿密封, 24 $^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h 后, 将硅胶管取出, 置于老化好的空石英样品管中, 进行 TD-GC-MS 分析, 每个处理 3 个重复。

1.6 菌株样品的重复性测定

选择木霉菌株 T552 进行方法的重复性测定。将待测菌株在 PDA 培养基中活化培养, 取直径 0.5 cm 菌丝块接种在 6 cm 玻璃平皿的 PDA 培养基上, 24 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 后, 打开盖子放在另一套

空的 9 cm 玻璃平皿中, 取一根老化好的 1 cm 长硅胶管置于 9 cm 玻璃平皿中, 用封口膜将 9 cm 玻璃平皿密封, 24 $^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h 后, 将硅胶管取出, 置于老化好的空石英样品管中, 进行 TD-GC-MS 分析。以不接种的空白 PDA 培养基为对照, 每个处理 3 个重复。

1.7 菌株样品 VOCs 的筛选

选择 6 株木霉 T746、T1730、T1807、T1954、T2366 和 T3273, 按 1.6 方法进行 VOCs 筛选。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

对照品溶液经 TD-GC-MS 分析, 以峰面积为纵坐标、溶液浓度为横坐标绘制标准曲线, 得线性回归方程, 结果见表 2。除了保留时间相近的第 13、14 号对照品(萘品油烯、3-壬酮)以外, 其它

表 2 对照品标准曲线

Table 2 Standard curves of reference substances

对照品序号 Serial number of reference substances	全扫描模式 SCAN mode		提取离子模式 Extract ion mode		
	线性回归方程 Linear equation	相关系数平方 Correlation coefficient (r^2)	提取离子 Extract ion	线性回归方程 Linear equation	相关系数平方 Correlation coefficient (r^2)
1	$y=186\ 739x-25\ 427$	0.998 7	43	$y=75\ 334x+19\ 818$	0.998 9
2	$y=125\ 986x-77\ 153$	0.997 7	69	$y=10\ 726x-608$	0.999 1
3	$y=223\ 092x-72\ 159$	0.998 0	43	$y=84\ 956x-7\ 506$	0.998 7
4	$y=215\ 377x-56\ 173$	0.998 2	58	$y=48\ 984x-418$	0.998 0
5	$y=212\ 907x-17\ 732$	0.998 4	45	$y=94\ 882x-30\ 474$	0.998 7
6	$y=265\ 422x-161\ 418$	0.998 0	93	$y=62\ 121x-8\ 304$	0.998 1
7	$y=190\ 445x+61\ 867$	0.999 0	77	$y=48\ 622x+41\ 188$	0.998 4
8	$y=169\ 616x-109\ 884$	0.998 2	57	$y=60\ 663x-16\ 625$	0.994 0
9	$y=182\ 780x+21\ 959$	0.999 1	43	$y=42\ 247x+277$	0.997 3
10	$y=215\ 679x-145\ 374$	0.998 3	43	$y=65\ 277x-13\ 074$	0.995 6
11	$y=227\ 007x-82\ 097$	0.999 1	43	$y=75\ 149x-13\ 668$	0.995 4
12	$y=298\ 598x-170$	0.998 5	68	$y=43\ 504x+5\ 540$	0.997 1
13	$y=447\ 562x+15\ 149$	0.988 9	93	$y=32\ 716x-9\ 291$	0.991 0
14	$y=447\ 562x+15\ 149$	0.988 9	57	$y=44\ 533x-10\ 775$	0.991 0
15	$y=265\ 430x-276\ 807$	0.998 0	71	$y=34\ 581x-13\ 006$	0.994 9
16	$y=268\ 300x-89\ 438$	0.995 3	43	$y=81\ 608x-14\ 557$	0.995 6
17	$y=285\ 337x-21\ 247$	0.998 8	41	$y=13\ 670x-2\ 418$	0.998 0
18	$y=288\ 741x-284\ 916$	0.996 7	58	$y=66\ 575x-17\ 478$	0.985 0
19	$y=374\ 453x-67\ 085$	0.998 4	119	$y=63\ 851x-5\ 393$	0.997 5
20	$y=252\ 703x-41\ 252$	0.998 4	93	$y=16\ 425x-3\ 284$	0.994 9
21	$y=336\ 268x+9\ 125$	0.998 5	161	$y=29\ 414x-6\ 498$	0.991 7

对照品分离良好。进一步通过特征离子, 以提取离子模式鉴定萜品油烯和 3-壬酮。TD-GC-MS 分析结果表明, 全扫描条件下供试的 VOCs 在 1.0–10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好; 提取离子条件下供试的 VOCs 在 0.1–10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关

系良好。

2.2 专属性

用硅胶管吸附滴加于 PDA 培养基上滤纸片的对照品, TD-GC-MS 分析表明, 对照品分离良好(图 1)。由此可见, PDA 培养基皿中的供试

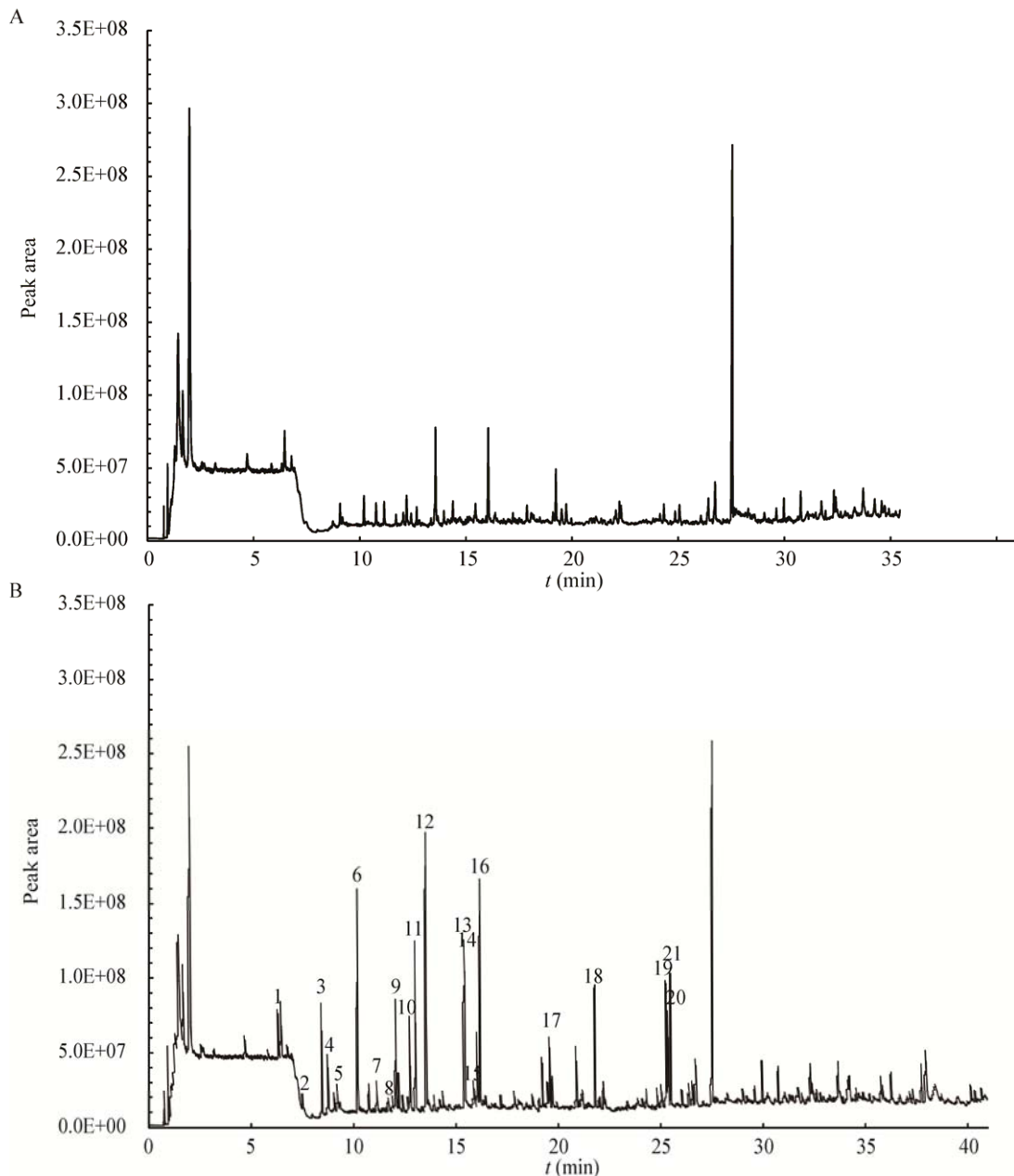


图 1 硅胶管吸附萃取的热脱附-气相色谱-质谱测定 PDA 皿中挥发性有机化合物的总离子流图

Figure 1 The total ion chromatography of VOCs in PDA petri dish determined by thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry analysis based on silicone tube sorptive extraction

注: A: PDA 培养基对照; B: PDA 培养基滴加对照品溶液. 色谱峰旁标注数字 1–21 表示对照品序号.

Note: A: PDA control; B: The reference substances dropped into the PDA medium. The numbers 1–21 beside the chromatographic peaks indicates the serial number of reference substances.

VOCs 可以通过硅胶管吸附采样, PDA 培养基平皿中的其它物质不干扰 VOCs 的测定。因此该方法专属性良好, 可用于微生物 PDA 培养过程中产生的 VOCs 测定。

2.3 菌株样品的重复性测定

木霉菌 T552 在 PDA 培养基中培养, 产生的 VOCs 通过硅胶管吸附进行 TD-GC-MS 分析, 通过 NIST17 数据库比较鉴定出 T552 产生的 5 种 VOCs, 并对具有重要生物活性的 VOCs 组分 6-PP 通过标样进行了确认。重复性测定发现 5 种 VOCs 的相对标准偏差均小于 10% (表 3), 可见基于 STSE 的 TD-GC-MS 分析测定真菌培养物 VOCs 的重复性良好。

2.4 菌株样品 VOCs 的筛选

在上述试验条件下, 供试木霉菌在 PDA 培养基中培养, 产生的 VOCs 通过硅胶管吸附进行 TD-GC-MS 分析, 通过 NIST17 数据库比较鉴定出这 6 株木霉产生包括酸、醇、酯、烯等共 37 种 VOCs (表 4), 其中对 1-辛烯-3-醇、3-辛酮、 β -石竹烯、 β -柏木烯、苯乙醇(Phenylethyl alcohol)等 5 种重要 VOCs 组分通过标样进行了确认。从表 4 可见, T1954 产生苯乙醇, T2366 产生相对含量最高的 1-辛烯-3-醇和 3-辛酮, T3273 产生 β -石竹烯, T1807 产生 β -柏木烯。

3 讨论与结论

GC-MS 联用分析因高分辨率、高灵敏度已被广泛应用于复杂组分(尤其是 VOCs)的分离鉴定。微生物培养物 VOCs 的分析测定需要高通量的 VOCs 样品制备技术与 GC-MS 分析仪器配合才可以在短时间内处理更多样品, 实现高通量分析。SPME 是一种广泛应用于 VOCs 的被动顶空采样技术, 这种技术采用安装在 SPME 针头的具有不同涂层的萃取头萃取 VOCs 进行采样。但是用 SPME 进行微生物培养物的 VOCs 样品制备存在以下缺点: (1) 由于 SPME 萃取装置价格较贵, 而采用 SPME

萃取装置完成一个样品 VOCs 的萃取约耗时 1 h, 因此采用 SPME 不能同时对大量培养物进行 VOCs 的样品制备; (2) 由于 SPME 萃取头表面涂覆的吸附材料量少, 因此萃取头吸附容量较小, 且重复使用后吸附萃取 VOCs 的效果下降。与 SPME 相比, 用 STSE 对培养物进行 VOCs 样品制备可以克服以上缺点: (1) 由于硅胶管价格低廉, 采用 STSE 只需将切割成 1 cm 长的硅胶管分别置于培养基平皿内即可实现同时对大量培养物进行 VOCs 的样品制备, 因此便于大量培养物的高通量分析; (2) 硅胶管吸附容量大, 即使样品中 VOCs 浓度较高(即 TD-GC-MS 检测获得的色谱峰较高较宽), 在培养基平皿中简单增加硅胶管吸附即可, 避免了 SPME 萃取头吸附容量小的问题, 而且硅胶管一次性使用, 不存在重复使用导致 VOCs 吸附萃取效果下降的问题。本试验选择了 21 种包括酯、酮、醇、醛、烯的代表性 VOCs 化合物作为对照品, 1 根 1 cm 长的硅胶管吸附 0.05 μ g 对照品/平皿, 测定 VOCs 的分离度良好, 可见培养基平皿中硅胶管吸附 VOCs 的 TD-GC-MS 检测方法灵敏度高、专属性强, 能较准确地测定培养基平皿中的不同种类的 VOCs。

木霉可以产生多样化的 VOCs 组分, 包括饱和烃、环己烷、环戊烷、脂肪酸、醇类、酯类、含硫化合物以及简单的吡喃和苯衍生物等, 如吡喃酮衍生物就有 10 多种^[2]。Siddiquee 等用不同极性溶剂从木霉菌 FA1132 液体培养物中提取制备样品, 用不同极性毛细管柱进行 GC-MS 分析, 发现 278 个可挥发性组分^[17], 但溶剂法提取不适合对大量样品进行快速检测分析, 也不能用于微生物培养过程的动态分析。用本试验建立的硅胶管吸附培养基平皿中 VOCs 的 TD-GC-MS 检测方法对木霉产生的 VOCs 进行了测定, 成功检测出两大类 VOCs 组分, 包括重要的挥发性芳香成分, 如具有蘑菇风味的 3-辛醇、3-辛酮、1-辛烯-3-醇、2-辛烯-1-醇、

表 3 基于硅胶管吸附萃取的热脱附-气相色谱-质谱测定木霉菌 T552 的挥发性有机化合物的重复性
 Table 3 Determination repeatability of volatile organic compounds of *Trichoderma* strain T552 by thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry analysis based on silicone tube sorptive extraction

保留时间 Retention time (min)	提取离子 Extraction ion	峰面积 Peak area*			平均 Average	相对标准偏差 Relative standard deviation (RSD, %)	可能的化合物 Possible compound	CAS 号 CAS number	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight
		I	II	III						
2.26	43	280 829	240 416	254 313	258 519	7.94	2-甲基-1-丙醇	78-83-1	C ₄ H ₁₀ O	74
14.86	43	13 920	15 493	13 697	14 370	6.81	2-Methyl-1-propanol 6-甲基-3,4-二氢-2h-吡喃	16015-11-5	C ₆ H ₁₀ O	98
26.37	95	8 260 435	7 101 053	7 960 435	7 773 974	7.74	6-Methyl-3,4-dihydro-2h-pyran 6-戊基-2h-吡喃-2-酮	27593-23-3	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166
27.22	119	126 974	119 273	111 505	119 251	6.49	6-Pentyl-2h-pyran-2-one Trans-sesquisabinene hydrate	145512-84-1	C ₁₅ H ₂₆ O	222
31.30	43	246 844	237 866	231 348	238 686	3.26	5,6,6-三甲基-十一-3,4-二烯-2,10-二酮 5,6,6-Trimethyl-undeca-3,4-diene-2,10-dione	90165-10-9	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	222

注: *: 扣除 PDA 对照中的相应化合物, 并去除信噪比小于 3 的小峰。

Note: *: The corresponding compounds existed in PDA controls were deleted. Minor peaks with signal-to-noise ratio < 3 were cutoff.

表 4 基于硅胶管吸附萃取的热脱附-气相色谱-质谱测定供试木霉菌株的挥发性有机化合物
 Table 4 Volatile organic compounds of the tested *Trichoderma* strains determined by thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry analysis based on silicone tube sorptive extraction

保留时间 Retention time (min)	提取离子 Extraction ion	峰面积 Peak area*							可能的化合物 Possible compound	CAS 号 CAS number	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight
		T746	T1730	T1807	T1954	T2366	T3273	T3273				
2.26	43	348 839	ND	1 066 182	644 360	717 035	ND	2-甲基-1-丙醇	78-83-1	C ₄ H ₁₀ O	74	
3.01	45	750 722	170 200	318 179	273 716	148 932	ND	2-Methyl-1-propanol 3-甲基-2-丁醇	598-75-4	C ₅ H ₁₂ O	88	
3.31	71	63 384	1 216 193	39 783	ND	ND	ND	3-Methyl-2-butanol 3-戊烯-2-醇	1569-50-2	C ₅ H ₁₀ O	86	
4.13	55	ND	ND	ND	1 583 745	ND	ND	3-Penten-2-ol 3-甲基-1-丁醇	123-51-3	C ₅ H ₁₂ O	88	
4.23	41	ND	ND	ND	573 046	ND	ND	3-Methyl-1-butanol 2-甲基-1-丁醇	137-32-6	C ₅ H ₁₂ O	88	
5.22	43	41 010	ND	ND	ND	349 839	ND	2-Methyl-1-butanol 乙酰丙酮	123-54-6	C ₅ H ₈ O ₂	100	
7.44	56	ND	ND	ND	147 193	ND	ND	Acetylacetone 甲基-1-戊醇	589-35-5	C ₆ H ₁₄ O	102	
10.40	55	ND	ND	104 062	60 913	261 147	ND	3-Methyl-1-pentanol 3-庚烯-2-酮	69668-88-8	C ₇ H ₁₂ O	112	
11.36	43	ND	ND	ND	ND	957 727	ND	(Z)-3-Hepten-2-one 5-甲基-2-庚酮	18217-12-4	C ₈ H ₁₆ O	128	
11.54	74	129 716	ND	81 489	38 219	227 791	ND	5-Methyl-2-heptanone 庚酸甲酯	106-73-0	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	
12.01	57	11 280 092	ND	4 623 258	13 600 194	32 582 202	ND	Heptanoic acid, methyl ester 1-辛烯-3-醇	3391-86-4	C ₈ H ₁₆ O	128	
12.08	43	1 868 007	388 053	541 616	5 403 438	6 751 624	ND	1-Octen-3-ol 3-辛酮	106-68-3	C ₈ H ₁₆ O	128	
12.60	59	ND	ND	ND	3 696 384	13 261 744	ND	3-Octanone 3-辛醇	589-98-0	C ₈ H ₁₈ O	130	
13.91	55	ND	ND	ND	ND	634 515	ND	3-Octanol 辛烯-2-酮	1669-44-9	C ₈ H ₁₄ O	126	
14.90	57	7 728 972	798 126	1 269 149	18 051 525	ND	ND	3-Octen-2-one 反式-2-辛烯-1-醇	18409-17-1	C ₈ H ₁₆ O	128	
14.86	43	3 340 686	ND	3 405 029	1 744 657	2 049 391	ND	(E)-2-Octen-1-ol 6-甲基-3,4-二氢-2H-吡喃	16015-11-5	C ₆ H ₁₀ O	98	
16.30	91	ND	ND	ND	5 837 448	ND	ND	6-Methyl-3,4-dihydro-2H-pyran 苯乙醇	60-12-8	C ₈ H ₁₀ O	122	

(待续)

18.85	95	ND	ND	ND	ND	1 671 311	ND	壬-3,5-二烯-2-酮	80387-31-1	C ₉ H ₁₄ O	138
18.96	81	785 838	ND	317 111	228 641	ND	ND	Nona-3,5-dien-2-one			
19.97	93	183 494	ND	316 485	36 812	401 915	ND	Unknown			
23.57	123	ND	ND	ND	401 943	ND	17 193	Unknown			
25.39	161	ND	ND	391 853	ND	ND	ND	Unknown			
25.42	93	ND	ND	ND	ND	ND	2 962 495	β-石竹烯	87-44-5	C ₁₅ H ₂₄	204
25.56	161	ND	ND	701 769	ND	ND	ND	Caryophyllene	546-28-1	C ₁₅ H ₂₄	204
26.21	105	ND	ND	ND	ND	ND	2 331 045	β-柏木烯	17699-14-8	C ₁₅ H ₂₄	204
26.55	161	ND	ND	ND	ND	ND	3 966 951	(-)-α-Cubebene	157477-72-0	C ₁₅ H ₂₄	204
27.30	105	ND	ND	ND	ND	ND	7 128 019	顺-衣兰油-4(15),5-二烯	17066-67-0	C ₁₅ H ₂₄	204
27.36	161	ND	ND	ND	ND	ND	4 596 488	cis-Muurola-4(15),5-diene	30021-74-0	C ₁₅ H ₂₄	204
27.50	93	ND	ND	ND	ND	ND	8 079 038	β-葎烯	22567-17-5	C ₁₅ H ₂₄	204
27.90	161	1 053 213	1 440 534	ND	1 030 895	487 833	1 762 178	(+)-b-Selinene	39029-41-9	C ₁₅ H ₂₄	204
28.16	161	ND	ND	ND	ND	ND	99 137 520	γ-衣兰油烯	483-76-1	C ₁₅ H ₂₄	204
28.42	119	ND	ND	ND	ND	ND	1 914 631	7-Murolene	16728-99-7	C ₁₅ H ₂₄	204
31.15	95	ND	ND	ND	ND	ND	15 357 637	(+)-g-古芸烯			
31.44	95	ND	ND	ND	ND	ND	17 436 324	(+)-g-Gujunene			
33.83	73	ND	1 950 636	2 295 735	ND	510 207	ND	(-)-g-Cadinene			
37.28	74	ND	ND	1 384 858	ND	ND	ND	d-葎澄茄烯			
38.17	73	ND	5 945 795	7 517 911	ND	8 105	ND	d-Cadinene			
								1,2,3,4,4a,7-六氢-1,6-二甲基-4-(1-甲基乙基)-萘			
								1,2,3,4,4a,7-Hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-naphthalene			
								α-杜松醇 α-Cadinol	481-34-5	C ₁₅ H ₂₆ O	222
								(1s,4s,4ar,8as)-1,2,3,4,4a,7,8,8a-八氢-1,6-二甲基-4-(1-甲基乙基)-1-萘酚	19912-62-0	C ₁₅ H ₂₆ O	222
								(1s,4s,4ar,8as)-1,2,3,4,4a,7,8,8a-Octahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-1-naphthalenol			
								十四酸 Tetradecanoic acid	544-63-8	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228
								十六酸甲酯	112-39-0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
								Hexadecanoic acid, methyl ester			
								十六酸	1957-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256
								n-Hexadecanoic acid			

注: *: 扣除 PDA 对照中的相应化合物, 并去除信噪比小于 3 的小峰; ND: 未检出。

Note: *: The corresponding compounds existed in PDA controls were deleted. Minor peaks with signal-to-noise ratio < 3 were cutoff; ND: Not detected.

3-辛烯-2-酮等八碳挥发性物质, 具有特有的杏仁气味、玫瑰花香、芸香香气的苯甲醛、苯乙醇、2-十一烷酮, 以及具有重要生物活性的 6-戊基-2H-吡喃-2-酮、 β -石竹烯等 VOCs 成分。本文建立的基于 STSE 的 TD-GC-MS 分析测定真菌培养物 VOCs 的高通量分析技术简单可靠, 可用于真菌 VOCs 的分析测定, 将为 VOCs 产生菌筛选和 VOCs 影响因子研究、VOCs 产生菌与其它微生物、动植物互作提供一种高通量的分析手段。

REFERENCES

- [1] Korpi A, Järnberg J, Pasanen AL. Microbial volatile organic compounds[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2009, 39(2): 139-193
- [2] Zeilinger S, Schuhmacher R. Volatile organic metabolites of *Trichoderma* spp.: biosynthesis, biology and analytics[A]//Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, et al. *Trichoderma: Biology and Application*[M]. Wallingford: CABI, 2013: 110-127
- [3] Maga JA. Mushroom flavor[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1981, 29(1): 1-4
- [4] Dennis C, Webster J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics[J]. *Transactions of the British Mycological Society*, 1971, 57(1): 41-48, IN4
- [5] Kottb M, Gigolashvili T, Großkinsky DK, et al. *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 995
- [6] Rowan DD. Volatile metabolites[J]. *Metabolites*, 2011, 1(1): 41-63
- [7] Rubiolo P, Sgorbini B, Liberto E, et al. Analysis of the plant volatile fraction[A]//Herrmann A. *The Chemistry and Biology of Volatiles*[M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2010: 49-93
- [8] Zhang WW, Guo ZY, Zhao XD, et al. Effect and identification of volatile compounds from *Trichoderma* against *Fusarium oxysporum*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(4): 704-715 (in Chinese)
张雯雯, 国振宇, 赵晓迪, 等. 木霉菌株挥发性物质拮抗尖孢镰刀菌的效果及其鉴定[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(4): 704-715
- [9] Mao LJ, Chen JJ, Xia CY, et al. Identification and characterization of new *Muscodor* endophytes from gramineous plants in Xishuangbanna, China[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8(4): e00666
- [10] Song YL, Hu P, Zhao SY, et al. Distinction of fermented *Cordyceps* products from different strains and analysis of their volatile components by HS-SPME/GC-MS combined with chemometrics analysis[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2018, 38(1): 67-78 (in Chinese)
宋玉玲, 胡坪, 赵诗怡, 等. HS-SPME/GC-MS 结合化学计量学鉴别不同菌种发酵虫草产品及挥发性成分分析[J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(1): 67-78
- [11] Zhang ZC, Zhang Y, Li JM, et al. The aroma components analysis of two *Ceratocystis* strains[J]. *Natural Product Research and Development*, 2018, 30(11): 1939-1942, 1956 (in Chinese)
张志超, 张曷, 李建梅, 等. 两株长喙壳属真菌挥发性香气成分分析[J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(11): 1939-1942, 1956
- [12] Xu MK, Yin JW, Tan SY, et al. Isolation of endophytic fungi of *Dendrobium officinale* and analysis of their volatile constituent[J]. *Biotic Resources*, 2017, 39(1): 53-57 (in Chinese)
徐梦珂, 印嘉闻, 谈思源, 等. 铁皮石斛内生真菌的分离及其挥发性成分分析[J]. *生物资源*, 2017, 39(1): 53-57
- [13] Chen YP, Yang Y, Shi T, et al. Identification and fungistasis of volatile compounds produced by endophytic fungi HND5[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(4): 689-694 (in Chinese)
陈奕鹏, 杨扬, 时涛, 等. 内生真菌 HND5 挥发性物质组分分析及其抑菌作用测定[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(4): 689-694
- [14] Dai HY, Liu MZ, Lv ZC. Identification of paclitaxel-producing wild-type entophyte fungus J11 and its mutant strain J11-8 by HS-SPME-GC-MS[J]. *Journal of Huizhou University*, 2016, 36(6): 45-49 (in Chinese)
戴黄益, 刘明志, 吕镇城. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法鉴别产紫杉醇的内生菌株 J11 和诱变菌株 J11-8[J]. *惠州学院学报: 自然科学版*, 2016, 36(6): 45-49
- [15] van Pinxteren M, Paschke A, Popp P. Silicone rod and silicone tube sorptive extraction[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(16): 2589-2598
- [16] Kallenbach M, Oh Y, Eilers EJ, et al. A robust, simple, high-throughput technique for time-resolved plant volatile analysis in field experiments[J]. *The Plant Journal*, 2014, 78(6): 1060-1072
- [17] Siddiquee S, Cheong BE, Taslima K, et al. Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns[J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2012, 50(4): 358-367