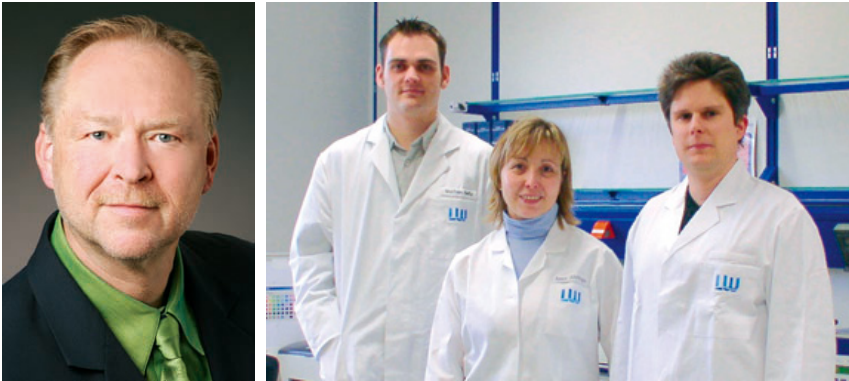


毒性物质的费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 生物自发光色谱检测

▲ Dr. Walter Weber*

▲ 从左至右: Wolfram Seitz, Anna Aichinger, Roger Albert

关键词：高效薄层色谱-生物自发光联用技术，饮用水水质监测，有害物质，活性分析系统，样品风险评估

坐落于德国兰格瑙市的Landeswasserversorgung自来水公司，每天将所生产的饮用水长距离输送给各地300多万用户。除了化学、物理化学和微生物检测外，运转和研究实验室主任韦伯博士正在开展着一系列水质分析课题的研究工作。

由于采用HPLC/MS和GC/MS方法对饮用水中的某些农药残留如草甘膦、氨甲基磷酸（草甘膦代谢产物）和杀草强等的检测非常具有局限性，因此实验室主要采用CAMAG薄层色谱全自动梯度展开系统（AMD）进行该监控任务。在色谱展开后的HPTLC薄层板上引入毒性测试环节使得更有效的评价水中的生物活性成分成为可能。本文对薄层色谱法联用费氏弧菌（*Vibrio fischeri*）生物自发光技术检测毒素的方法进行了报道。

介绍

成立于1912年的Landeswasserversorgung公司作为德国历史最悠久的长距离自来水供应商，充分了解水源环境中可能存在的有毒物质和其它污染物（下称有害物质）并将它们排除在饮用水之外对其而言非常重要。在检测有害物质方面，除了常规的化学、物理化学和微生物方法外，最近新的被称作“生物测试系统”的活性检测技术被引进，譬如采用发光细菌进行有毒物质的生物自发光检测，以及胆碱酯酶抑制剂的活性检测等。

传统方法仅能对成分的化学性质进行分析，而生物测试则可以直接测定成分的活性强度。可测定的活性参数通常包括急性毒性（如导致消亡，发光抑制），慢性毒性（如生长抑制）和遗传毒性（如致突变）。生物自发光检测可测定有毒物质的急性毒性。

生物测试系统的另一个优势在于对于未知活性物质的检测。对于已知的3万余种相关化学物质及其降解产物而言，采用物理化学方法每次进行某一类成分的检测显然力不从心，因为检出的物质只能是该分析方法有针对性所要检测的，并且是具有参照物质的。

而生物测试系统的检测能力可以在一定范围内达到所有成分全部得到检测，因此对于复杂组分样品的风险评估而言，能够跨越即便采用种类繁多的化学分析也不能够充分覆盖的可检测范围。基于费氏弧菌的生物自发光显影检测是在废水分析中常用的试管法，其所测定的总活度是样品中各个活性组分活度之合，因此同时包括了成分间的拮抗作用和协同作用。

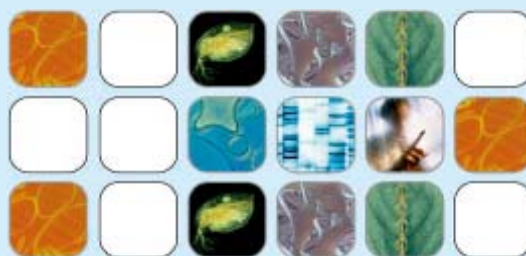
在AMD梯度展开后的HPTLC薄层板上进行毒性物质的生物自发光检测，这一技术有机结合了色谱分离的优点以及活性（毒性）检测的信息。与传统的毒性测试不同，对样品混合物的分离使得单独评价其中每一个组分的活性成分可能。此外通过对于化合物Rf值的判断以及在生物自发光显影后继而对薄层板采用传统衍生化检测等方法，使得化合物的大致化学结构可得到初步推定。



Bioluminex™是一种新型的分析试剂盒，可用于各类复杂样品如废水，食品和饮料、天然产物等所含的生物活性成分或毒性成分的筛选检测。这种独一无二的高效技术由德国拜耳药厂所开发，其结合了薄层色谱（TLC）和海洋细菌费氏弧菌（*Vibrio fischeri*）的天然生物发光（冷光）特性。

什么是Bioluminex™?

TLC用来对多组分混合物体系进行初步的分离，使其形成互相分离的成分斑点或条带。TLC薄层板然后以发光细菌 *Vibrio fischeri* 的溶液加以涂布，反应数秒钟即可。此时毒性成分的斑点就在冷光的亮背景下以暗斑的形式很容易地被分辨出来，这是由于毒素或其它抑制试剂减弱了其所在区域细菌的代谢活性。快速的反应时间避免了其它TLC生物分析技术经常出现的由于需要长时间等待细菌繁育后再检测而造成的斑点扩散现象。



sales@chromadex.com

www.chromadex.com

供试品制备

将1 L的水样品以固相萃取填料Isolute ENV+进行萃取。被吸附成分用甲醇洗脱，定容至200 μ L。

薄层板

HPTLC 硅胶60 F254 高效预制薄层板 (Merck), 20 x 10 cm, 固定相厚度 0,1 mm, 以异丙醇预洗 (浸渍24h) 后在CAMAG TLC板加热器以100 $^{\circ}$ C于氮气流下加热活化30min。

点样

采用CAMAG ATS4仪器进行条带状点样，每块板12个样品，条带宽6 mm，点样体积80 μ L，轨道间距12 mm。原点距底边8 mm，距两侧最少20 mm。

色谱条件

采用CAMAG AMD2仪器，乙腈-甲酸-二氯甲烷25步梯度展开，最大展距80 mm。目前样品基质中的腐植酸对分析存在干扰。这类在常规紫外/可见光检测下不可见的成分可使其它成分展开时拖尾并抑制细菌荧光。故对展开梯度和样品制备环节进行优化的研究正在进行。

生物发光检测

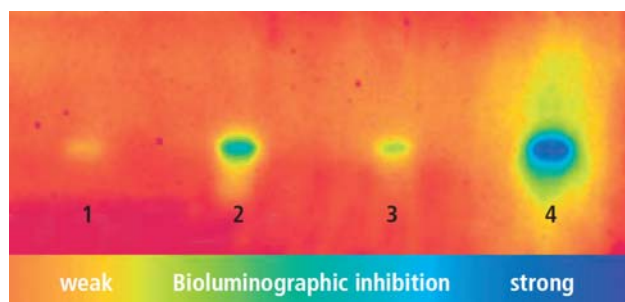
将展开后的HPTLC薄层板使用CAMAG浸渍设备进入发光细菌 (*Vibrio fischeri*) 的混悬液中1 s。

成像和评价

采用CCD相机成像，曝光时间40 s，2x2像素组合，采用伪色彩对图谱进行显示。

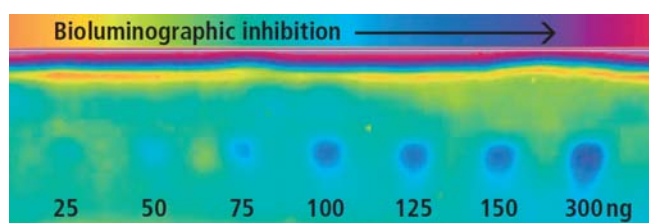
结果和讨论

一些药物成分在地表水中被检测出显示对生物自发光的不同抑制作用，含ng级水平。此外一些化学衍生物，如例子中的杀虫剂，也被该系统所检测到。

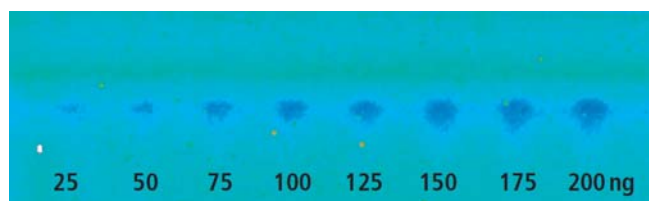


▲ 4种不同药物成分在硅胶60 F254 HPTLC薄层板上的生物发光检测轨道1-4显示4种成分的荧光抑制斑点，每个600ng，未经色谱展开

对地表水提取物的分析清楚地显示生物发光抑制现象的存在。为了优化采用AMD对提取物中成分的分离效果，有必要对样品制备方法进行优化以清除前述的基质的干扰。这可以通过采用分子排阻色谱将腐植酸清除掉而实现。结果显示经HPTLC分离后的混合物通过基于发光细菌的生物活性分析对于浓度低至ng级水平的有害物质的检测是可行的。



▲ 1种相对于发光细菌的活性成分在硅胶60 F254 HPTLC薄层板上的图谱，25-300ng每斑点，未经色谱展开



▲ 1种相对于发光细菌的活性成分在硅胶60 F254 HPTLC薄层板上的图谱，25-200ng每斑点

欲获取进一步的信息请联系作者：

*Dr. Walter Weber, Zweckverband Landeswasserversorgung, Betriebs- und Forschungslaboratorium, Am Spitzigen Berg 1, D-89129 Langenau, Germany. E-mail: weber.w@lw-online.de