薄层色谱法用于脂质分析：检测、染色与衍生化 Lipidology

作者：writer 来源：科学网

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/42951.html

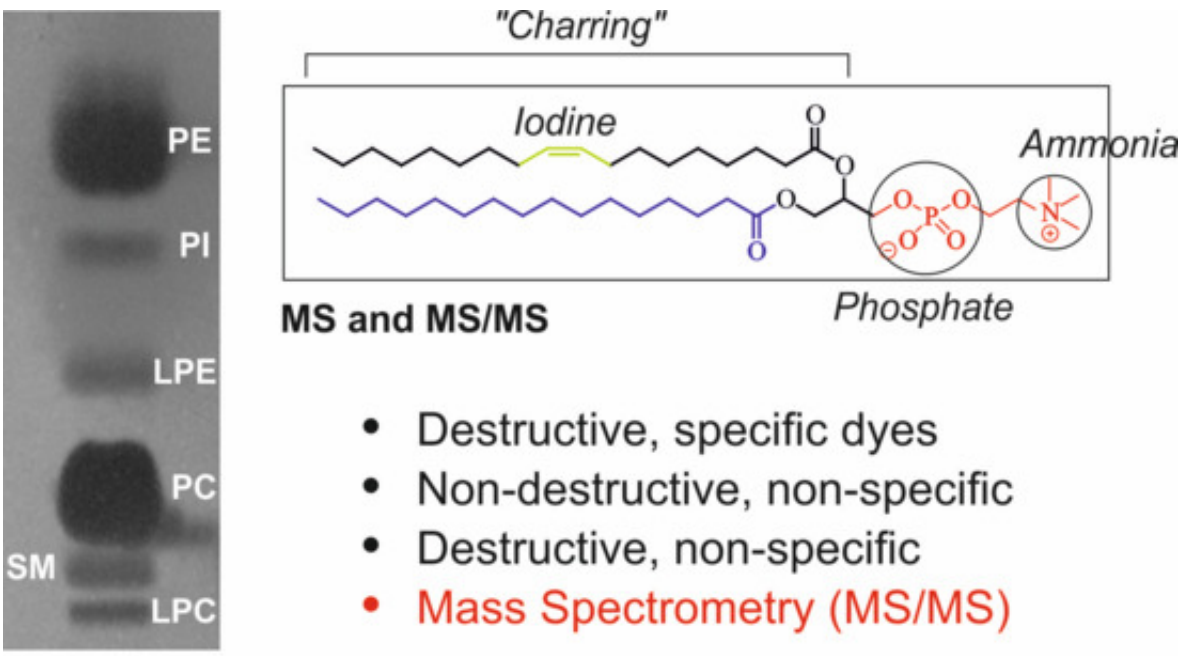
本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

薄层色谱法用于脂质分析：检测、染色与衍生化 Lipidology。论文标题：Lipid Analysis by Thin-Layer Chromatography—Detection, Staining and Derivatization

论文链接：https://www.mdpi.com/2813-7086/3/1/3

期刊名： Lipidology

期刊主页：https://www.mdpi.com/journal/lipidology



一、脂质提取与薄层色谱分离基础

尽管高效液相色谱（HPLC）、气相色谱（GC）分离性能优异，但薄层色谱（TLC）及高效薄层色谱（HPTLC）在天然产物与脂质分析领域仍得到广泛应用。TLC 具备可平行分析多个样品、设备成本低、维护简单、无记忆效应、溶剂消耗少、色谱结果可直接可视化等多项优势。工业制备的薄层板保障了分离效果，脂质分析多采用未改性硅胶的正相体系。除分析用途外，制备型

TLC 可刮取斑点，实现少量脂质的分离收集。

开展 TLC 脂质分析，首先需要从体液或组织样本中完成脂质提取。虽然氯仿具有毒性，但 Folch 法以及 Bligh?Dyer
氯仿?甲醇提取法仍是主流手段。对于糖脂、磷酸肌醇等极性更强的脂质，需要调整离子强度与 pH 以提高提取效率。不同脂质在薄层板上的迁移，取决于脂质与硅胶固定相、展开溶剂体系二者的相互作用，Rf 值可以反映脂质与固定相的结合强弱。

二、薄层板上脂质的显色检测

天然脂质本身不具备生色基团，展开后的薄层板必须经过染色才能够观察不同脂质组分。目前很多染色试剂都有商品化成品，无需在实验室自行配制。大部分有机染色剂极性较弱，容易富集在薄层板的脂质斑点上，这类染料和脂质的结合大多不具备选择性。加入弱酸或盐可以提高水相极性，降低染料在水相中的溶解度，让更多染料进入脂质相，增强斑点染色。文章按照是否破坏样品、是否具备特异性，把染色方法分为三类：破坏性　特异性染料、非破坏性　非特异性染料、破坏性　非特异性染料。

共价修饰型染料（通常为破坏性、特异性染料）会与分析物的特定官能团发生共价反应，生成有色产物。部分试剂针对羰基（如醛基）官能团进行衍生化，从而检测氧化脂质，例如 2,4-二硝基苯肼；1-芘丁酸酰肼（PBH）也适用于检测截短氧化醛脂质，灵敏度极好。由于标准脂质不含反应性羰基，检测未氧化脂质需采用其他染色策略。茚三酮可用于带有伯氨基的脂质显色，如 PE 和 PS；氨基黑 10B 对 DAG、TAG 和 PS 灵敏度较高（约 15
ng），但对游离脂肪酸和佛波酯的检出下限分别约为 100 ng 和 500
ng；铈钼酸铵可用于脂质显色（约 130
ng），但显色程度受脂肪酸酰基不饱和程度显著影响，仅适用于半定量分析。

非破坏性（通常也为非特异性）染色不会共价改变脂质分子结构，部分染料后续可以被去除。碘蒸气法依靠升华碘与脂质发生非共价相互作用显色，但斑点信号强弱和双键数目相关：高度不饱和脂质信号更强，饱和脂质显色很弱；碘还会随时间挥发，即便抽真空也无法完全除去。硝酸银浸渍的薄层板可依据不饱和度对脂质实现分离。考马斯亮蓝原本用于蛋白染色，也可以用于脂质检出，并且反应后脂质分子量不会发生改变，因此可以对接质谱检测。还有多种荧光类染色手段可供选择，这些染料可通过改变溶剂极性或过短柱去除，其中樱草黄的灵敏度可达低纳摩尔范围，与罗丹明相当。

破坏性-非特异性染色最典型的是硫酸喷雾后高温炭化处理。脂质经脱水炭化显现黑色斑点，该过程化学反应复杂：硫酸中的硫从+VI被还原为+IV，一部分脂质碳被部分氧化为单质碳，另一部分则被完全氧化为二氧化碳。该处理会彻底损毁样品，并且只能使用玻璃背板薄层板，塑料背板会被强酸腐蚀。这类炭化手段检出限约为25 – 50
ng/脂质类别，但结果受脂肪酸酰基组成影响。除此之外，还有多种酸性显色试剂可供选用。

三、薄层色谱-质谱联用检测

质谱是薄层板光谱检测的重要手段，分为基于提取洗脱的电喷雾质谱以及原位解吸两类技术路线。

在提取洗脱-ESI-MS 分析模式中，需要借助非破坏性染色定位脂质斑点。氯仿不适合作为电喷雾

质谱的洗脱溶剂，不仅离子产率低，还可能产生二氯卡宾，损伤质谱毛细管与塑料组件。电喷雾质谱普遍存在离子抑制效应，这也是脂质分析通常需要预先分离的重要原因。借助CAMAG、Advion 等商用 TLC-MS 专用接口，可将斑点内脂质洗脱后送入质谱，该方法由Heinrich Luftmann 在二十年前开发，可兼容多种电离方式与不同类型的质量分析器。但实际工作中以电喷雾质谱（ESI　MS）最为常用，该方法适用范围广，仅对胆固醇酯等强非极性脂质的检测存在局限。

MALDI?MS、DESI?MS 属于原位解吸技术，无需将脂质从薄层板上洗脱，直接在板上完成电离检测。单个斑点的检测仅需数秒，可以避免发生脂质过氧化这类样品改变，同时拥有更高空间分辨率，能够分辨同一肉眼斑点内部的不同组分。迄今为止，几乎没有研究对光密度法、提取洗脱质谱和解吸质谱这三类手段进行对比。Kruger 等人利用 HPTLC?荧光检测、ESI?MS 以及 MALDI?MS 对比分析了大豆与向日葵卵磷脂，三种方法得到的数据总体相近，但 MALDI 质谱会出现轻微却显著的质量偏移；该现象源于将大薄层板裁切为小板带来的板面高低起伏，使用工业预制的 MS 级高纯薄层板即可改善这一问题。

四，总结

薄层色谱是脂质混合物组成分析的有力工具，但很难达到现代质谱脂质组学的精度与灵敏度。传统流程一般为薄层板分离染色，再通过光密度法完成定量。目前部分染料与脂质相互作用的确切机制尚不明确，染料选择需要权衡是否允许样品被破坏以及检测灵敏度：破坏性方法（如硫酸铜或磷钼酸染色并炭化）通常灵敏度略高，非破坏性检测（如樱草黄－紫外）则适用于后续分析。脂质大类可以参照标准品的Rf值进行判断，而脂肪酸链组成解析通常需要借助TLC-MS联用等更复杂的方法。此外，也存在先通过TLC确定脂质头部基团，再水解后使用GC测定脂肪酸的实验流程。

Schubarth, J.W.; Leopold, J.; Engel, K.M.; Schiller, J. Lipid Analysis by Thin-Layer Chromatography—Detection, Staining and Derivatization. Lipidology 2026, 3, 3. https://doi.org/10.3390/lipidology3010003

期刊介绍

主编：

Nicola Ferri, University of Padova, Italy

期刊致力于脂质研究。该刊连接化学、生物化学、生物技术、药理学、营养学、代谢学及临床科学等多个学科领域。我们的目标是为从基础脂质生物学到医学、营养学和生物技术应用研究的高质量成果提供一个交流平台。通过推动基础科学与实际应用相结合，我们致力于促进跨学科创新。

特别声明：本文转载仅仅是出于传播信息的需要，并不意味着代表本网站观点或证实其内容的真实性；如其他媒体、网站或个人从本网站转载使用，须保留本网站注明的“来源”，并自负版权等法律责任；作者如果不希望被转载或者联系转载稿费等事宜，请与我们接洽。
来源：Lipidology

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发