

陈亚东,薛金嫒,徐婷,等. 分离植物甘油酯的薄层层析色谱法的优化[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):235-238.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.065

分离植物甘油酯的薄层层析色谱法的优化

陈亚东¹,薛金嫒¹,徐婷¹,刘华²,雷洁³,甘毅¹

(1. 浙江农林大学农业与食品科学学院,浙江临安 311300;2. 浙江农林大学林业与生物技术学院,浙江临安 311300;

3. 南京农业大学农学院,江苏南京 210095)

摘要:甘油酯是植物体内重要的初生代谢产物,参与到细胞膜脂的形成,薄层层析色谱法是研究植物脂类代谢中分离甘油酯的常见方法。为了获得良好的脂类成分分离效果,相关文献多采用三氯甲烷:甲醇:水(65:25:4)的溶剂配比来作为双向 TLC 第一向的展开相。但在一些甘油酯含量较少的样本中,上述溶剂相无法获得良好的分离效果。本研究对上述溶剂系统进行优化,分别采用三氯甲烷:甲醇:氨水(65:35:5)和三氯甲烷:丙酮:甲醇:乙酸:水(50:20:10:10:5)作为展开相。结果表明,改进后的溶剂系统能够高效地分离植物组织样本中的糖脂和磷脂,在硅胶板上形成清晰的、不连续的脂类斑块。上述方法对有效分离植物样本中的脂类组分具有一定的实用价值。

关键词:薄层色谱分析;甘油酯;糖脂;磷脂;分离

中图分类号: O657.7⁺1;O658.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2018)24-0235-04

脂类(lipids)是生物细胞膜的主要组成成分,在植物光合作用、细胞信号传导、逆境胁迫等生命活动中扮演着极其重要的角色^[1-5]。从极性上分,脂类可分为极性脂和中性脂,前者包括单半乳糖二酰甘油(mono galactosyl diacyl glycerol,简称 MGDG)、双半乳糖二酰甘油(di galactosyl diacyl glycerol,简称 DGDG)、硫脂-硫代异鼠李糖二酰甘油(sulfo quinovosyl diacyl glycerol,简称 SQDG)、磷脂酰甘油(phosphatidyl glycerol,简称 PG)、磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline,简称 PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine,简称 PE)、磷脂酰肌醇(phosphatidy linositol,简称 PI)、磷脂酸(phosphatidic acid,简称 PA)等,后者包括三酰基甘油(triacyl glycerol,简称 TAG)、二酰基甘油(diacylglycerol,简称 DAG)等。

长期以来,将各种甘油酯进行有效分离,是深入进行植物脂类代谢研究的前提条件。到目前为止,分离植物甘油酯的方法主要有薄层层析色谱分析(TLC)、柱层析色谱法、高效液相色谱(HPLC)等。TLC 是一种快速、准确分离脂质的重要方法,它通过不同极性的脂类在固定相和展开相中的相对移动速率差异将脂质进行分离并显色,从而进行脂质含量和组分的测定。由于 TLC 方法具有快速、直观、操作简便和廉价的优点,所以在脂类代谢领域应用最为广泛,并且该方法也广泛应用于检测酶的活性^[6-8]。但是,TLC 分离脂质的效果易受到外界环境条件的影响,如气温、湿度等。目前,常见的 TLC 分离分为单向和双向 2 类。单向分离溶剂系统常采用正己烷:乙醚:乙酸(体积比 70:30:1)作为展开相,用于分

离植物三酰基甘油(TAG)和极性脂^[9]。也有一些研究采用丙酮:甲苯:水(体积比 91:30:8)作为展开相,分离植物样本中的糖脂和磷脂^[10]。由于单向 TLC 不能很好地分离出 PC、PE、PI、PS 等磷脂组分,所以双向 TLC 应运而生。双向 TLC 是将点样后的硅胶板先进行一个方向的层析展开,然后将层析板顺时针旋转 90°,进行第 2 个方向的层析。结束后显色刮板,刮取不同的脂质组分斑块,进行后续的分析。在相关文献中,双向 TLC 常采取三氯甲烷:甲醇:水(体积比 65:25:4)进行第一相展开,然后再使用三氯甲烷:丙酮:甲醇:乙酸:水(体积比 50:20:10:10:5)进行第二相分离展开^[11]。上述溶剂系统在脂类研究中非常常见,适用于大多数植物种子样本的脂质分离。但是,笔者在使用上述溶剂系统分离拟南芥幼苗、烟草叶片等甘油酯含量很低的样本时却发现,该方法在单向和双向 TLC 试验中,均无法得到良好的脂类分离效果,各种脂质斑块聚集在一起,不能很好进行区分。为了解决上述问题,笔者尝试用新的溶剂系统来优化双向 TLC,开发了以三氯甲烷:甲醇:氨水(体积比 65:35:5)和三氯甲烷:丙酮:甲醇:乙酸:水(体积比 50:20:10:10:5)作为第一和第二展开相的双向 TLC 分离方法。该方法可以有效地分离油脂含量较低的植物样本中的糖脂和磷脂,为研究植物膜脂代谢提供了一种简便有效的工具。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 7080B 型气相色谱仪,美国,配置 FID 检测器;DB-23 色谱柱,TLC Silica G 60 型硅胶板,1.05721.0001,默克集团,德国;37 种脂肪酸甲酯标准品,FAMQ005,AccuStandard,美国;磷脂酰甘油(PG)标准品,841188P,Avanti,美国;磷脂酰乙醇胺(PE)标准品,P8193,Sigma,美国;磷脂酰胆碱(PC)标准品,P7443,Sigma,美国;磷脂酰丝氨酸(PS)标准品,P0474,Sigma,美国;磷脂酸(PA)标准品,

收稿日期:2017-08-28

基金项目:浙江省自然科学基金青年基金(编号:LQ15C020002);浙江农林大学科学发展基金(编号:2014FR007)。

作者简介:陈亚东(1992—),男,浙江杭州人,硕士研究生,主要从事油脂代谢分子生物学和生物化学研究。E-mail:454937146@qq.com。

通信作者:甘毅,博士,讲师,主要从事油脂代谢的分子生物学和生物化学研究。E-mail:zjuganyi@163.com。

830856p, Avanti, 美国; 磷脂酰肌醇 (PI) 标准品, P0639, Sigma, 美国; 心磷脂 (cardiolipin, CL), C0563, Sigma, 美国; 振荡仪 (VORTEX - GENIE 2); 大型低温离心机, eppendorf 5810R; 冰箱, 三洋化学试剂有限公司; 氮吹仪, 米欧仪器; 数显恒温金属浴, 米欧仪器; 正己烷, 百灵威; 甲醇, 百灵威; 三氯甲烷, 西陇科学; 丙酮, 高品化工; 甲酸, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 28% 氨水, 国药集团; 浓硫酸, 西陇化工股份有限公司; 冰乙酸, 上海凌峰化学试剂有限公司; 2,6 - 二叔丁基 - 4 - 甲基苯酚, BHT。

1.2 样本总脂的提取

2017 年 5 月, 在浙江农林大学平山温室, 以播种后 15 d 的拟南芥植株 (哥伦比亚生态型) 幼苗和完全成熟的烟草 (K326 品系) 叶片为材料, 称取 0.5 g 样品鲜质量, 在液氮中磨成粉末, 加入 6 mL 提取液 (三氯甲烷: 甲醇: 甲酸, 体积比 10: 10: 1), 振荡混匀, 置于 -20 ℃ 过夜。以 3000 g 转速离心 10 min, 吸取上清液, 转移到 12 mL 玻璃管中。在沉淀中, 加入三氯甲烷: 甲醇: 水 (体积比 5: 5: 1), 振荡混匀, 3 000 g 离心 10 min, 吸取上清, 合并到第 1 步的上清中。在合并的上清中, 加入 3 mL H_3PO_4 (0.2 mol/L) 和 KCl (1 mol/L) 混合液, 振荡混匀, 3 000 g 离心 10 min, 吸取下层三氯甲烷相, 氮吹浓缩至 500 mL 体积。将三氯甲烷转移到 2 mL 安捷伦进样瓶中, -20 ℃ 保存备用, 此样本为总脂提取物, 可以用于分离中性脂和极性脂。

1.3 单向薄层层析分析

1.3.1 中性脂的分离 配制溶剂相正己烷: 乙醚: 乙酸 (体积比 70: 30: 1), 置于层析缸中, 使缸中蒸气达到充分饱和。在 120 ℃ 烘烤处理 2 h 的层析硅胶板上, 用铅笔在距离底边 2 cm 处轻划横线, 每 2 cm 做 1 个标记, 用于点样。然后, 待硅胶板降至室温, 用毛细玻璃管吸取 50 mg 样品进行点样, 同时加入 4 μg 的橄榄油作为参照, 进行层析展开。当展开相液面距离玻璃板上沿 1 cm 时, 结束层析, 采用碘蒸汽或者樱草黄对硅胶板上的脂类斑块进行染色。

1.3.2 分离糖脂和磷脂 用 0.15 mol/L 硫酸铵浸泡硅胶板 30 s, 在空气中放置 2 d 之后, 120 ℃ 活化 2 h。配制展开相溶剂系统 (丙酮: 甲苯: 水, 体积比 91: 30: 8), 在层析缸中充分饱和 1 h。在硫酸铵处理的硅胶板上, 距离底边 2 cm 处, 分别添加 150、125、100、75、50、25 mg 的样品, 各样品间距 2 cm, 在另一块相同的硅胶板上分别加入 10 μg 的各种磷脂标准品。将加样后的硅胶板轻轻放置到层析缸中, 盖紧上盖, 进行层析, 待溶剂线到达距离硅胶板顶端 1 cm 处, 取出硅胶板, 在通风橱中自然风干, 均匀喷施 0.5 mg/mL 樱草黄溶液, 在紫外灯下观察各个脂类成分形成的斑块。

1.4 双向薄层层析分析

在经过活化的硅胶板上, 用铅笔标记点样位置, 在距离底边和左侧边 2 cm 处, 用玻璃毛细管分别吸取 75 mg 样品, 均匀轻柔地点在 3 块相同处理的硅胶板上, 进行双向 TLC 分离。首先将硅胶板垂直插入第一向层析缸中, 展开溶剂为三氯甲烷: 甲醇: 氨水 (体积比 65: 35: 5) 或者三氯甲烷: 甲醇: 水 (体积比 65: 25: 4), 当溶剂线到达顶部, 取出硅胶板, 在通风橱中, 将残留的溶剂充分挥发。然后将硅胶板顺时针旋转 90°, 迅速插入第二向层析缸中, 第二向溶剂系统为三氯甲

烷: 丙酮: 甲醇: 乙酸: 水 (体积比 50: 20: 10: 10: 5)。当溶剂线到达顶部时, 取出硅胶板, 在通风橱中, 将残留的溶剂充分挥发。最后, 在晾干的硅胶板上喷施樱草黄溶液, 在紫外灯下进行观察、拍照。

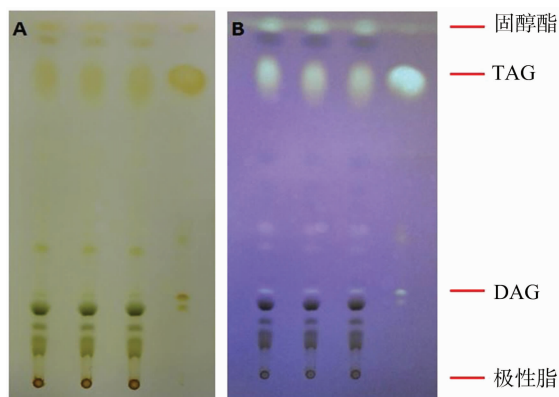
1.5 脂类的甲酯化和气相色谱分析

在硅胶板上, 用铅笔标记分离后的各个脂质组分, 用刀片刮下, 倒入 12 mL 玻璃瓶中。加入 2 mL 甲醇 (含有 1% 硫酸和 0.01% BHT) 和 7.5 μg $\text{C}_{17:0}$ TAG 内标, 80 ℃ 加热反应 2 h, 在冰上冷却 1 min, 加入 2 mL 的 0.9% NaCl 溶液和 2 mL 正己烷, 振荡萃取, 3 000 g 离心 10 min, 吸取上层正己烷上清液, 转移到玻璃管中 (注意不要吸入下层水相)。将正己烷浓缩至 20 μL , 置于安捷伦 2 mL 进样瓶中, 在 7890B 型气相色谱 (DB23 色谱柱, FID 检测器) 上进行 GC 分析, 具体分析参数设置如下: 载气为氦气, 进样口温度 260 ℃, 分流比为 20: 1, 柱温箱起始温度为 160 ℃, 以 20 ℃/min 的速度升温至 240 ℃, 保持 5 min, FID 检测器的氢空比设置为 1: 10。

2 结果与分析

2.1 经典溶剂系统对低油组织样本中的极性脂分离效果

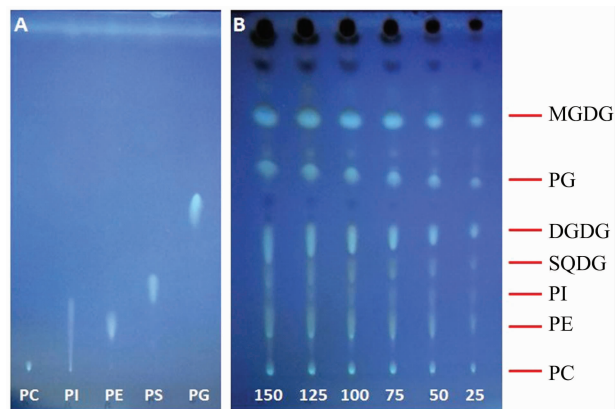
以往的脂类研究常以正己烷: 乙醚: 乙酸 (体积比 70: 30: 1, 溶剂系统 A) 作为单向 TLC 的展开相, 此溶剂系统具有稳定、重复性好等优点, 不仅广泛应用于动物以及微生物, 而且也应用于植物样本的中性脂和极性脂分离。本研究使用了该溶剂系统对烟草叶片等油脂含量极低的营养组织样本进行了层析分离。从图 1 可以看出, 通过碘蒸汽染色或喷施樱草黄, 紫外线照射成像, 使用正己烷: 乙醚: 乙酸 (体积比 70: 30: 1) 作为展开相, 很好地分离开了样本中的中性脂和极性脂, 从硅胶板上沿到点样原点, 依次为固醇脂 (sterol ester)、三酰基甘油 (TAG)、二酰基甘油 (DAG) 等中性脂, 而极性脂 (MGDG、DGDG、PC、PG、PE、PI、PA、PS 等) 则聚集在点样原点周围, 此外, 一些含量相对较少的物质, 如游离脂肪酸等, 也被分离出来。由于烟草叶片中的中性脂 (主要是 TAG) 含量极低, 样本叶龄对分离效果影响很大, 生长后期, 衰老的叶片样本 (如 4~6 周龄的成年拟南芥) 脂质组分可以被上述方法分开, 而幼嫩叶片中中性脂含量极低, 上述系统不能很好区分。



单向 TLC 分离 3 个平行样本 (上样量均为 50 mg, 最右端为橄榄油标准品)。A—层析结束后, 采用碘蒸汽对硅胶板上的脂质斑块进行染色; B—喷施樱草黄, 在紫外灯下成像

图1 传统溶剂系统 A 单向 TLC 分离拟南芥植株样本中的中性脂和极性脂

在叶片等植物营养组织中含有大量的半乳糖脂,如 MGDG、DGDG 等,为了将磷脂、中性甘油酯与糖脂进行分离,又采用了另 1 种已报道的溶剂系统^[10],即丙酮:甲苯:水(体积比 91:30:8,溶剂系统 B),对标准品和样品进行了单向 TLC 分离。如图 2 所示,该系统对糖脂的分离效果较好,能够清晰地区分各种糖脂的条带,但是由于磷脂 PI 和 PE 的极性较为接近,二者分离效果不好。同时,发现该溶剂系统易受上样量的影响,当上样量超过 75 mg 时,各个组分之间容易产生交叉污染。后续的气相色谱分析也表明,该系统对 MGDG 的分离效果较好,但是对其他甘油酯的分离效果并不理想。



A—磷脂标准品 PC、PI、PE、PS 和 PG 的单独分离效果;

B—不同上样量(25~150 mg)对拟南芥营养、组织样本的分离效果影响

图2 传统溶剂系统 B 单向 TLC 分离拟南芥植株中的糖脂和磷脂

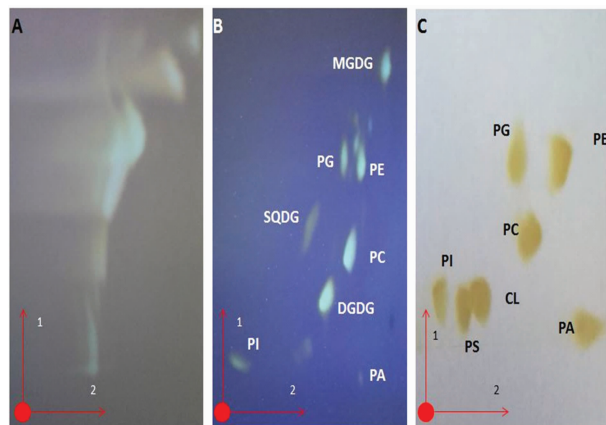
尽管单向 TLC 具有简便、省时的优点,但其不易分离极性脂,因此,一般研究者会使用双向 TLC 对植物样本进行分离。本研究也按 Benning 等的方法^[11-12],用双向 TLC[第一向展开溶剂为三氯甲烷:甲醇:水(体积比 65:25:4),第二向展开溶剂为三氯甲烷:丙酮:甲醇:乙酸:水(体积比 50:20:10:10:5,溶剂系统 C)]对组织样本中的糖脂和磷脂进行分离,从图 3-A 可以看出,TLC 分离存在着比较严重的拖带现象,因此该溶剂系统在现有条件下无法得到良好的分离效果。

原因可能是市面上常见的 G60 硅胶板,由于 G 硅胶呈弱酸性,所以适用于酸性和中性物质的分离,但是碱性物质能与酸性硅胶作用,展开时易出现成点不清晰或者拖尾现象^[13-14]。在层析过程中,样本的碱性物质在溶剂系统中部分解离,带有负电荷的物质会与酸性硅胶氢离子发生结合,才造成了拖尾或重叠的现象,笔者发现这种现象在样本油脂含量较低时会比较明显。

2.2 优化后的溶剂系统可以有效分离低油组织样本中的糖脂和磷脂

为了解决低油样本 TLC 分离中的拖带现象,笔者对双向 TLC 溶剂系统进行了优化,采用了第一向三氯甲烷:甲醇:氨水(体积比 65:35:5)和第二向三氯甲烷:丙酮:甲醇:乙酸:水(体积比 50:20:10:10:5)溶剂系统 D 进行分离。首先,为了确定各个磷脂组分在双向 TLC 分离后的相对位置,笔者使用了 7 个脂类标准品(PC、PE、PI、PS、PG、PA、CL)的混合样本来测试优化后的溶剂系统。从图 3-C 可以看

出,除了 PS、CL,该溶剂系统有效地分离出了 PG、PE、PC、PI 和 PA,各种脂类标准品在硅胶板上都形成了轮廓清晰的斑块。由于植物叶片中 PS 和 CL 含量十分稀少,所以该方法可用于分离植物叶片样本中的甘油酯。由于一些磷脂组分在层析时会发生电离,如 PG、PI 等磷脂呈酸性,而 PC、PE 带有一 NH_3^+ 和一 N^- ,呈碱性,所以在优化方案中,笔者在第一向溶剂系统中加入了一定比例的氨水,是为了用铵根离子去中和硅胶板上的氢离子,减少由于电荷吸引而造成的拖尾,使得斑块清晰^[15-17]。用该方法对拟南芥样本的脂类分离(图 3-B)显示,各个甘油酯成分轮廓清晰锐利,不存在交叉污染,虽然在 PE 周围存在几种其他的脂类,在分辨时存在干扰,但是因为植物叶片中 PE 的含量高,该点大且亮,所以仍然可以对 PE 进行区分。



A—采用传统溶剂系统 C 的烟草样本双向 TLC 分离效果;

B—采用优化溶剂系统 D 的烟草样本双向 TLC 分离效果;

C—采用优化溶剂系统 D 的磷脂标准品混合样本的双向 TLC 分离效果

图3 传统溶剂系统 C 和优化的溶剂系统 D 对烟草叶片样本中糖脂和磷脂的分离效果

在植物中除了甘油磷脂,还存在较多的半乳糖脂,半乳糖脂中不饱和脂肪酸的含量明显高于磷脂,同时含有特定的脂肪酸组分,如在 MGDG 中存在较高含量的 $\text{C}_{16:3}$,PG 中含有反式棕榈烯酸,DGDG 与其他甘油酯脂肪酸组分相比亚麻酸的含量最高,SQDG 组分中棕榈酸所占百分比最高,所以根据这些特点,也可以对各个糖脂以及磷脂进行区分。本研究用气相色谱分析了经过分离后的拟南芥叶片中的各种极性脂类的脂肪酸组成,并与已报道的拟南芥糖脂和磷脂脂肪酸组分进行了对比^[12]。从表 1 可以看出,各个成分的脂肪酸组分基本与其一致,但是在 DGDG 中 $\text{C}_{18:3}$ 含量低于已报道的文献,这可能是由于拟南芥所在的环境条件影响到了膜脂脂肪酸的组成。

3 讨论与结论

本研究还发现一些其他因素也会对脂质分离效果产生较大的影响:(1)环境温度。当试验环境温度在 25~30℃,该系统会达到良好的分离效果。这是因为环境温度可能会影响到层析缸内的饱和蒸汽压状况,进而影响到脂类分离的效果。(2)层析缸质量。值得说明的是,从少量植物样本中提取的糖脂以及磷脂含量比较少,如果试验过程中混入其他脂溶性杂质或脂质,就会引起较大的误差。目前,市场上的层析缸多

表 1 经过优化方法分离的样本的脂类成分气相色谱分析

脂类	脂肪酸组分(物质的量百分率)							
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{16:2}	C _{16:3}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
MGDG	1.73 ± 1.03	2.07 ± 0.97	1.93 ± 0.39	27.97 ± 0.33	1.01 ± 0.17	1.69 ± 0.26	4.22 ± 0.27	59.37 ± 2.20
DGDG	14.15 ± 2.84	3.52 ± 0.98	0.63 ± 0.57	2.03 ± 0.09	2.24 ± 0.35	3.83 ± 2.58	8.99 ± 1.73	64.62 ± 1.38
SQDG	51.19 ± 7.04				6.05 ± 1.20	9.25 ± 1.06	8.21 ± 0.99	25.30 ± 4.71
PC	19.7 ± 2.28	3.5 ± 2.51			4.66 ± 0.54	9.32 ± 1.03	34.57 ± 2.18	28.15 ± 2.25
PG	17.5 ± 3.64	31.53 ± 4.64			5.88 ± 0.45	9.51 ± 0.92	15.38 ± 5.35	20.20 ± 3.24
PE	27.69 ± 5.31				6.10 ± 3.99	7.61 ± 1.52	38.59 ± 3.67	20.02 ± 4.48
PI	41.38 ± 5.24				10.06 ± 2.56	7.98 ± 1.05	23.90 ± 2.13	16.68 ± 0.48

注:数据以“平均值 ± 标准差”表示。

采用多块玻璃粘制而成,不能排除一些黏合剂成分,可能会溶解于有机溶剂中,对硅胶板产生污染。因此,使用一体成型款式的层析缸,可以避免上述可能的污染。(3)硅胶板质量。硅胶颗粒的大小和涂板的均匀程度,会影响到微量样本的层析分离,本试验采用默克 G-60 硅胶板进行微量脂类成分的分离,其硅胶粉末直径较小,涂板较为均匀,适用于微量样本的层析分离。(4)上样量的选择。在上样量方面,50~100 mg 样本即可达到较好的分离效果,超过这个范围会存在不同程度的拖带现象,而过少则会使 GC 检测出的峰值过小,引起较大误差。而上样时点样的形状也会影响分离效果,本研究使用玻璃毛细管进行点样,点样形状接近圆形,控制其直径小于 5 mm,否则易造成拖带现象。(5)样本的抗氧化处理。在糖脂中存在大量不饱和脂肪酸,在进行甲酯化过程中,易被氧化,造成不饱和脂肪酸含量低的表象,所以甲酯化过程须要添加抗氧化剂,如 BHT 等。

综上所述,本研究提供了 1 种用于分离植物脂质的双向 TLC 方法,分别采用三氯甲烷:甲醇:氨水(体积比 65:35:5)和三氯甲烷:丙酮:甲醇:乙酸:水(体积比 50:20:10:10:5)作为层析展开相,该方法可以有效分离微量组织样本中的磷脂和糖脂,为广大研究植物脂质代谢的研究人员提供一种简便有效的工具。

参考文献:

[1] Arisz S A, van Wijk R, Roels W, et al. Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4(2):1.

[2] Bullen H E, Soldati - Favre D. A central role for phosphatidic acid as a lipid mediator of regulated exocytosis in apicomplexa [J]. *FEBS Letters*, 2016, 590(15):2469-2481.

[3] Siegenthaler P A, Murata N. Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics [M]. Netherlands: Springer, 1998.

[4] Webb M S, Green B R. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (Bioenergetics)*, 1991, 1060(2):133-158.

[5] 江 波, 江林涌, 周汉良. 磷脂酸和溶血磷脂酸的生理功能 [J]. *生理科学进展*, 2002, 33(2):159-162.

[6] Andersson M X, Kjellberg J M, Sandelius A S. The involvement of cytosolic lipases in converting phosphatidyl choline to substrate for galactolipid synthesis in the chloroplast envelope [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (Molecular and Cell Biology of Lipids)*, 2004, 1684(1/2/3):46-53.

[7] Dörmann P, Balbo I, Benning C. *Arabidopsis* galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1 [J]. *Science*, 1999, 284(5423):2181-2184.

[8] Gaude N, Nakamura Y, Scheible W R, et al. Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2008, 56(1):28-39.

[9] Vanhercke T, El Tahchy A, Shrestha P, et al. Synergistic effect of WRH1 and DGA1 coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants [J]. *FEBS Letters*, 2013, 587(4):364-369.

[10] Khan M U, Williams J P. Improved thin-layer chromatographic method for the separation of major phospholipids and glycolipids from plant lipid extracts and phosphatidyl glycerol and bis (monoacylglyceryl) phosphate from animal lipid extracts [J]. *Journal of Chromatography*, 1977, 140(2):179-185.

[11] Benning C, Huang Z H, Gage D A. Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, 317(1):103-111.

[12] Miquel M, Browse J. *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(3):1502-1509.

[13] 颜晓航. 薄层色谱法操作技术控制要点分析 [J]. *安徽医药*, 2012(9):1271-1272.

[14] 马 江. 药物薄层色谱鉴别概述 [J]. *内蒙古中医药*, 2012, 31(20):28-29.

[15] Mangold H K. Thin-layer chromatography of lipids [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1964, 41(11):762-773.

[16] Touchstone J C, Chen J C, Beaver K M. Improved separation of phospholipids in thin layer chromatography [J]. *Lipids*, 1980, 15(1):61-62.

[17] 谭龙泉, 张所明, 欧庆瑜. 薄层色谱在高速逆流色谱溶剂系统选择过程中的应用 [J]. *分析化学*, 1996, 24(12):1448-1451.