

Identificación de pigmentos en plantas superiores por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa *

por E. MONGE, J. VAL y L. HERAS

Estación Experimental de Aula Dei. ZARAGOZA

Recibido el 18-X-84

A B S T R A C T

MONGE, E., J. VAL and L. HERAS, 1984. Pigments identification in higher plants by reversed phase high performance liquid chromatography. *An. Aula Dei* 17 (1-2): 33-43.

A chromatographic methods was developed for the separation of chloroplast pigments from spinach, sugar-beet and orange tree. The apparatus consists in a high-pressure pumping, a reversed-phase column, a radial compression module and a recording spectrophotometer. This kind of column allows the simultaneous separation of chlorophylls and carotenoids with a short analysis time. This separation mechanism does not cause pigment degradation products. The coefficient of variation of the individual retention times for each pigment is better than 0.9% which facilitates the pigment identifications.

I N T R O D U C C I O N

Los tejidos verdes de las plantas superiores contienen, por regla general, la misma secuencia de carotenoides, junto a las clorofilas *a* y *b*. Estos pigmentos se encuentran localizados en los cloroplastos, acumulándose mayoritariamente en los tilacoides mientras que solamente se encuentran en concentraciones traza en la matriz o estroma que rodea a estas membranas. Luteína, violaxantina, neoxantina y β -caroteno aparecen frecuentemente en cualquier especie, mientras que α -caroteno, β -criptoxantina y anteraxantina, si están presentes, lo hacen en mucha menor proporción. Fitoeno y fitofluoreno, precursores en la cadena metabólica de los carotenoides, sólo están presentes a nivel de trazas (Goodwin, 1976).

(*) Trabajo financiado por la CAICYT (Proyecto 61142-02)

Los carotenoides, en las plantas, tienen al menos dos funciones fundamentales. Actúan como agentes fotoprotectores de la clorofila (-ida) (Krinsky, 1968, Axelsson et al., 1981), enzimas (Ryberg et al. 1981) y lípidos (Sandelius et al., 1981) y son pigmentos accesorios en la fotosíntesis (Blinks, 1964), puesto que forman parte de los complejos clorofila-proteína, encargados de realizar el transporte electrónico y de la conversión de la energía luminosa en biomasa (Sieferman-Harms, 1980, Lichtenthaler et al., 1982).

El avance en el conocimiento de los carotenoides ha sido consecuencia de la evolución de los métodos de análisis cromatográfico. Entre los más utilizados, en la actualidad, para el estudio de los pigmentos fotosintéticos, se pueden citar: la cromatografía de columna, la cromatografía en papel y la cromatografía de capa fina. La primera, descubierta por Tswett en 1906, permitió evidenciar la existencia de pigmentos responsables del color en gran número de vegetales; sin embargo, se trata de una técnica tediosa que requiere un considerable tiempo de desarrollo (Strain et al., 1971), es difícilmente reproducible y precisa una recolección previa de las fracciones para su identificación. Esta técnica se utiliza generalmente para obtener fracciones en gran escala (Sěstak, 1971). Las cromatografías en papel (PC) y de capa fina (TLC) se utilizan en análisis comparativos. Estas técnicas presentan limitaciones, como consecuencia de la labilidad de las estructuras de los pigmentos que son especialmente sensibles a los efectos de luz, calor, oxígeno y a otras degradaciones químicas (Davies, 1976).

La separación de los carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), puesta en evidencia por Fiksdhal et al. (1978), supuso un considerable avance en el estudio de los pigmentos vegetales. Hoy día esta técnica en fase reversa (rpHPLC) es el método más conveniente debido a la rapidez y resolución que ofrece el tipo de columnas utilizado.

En el presente trabajo se describe un sistema cromatográfico por rpHPLC para la identificación de carotenoides y clorofilas en plantas superiores, aplicado en muestras de espinaca, hojas de remolacha y hojas de naranjo.

MATERIAL Y METODOS

Para el desarrollo del presente trabajo se han utilizado hojas del siguiente material vegetal: espinaca (*Spinacia oleracea* L.), remolacha (*Beta vulgaris* L., var. *Saccharifera*) y naranjo (*Citrus aurantium* L.). La extracción de los pigmentos se realizó según el método de Davies (1976) utilizando metanol como solvente para la homogeneización. Se añadió una pequeña cantidad de CaCO_3 , para prevenir la formación de feofitina, y de ácido ascórbico, como antioxidante. Todo el proceso se realizó con luz tenue de color verde y los extractos eran mantenidos en frío (4-5 °C) siempre que era posible. La purificación del extracto se realizó según la técnica descrita por Eskins y Dutton (1979).

Los reactivos utilizados eran de grado analítico y purificados de acuerdo con las recomendaciones de Davies (1976). Los patrones de α y β -caroteno procedían de la casa Sigma.

El equipo de cromatografía líquida consistía en una bomba de alta presión (Waters mod. M-45) y un inyector (Rheodyne mod. 7010) equipado con un depósito para la muestra de 20 μ l. La columna cromatográfica era de fase reversa y compresión radial (Bondapack C₁₈ -Waters). Esta última estaba conectada a un espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu mod. UV-3000) con posibilidad de trabajar a doble haz o bien a doble longitud de onda y equipado con cubeta de flujo continuo de 8 μ l (Hellma). El registro del cromatograma se realizó a 440 nm.

Los solventes utilizados eran filtrados y desgasificados por medio de una membrana Durapore (Millipore) de 22 μ .

Para la formación del gradiente se utilizó una bomba peristáltica de tres canales (Pharmacia mod. P-3).

RESULTADOS

En la figura 1 se puede apreciar el desarrollo del cromatograma de una muestra de material vegetal enriquecida con patrón de α -caroteno y β -caroteno. En esta misma figura se puede apreciar la evolución en la concentra-

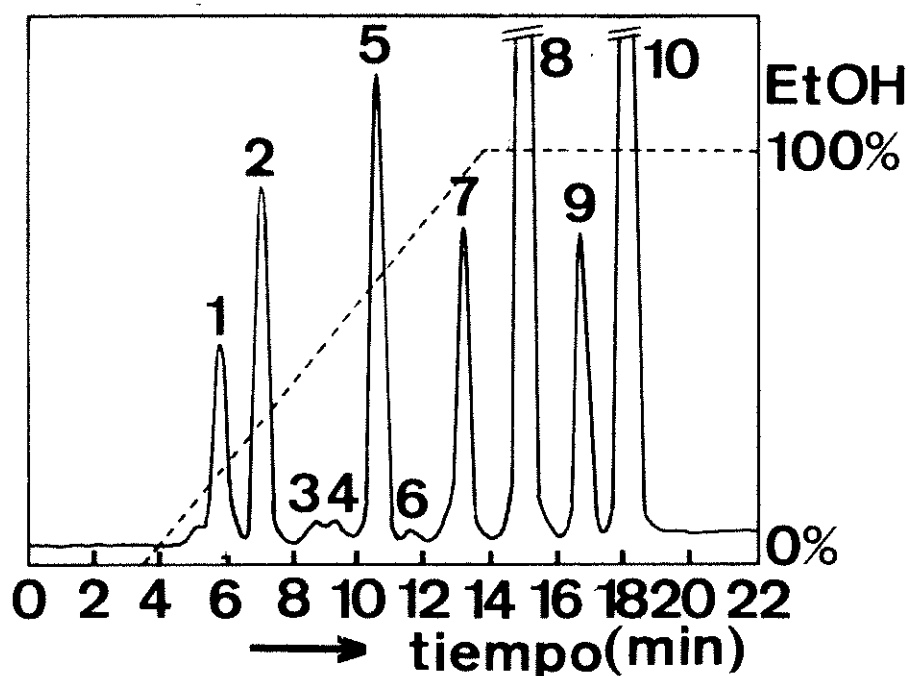


FIG. 1. —Evolución del gradiente de la fase móvil y cromatograma de pigmentos de una muestra de material vegetal (hoja de remolacha) enriquecida con patrones de α y β -caroteno.

ción de la fase móvil durante el desarrollo. Esta fase comienza con un gradiente lineal de metanol/agua (90:10 v/v) para la separación de las xantofilas más polares y se va enriqueciendo con etanol como indica la línea de trazos.

CUADRO 1.— Identificación de pigmentos y valores de K' .

pag 36

Pico No	PIGMENTO	DESARROLLOS						$x \pm$	$K' \pm$
		1	2	3	4	5	6		
1	Neoxantina	5,66	5,76	5,68	5,76	5,68	5,67	$5,7 \pm 0,05$	$6,81 \pm 0,06$
2	Violaxantina	6,81	6,90	6,97	7,01	6,94	6,93	$6,94 \pm 0,04$	$8,51 \pm 0,06$
4	Taraxantina	8,58	8,59	8,66	8,70	8,70	8,58	$8,64 \pm 0,06$	$10,83 \pm 0,08$
5	Luteina	9,97	9,98	10,05	10,09	10,09	9,97	$10,03 \pm 0,06$	$12,73 \pm 0,08$
7	Clorofila b	12,27	12,28	12,36	12,39	12,39	12,27	$12,33 \pm 0,06$	$15,88 \pm 0,08$
8	Clorofila a	14,07	14,08	14,15	14,19	14,19	14,07	$14,13 \pm 0,06$	$18,35 \pm 0,08$
9	α -caroteno	—	—	—	—	—	—	—	—
10	β -caroteno	16,57	16,58	16,65	16,69	16,69	16,57	$16,63 \pm 0,06$	$21,77 \pm 0,08$

La correspondencia entre los picos de la figura anterior y los diversos pigmentos queda reflejada en el cuadro 1, a excepción de los números 3 y 6 que no se han podido identificar y que deben corresponder a productos de degradación, ya que en muestras recién preparadas no aparecen (Fig. 2).

En la figura 2 están representados los desarrollos cromatográficos de los pigmentos totales recién extractados de espinaca, remolacha y naranjo en los que se puede observar la reproducibilidad en la separación de carotenoides.

En el cuadro 1 se indican los pigmentos de acuerdo con la ordenación expresada en las figuras 1 y 2. Asimismo, se dan las constantes de retención (K'), para cada uno de los pigmentos, en el sistema utilizado. Este valor es análogo al R_f en cromatografía de papel y de capa fina. Su cálculo viene dado por la fórmula $K' = (t_R - t_0)/t_0$ donde t_R es el tiempo de retención de un determinado pigmento y t_0 representa el tiempo de retención de un componente no fijado por la columna a un flujo determinado (Storch, 1975).

A fin de obtener una mayor precisión, el cálculo de estos valores se realizó con una velocidad de registro del cromatograma de 2 cm/min, velocidad cuatro veces superior a la utilizada en este trabajo. El valor del α -caroteno no se ha estimado por aparecer en cantidades insignificantes en las muestras analizadas (Fig. 2).

En el cuadro 2 se dan los máximos de los espectros de cada uno de los diferentes pigmentos obtenidos a partir de hojas de naranjo y de acuerdo con las condiciones de elución del gradiente de la fase móvil representadas en la figura 1. Asimismo, se dan los máximos en etanol a que hacen referencia otros autores citados por Davies (1976). El compararlos con los valores encontrados en etanol es debido a que tanto el metanol y/o etanol están presentes a lo largo de todo el cromatograma en mayor o menor proporción y

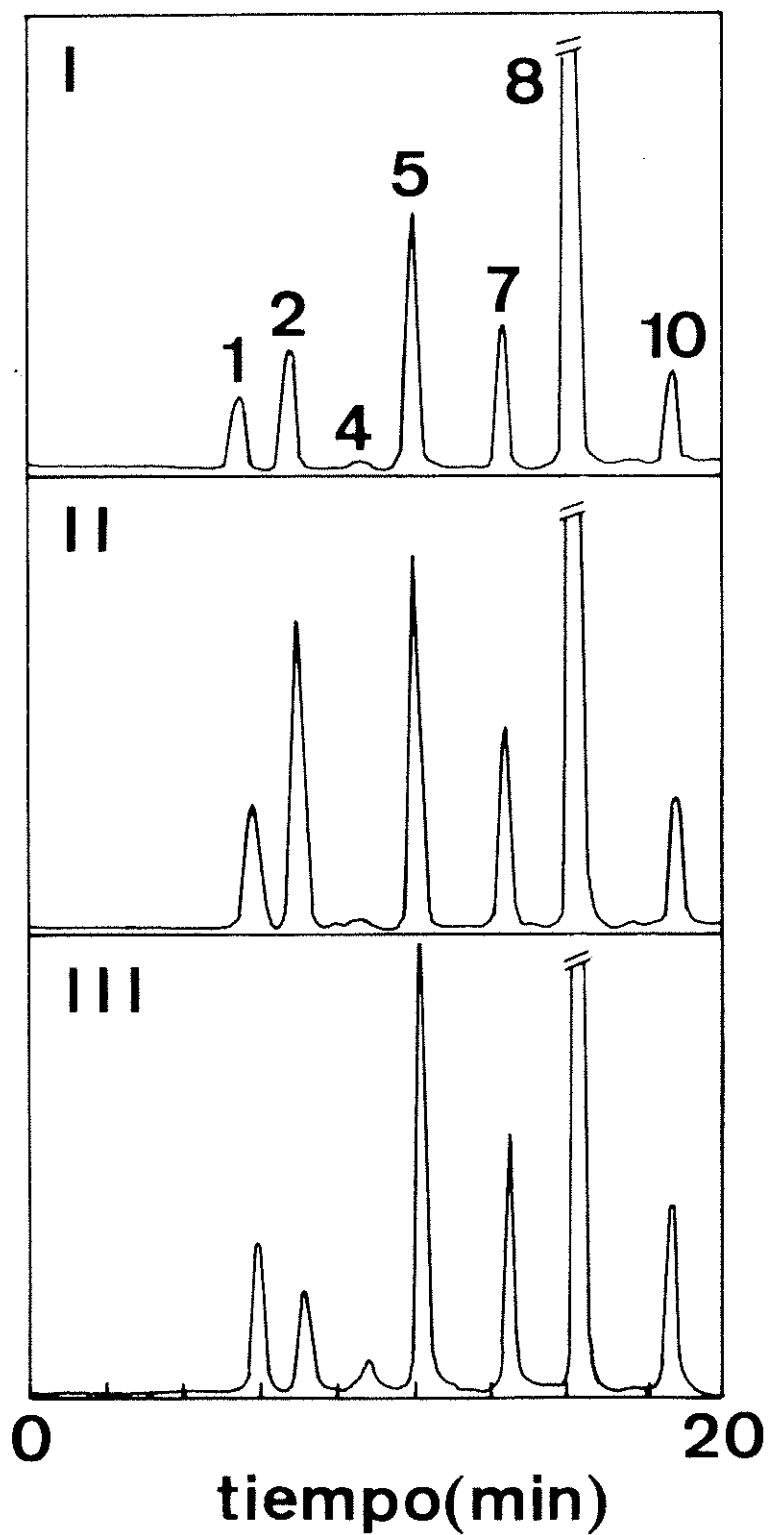


FIG. 2. --Cromatogramas de hoja de remolacha (I), espinaca (II) y hoja de naranjo (III). Cada división del cromatograma corresponde a 1 cm. La velocidad de registro fue de 0,5 cm/min.

los máximos son dependientes del solvente. Los valores de metanol y etanol que nos da la bibliografía son bastante coincidentes. La cantidad de agua en el solvente también tiene su importancia ya que se produce una pérdida en la persistencia del espectro y pueden aparecer picos cerca de la región ultravioleta (Davies, 1976).

CUADRO 2.— Comparación de máximos de espectros obtenidos, según nuestras condiciones, con las citadas por otros autores en etanol.

PIGMENTO	Máximos encontrados			Máximos en etanol		
	(nm)			(nm)		
Neoxantina	464	—	435 — 412	467	—	438 — 415
Violaxantina	470	—	440 — 417	460	—	440 — 417
Taraxantina	470	—	441 — 421	471	—	442 — 420
Luteína	475	—	445 — 424	474	—	445 — 422
β -Caroteno	477	—	451 — (427)	475	—	449 — (427)
Clorofila a			666			665
Clorofila b			650			649

Los máximos en etanol, se han tomado de la bibliografía citada por Holden (1976) para las clorofilas y por Davies (1976) para los carotenoides.

Las distintas fracciones individuales del cromatograma se recogieron y se llevaron a eter dietílico. Cada una de las fracciones se lleva a sequedad con corriente de nitrógeno en la oscuridad y se determinaron los espectros de absorción entre 350-500 nm en las siguientes soluciones: sulfuro de carbono, hexano y etanol. En este último se estudia el desplazamiento hipsocrómico que muestran los carotenoides epóxidos al añadirles una gota de HCl concentrado. Los 5-6 monoeóxidos se caracterizan por un desplazamiento del 17-22 nm, mientras que los 5,6-5', 6' diepóxidos muestran un desplazamiento de 40 nm (Davies, 1976).

Las figuras 3 y 4 nos muestran los espectros obtenidos en cada uno de los solventes mencionados anteriormente. Los espectros dibujados con trazo discontinuo en los carotenoides representan el desplazamiento espectral obtenido al añadir HCl. En el caso de las clorofilas el trazo continuo corresponde a la clorofila *a* y el discontinuo a la *b*. La identificación del β -caroteno no presenta problemas al disponer de patrones que permiten calcular el tiempo de retención en cualquier sistema utilizado para HPLC. El espectro que se representa en la figura 4, corresponde al β -caroteno de una muestra vegetal disuelto en etanol, último solvente utilizado en nuestro sistema (Fig. 1).

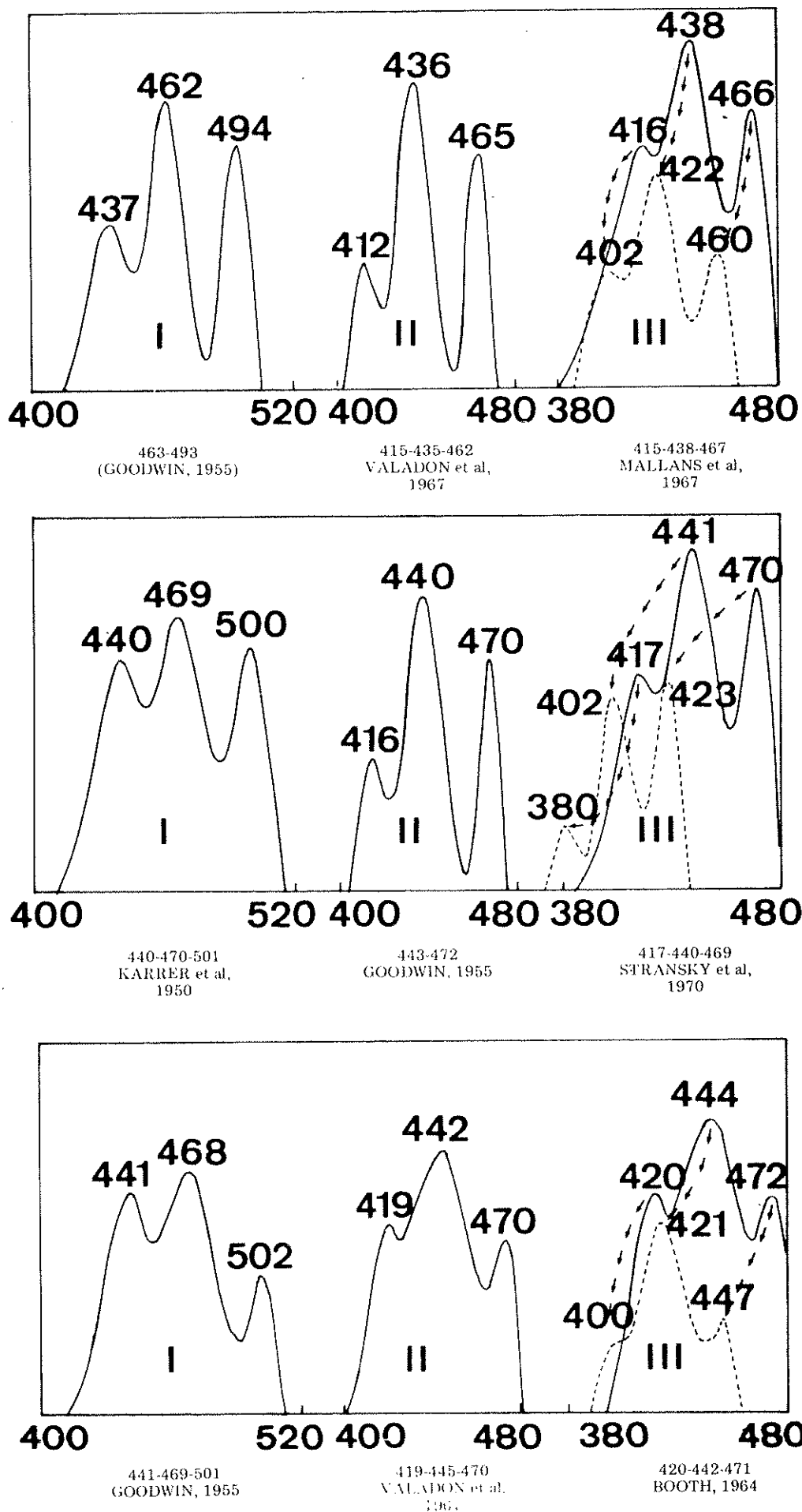


FIG. 3. —Espectros de absorción de Neoxantina, Violaxantina y Taraxantina en distintos solventes: sulfuro de carbono (I), n-hexano (II) y etanol (III). Los máximos al pie corresponden a los esperados en cada solvente según los diferentes autores citados por DAVIS (1976).

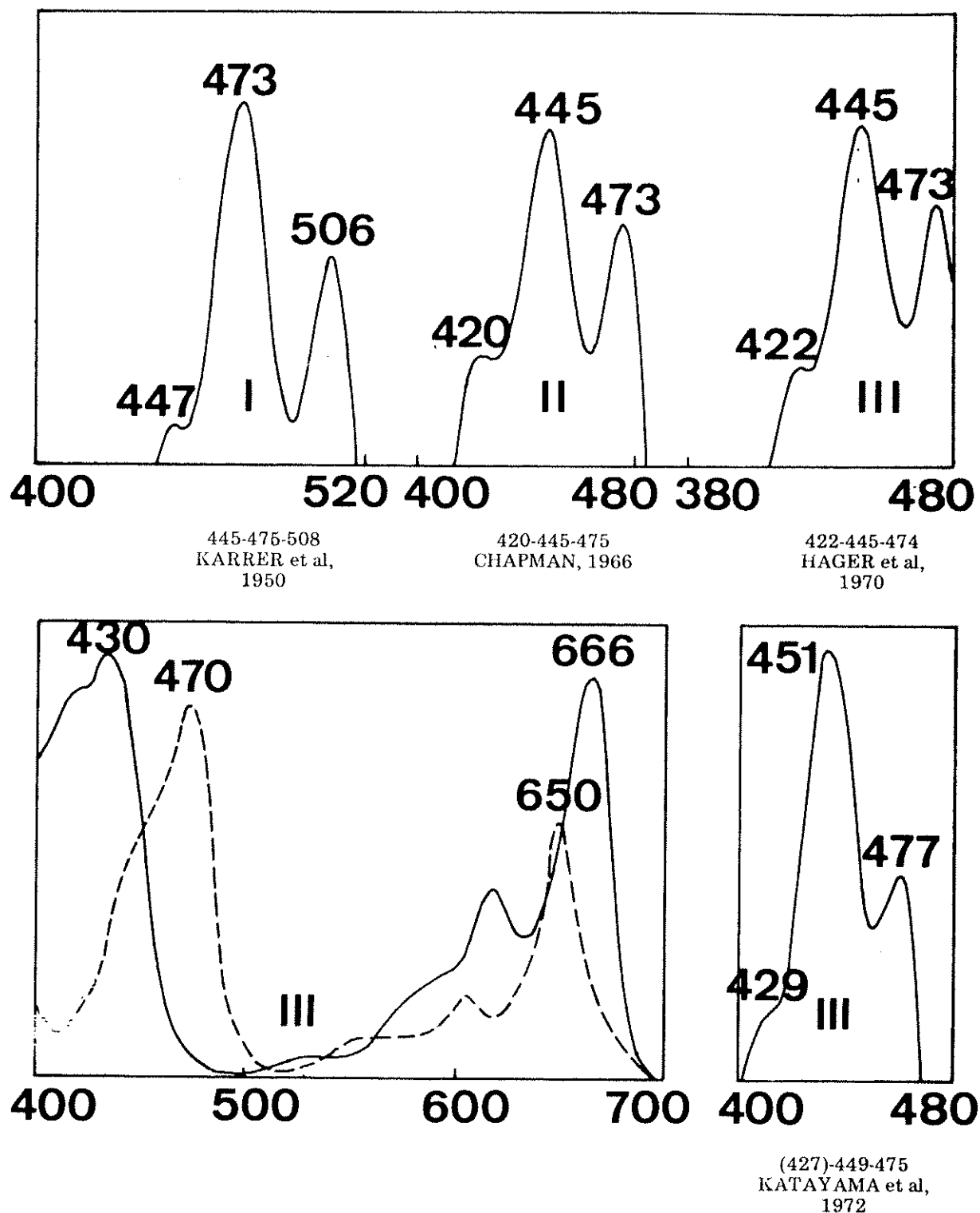


FIG. 4. — Espectros de absorción de Luteina, Clorofilas y β -caroteno en distintos solventes: sulfuro de carbono (I), n-hexano (II) y etanol (III). Los máximos que figuran al pie corresponden a los esperados en cada solvente según los diferentes autores citados por DAVIS (1976).

DISCUSION

Como se puede apreciar en los cromatogramas, los pigmentos, con este sistema de fase reversa, son separados de acuerdo con su caracter lipofílico. En esas mismas figuras, se puede ver que con esta metodología de trabajo no se observan isomerizaciones ni oxidaciones, como ocurre con otros procedimientos, ya que según Braunmann et al. (1981) en el caso de que se produzcan el sistema las resuelve perfectamente.

La elección de la fase móvil se realizó después de estudiar los distintos eluyentes empleados por otros investigadores. Así Lichtenthaler et al. (1982) utilizó una mezcla isocrática del 9% de agua en metanol. Braunmann et al., (1981) un gradiente lineal de metanol/acetonitrilo (25.75 v/v) agua. Eskins et al. (1977) mezclas discontinuas metanol-agua y posteriormente Eskins y Dutton (1979) un programa lineal de metanol del 90% y acetato de etilo. Después de ensayar estas fases, incluso con algunas modificaciones, hubo que desecharlas puesto que el tiempo en que se desarrollaba el cromatograma era excesivamente largo, si bien la eficacia en la resolución de las fracciones era buena. Esto seguramente es debido a una mayor eficacia (en el poder de resolución) de nuestra columna. Por lo tanto, como fase móvil se aplicó el gradiente señalado en la figura 1 que permite desarrollar el cromatograma en menos de 20 minutos; la desviación estandar de la media del tiempo de retención va disminuyendo desde el 0,9% de la neoxantina hasta el 0,3% del β -caroteno, lo que da idea de la reproducibilidad de resultados.

La zeaxantina parece ser que, en fase reversa, eluye junto con la luteína, aunque Prenzel et al. (1982) han logrado la separación de estos pigmentos trabajando con dos columnas en serie, para eluir las xantofilas de una de las columnas utilizan fase reversa y una mezcla isocrática de 1,5% de agua en metanol, apareciendo un pico de zeaxantina detrás de la luteína. Braunmann et al. (1981) aprecian ocasionalmente, en sus cromatogramas, un hombro delante del pico correspondiente a la luteína e indican que su sistema podría ser capaz de separar este pigmento de la zeaxantina por medio de pequeñas variaciones en la composición de la fase móvil. Aunque se han ensayado diferentes eluyentes e incluso las fases móviles recomendadas por los citados autores, en ningún caso se observó, en el pico correspondiente a la luteína, hombro ni desdoblamiento alguno. Con el fin de comprobar este punto se recogió la fracción correspondiente y se resolvió por TLC según las condiciones de Ben-Aziz et al. (1974) y Hager et al. (1966) obteniendo únicamente una mancha; por ello pudo deducirse que, en las muestras analizadas, de existir zeaxantina está en cantidades inapreciables. El hecho de que Prenzel et al. (1982) puedan identificar zeaxantina puede deberse a que trabajaron con plantas sometidas a altas intensidades de luz (170 W.m^2) ya que con intensidades inferiores (7 W.m^{-2}) no detectaron dicho pigmento. El hecho puede explicarse por la existencia de una conversión de la violaxantina de la membrana externa del cloroplasto a zeaxantina, cuando los cloroplastos reciben una fuerte iluminación. Jeffrey et al. (1974) demostraron que las membra-

nas de los cloroplastos de espinaca obtenidos a partir de hojas sometidas a altas intensidades de luz presentaban una relación violaxantina/luteína + zeaxantina de 0,75, mientras que esta misma relación para tratamientos con bajas intensidades era de 3,5. Por otra parte, con nuestro sistema se han podido separar pigmentos que difieren en la posición de un doble enlace, ya que como se puede observar en la figura 1 hay una completa resolución entre α y β caroteno; si bien no ha sido posible la separación de luteína y zeaxantina que presentan la misma característica diferencial.

Los resultados obtenidos con este sistema de rpHPLC demuestran claramente que se pueden identificar los pigmentos de las plantas superiores, sin que se produzcan alteraciones de los mismos, con una mayor sensibilidad, selectividad y seguridad que la demostrada por otras técnicas analíticas y en otras condiciones de trabajo.

RESUMEN

En el presente trabajo se describe un método cromatográfico que ha servido para la separación, con buenos resultados, de pigmentos cloroplásticos de espinaca, remolacha azucarera y naranjo. El equipo instrumental utilizado está constituido por una bomba de alta presión, una columna de fase reversa, un módulo de compresión radial y un espectrofotómetro registrador. Este tipo de columnas permite la separación simultánea de clorofilas y carotenoides en un cierto intervalo de tiempo. Esta metodología no produce degradación de pigmentos. El coeficiente de variación de los tiempos de retención de cada pigmento es menor del 0,9%, lo que permite la identificación de los mismos con gran precisión.

REFERENCIAS

- Axelsson, L. Klockare, B.; Ryberg, H.; Sandelius, A.S. (1981). The function of carotenoids during chloroplast development II. Photostability and organization of early forms of chlorophyll(ide). In Proc. 5th. Int. Congr. on Photosynthesis. Halkidiki, Greece, Sept. 7-13, 1980. Photosynthesis V Chloroplast development (G. Akoyunoglou ed.): 285-293. *Balabau International Science Services, Philadelphia*.
- Ben-Aziz, A.; Koren, E. (1974). Interference in Carotenogenesis as a mechanism of action of the Pyridazinone Herbicide Sandoz 6706 *Plant Physiol* 54: 916-920.
- Blinks, L.R. (1964). Accessory pigments and photosynthesis; in *Photophysiology* (A. C. Giese ed.) Vol. 1: 199-221. *Academic Press, New York*.
- Braumann, T., Grime, L.H. (1981). Reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta*, 637: 8-17.

- Davies, B.H. (1976). Carotenoids. In "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" (T.W. Goodwin ed.). Vol 2: 38-165, 2^a ed. *Academic Press, New York*.
- Douce, R.; Holta, B., Benson, A.A. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**: 7215-7222.
- Eskins, K.; Dutton (1979). Sample preparation for high-performance liquid chromatography of higher plant pigments. *Anal. Chem.* **51**: 1885-1886.
- Eskins, K.; Schalfeld, Ch.R.; Dutton, H.J. (1977). High-performance liquid chromatography of plant pigments. *J. Chrom.* **135**: 217-220.
- Fiksdahl, A. Mortensen, J.T.; Liaaen-densen (1978). High-pressure liquid chromatography of carotenoids. *J. Chrom.* **157**: 111-117.
- Goodwin, T.W. (1976). Distribution of carotenoids. In "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" (T.W. Goodwin ed.). Vol. 1: 225-261, ed. *Academic Press. London*.
- Hager, A; Bertenzth, T.M. (1966). Die isolierung und quantitative bestimmung der carotenoide und chlorophylle von blättern, phischer methoden. *Planta*, **69**: 198-217.
- Holden, M. (1976). Chlorophylls. In "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" (T.W. Goodwin ed.). Vol. 2: 1-37, 2^a ed. *Academic Press. London*.
- Jeffrey, S.W., Douce, R., Benson, A.A. (1974). Carotenoid transformation in the chloroplast envelope. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**: 807-810.
- Krinsky, N.I. (1968). The protective function of carotenoid pigments. In Photo-physiology. Current Topics (A.C. Giese ed.). Vol. III: 123-195 *Academic Press. New York*.
- Krinsky, N.I. (1971). In "Carotenoids" ed. Isler, O. *Birkhauser Verlag. Basel*: 669-716.
- Lichtenthaler, H.K. Prenzel, V.; Kuhn, G. (1982). Carotenoid composition of chlorophyll-carotenoid-proteins from Radish chloroplast. *Z. Natur. Forsch.* **37**: 10-12.
- Prenzel, U., Hartmut, K.; Lichtenthaler, K. (1982). Localization of β -carotene in chlorophyll a-proteins and changes in its levels during short-term high light exposure of plants. B. V. Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids J.F.G. H. Wintermans and P.J.C. Kuiper editors. *Elsevier Biomedical Press*.
- Ryberg, H.; Axelsson, L. Widell, K.O.; Virgin, H.I. (1980) Chlorophyll to accumulation and grana formation in low intensities of red light. *Physiol. Plant*, **49**: 431-436.
- Sandelius, A.S., Axelsson, L.; Klockare, B.; Ryberg, H.; Widell, K.O. (1981). The function of carotenoids during chloroplast development IV. Protection of galactolipids from photodescomposition sensitized by early forms of chlorophyll. In Proc. 5th Int. Congr., on Photosynthesis. Halkidiki, Greece, Sept. 7-13, 1980. Photosynthesis. V. Chloroplast development (G. Akoyunoglou ed.) 305-309. *Balabou International Science Services. Philadelphia*.
- Sustak, Z. (1971). In "Plant Photosynthesis Production; Manual of Methods" Sestak, Z., Catsky, J.; Jarvic, P.G. Ed., *Dr. W. Junk Publ., The Hague*, 1971: 672-701.
- Siefermanm-Harms, D. (1980). The role of carotenoids in chloroplast of higher plants. In Biogenesis and Function of Plant Lipids (P. MasPlak, P.; Benveniste, C. Costes and R. Douce, eds): 331-340. *Elsevier/North-Holland Bromedical Press*.
- Storch, J.M. (1975). En "Fundamentos de la cromatografía de gases" *EXEDRA. Editorial Alhambra, Madrid*: 22-62.
- Strain, H.H.; Cope, B.T. Svec, W.A. (1971). In "Methods in Enzymology; Photosynthesis". Vol XXIII, San Pietro, A., Ed., *Academic Press. New York, N.Y.*, 452-476.