

Análisis cuantitativo de pigmentos en plantas superiores por HPLC *

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

Estación Experimental de Aula Dei, ZARAGOZA

Recibido el 18-XII-84

A B S T R A C T

MONGE, E.; J. VAL and L. HERAS. 1984. Quantitative analysis of higher plant pigments by HPLC. *An Aula Dei* 17 (1-2): 60-66.

In this paper, sugar beet photosynthetic pigments, as determined quantitatively by HPLC, are discussed in relation to those obtained using several equations. Three extraction methods are also compared. The 100% acetone has been the most efficient solvent among the various organic reagents tested. On the other hand, it seems that the chlorophyll a/b ratio depends on the extractant and the equation used.

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

Los trabajos realizados sobre pigmentos fotosintéticos en los últimos años, demuestran el interés de la identificación y cuantificación tanto de las clorofilas, como de los carotenoides. Bioquímicos, fisiólogos, nutrólogos vegetales, biólogos marinos, etc., continúan poniendo a punto y perfeccionando métodos particularmente apropiados para el estudio de pigmentos y que a su vez son base para el desarrollo de otras líneas de investigación.

La cuantificación de estos pigmentos se realiza por regla general de acuerdo con ecuaciones que proporcionan unos valores aproximados, ya que su cálculo está basado en determinaciones espectrofotométricas a una longitud

(*) Trabajo financiado por la CAICYT (Proyecto 6142-02)

de onda específica, minimizándose la influencia de todos compuestos que a esa longitud podrían interferir. Por lo tanto, no es de extrañar que exista una disparidad de criterios entre diferentes especialistas, a la hora de expresar valores absolutos de concentración, o en la simple evaluación de la relación clorofila *a* / clorofila *b* (Salisbury y Ross, 1978).

En este trabajo se determinan las concentraciones de los carotenoides y clorofilas en hoja de remolacha azucarera, mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (rp-HPLC), comparándolas con los valores obtenidos mediante la aplicación de las fórmulas citadas por varios autores (Holden, 1976; Lichtenthaler y Wellburn, 1983).

MATERIAL Y METODOS

Como material de trabajo se ha utilizado hoja de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L. var. *Sacharifera*) cultivada en invernadero. La extracción de pigmentos se ha realizado según los métodos recomendados por Davies (1976) utilizando como solventes etanol del 96%, metanol y acetona del 80% y del 100%, purificados de acuerdo con sus instrucciones.

El homogeneizador eléctrico es de la casa Edmund Buhler mod. HO.

El equipo cromatográfico utilizado es el descrito en un trabajo previo (Monge et al., 1984).

La especial configuración del sistema de detección utilizado, donde es posible que se modifique el camino óptico del haz de luz, en función de la posición que adopte la microcélula en cada análisis, hace muy probable que la intensidad de la señal que llega al fotomultiplicador sea distinta, incluso para una misma concentración de pigmento. En consecuencia, ha sido necesario utilizar un factor de corrección, que minimice las posibles alteraciones en el registro de los picos. Este factor se calcula dividiendo el sumatorio de áreas del cromatograma, registrado a 440 nm, por la absorbancia del extracto total a la misma longitud de onda. Así se obtiene un factor multiplicador que se aplica al área de cada pigmento.

Por otra parte, se han calculado las desviaciones que podrían aparecer en la medición de las áreas obtenidas en el registro a 440 nm, frente a las obtenidas con la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción de cada compuesto; la constante así determinada se ratifica posteriormente mediante la inyección de patrones. En el caso de las xantofilas no se aprecia diferencia significativa entre ambas medidas, mientras que en clorofila *b*, clorofila *a* y β -caroteno es necesaria la aplicación de las respectivas constantes.

Para calcular las concentraciones de cada una de las xantofilas y del β -caroteno se han utilizado los coeficientes de extinción citados por Hager y Meyer-Bertenrath (1966) y para las clorofilas los de Mackinney (1940).

El área de los picos se determinó por dos procedimientos y los resultados que se exponen en el trabajo corresponden a la media de ambos sistemas de medida: triangulación y pesada después de su traslado a papel vegetal.

RESULTADOS Y DISCUSION

a.— Metodología para la extracción

El trabajo se inició realizando un estudio comparativo de la eficacia de tres sistemas de extracción de pigmentos totales de materia vegetal.

El primero (método A) consiste en triturar con mortero 1 gramo de material fresco junto con un abrasivo y una pequeña cantidad de $Mg CO_3$ para prevenir la formación de feofitinas. En el segundo sistema (método B) 10 gramos de hojas, a las que también se les añade $Mg CO_3$, se trituran (2-3 períodos de 30 seg), en un homogeneizador de cuchillas, refrigerado. En ambos casos se utiliza como agente extractante acetona del 100%, repitiendo la operación cuantas veces es necesario hasta que la torta de filtración permanece prácticamente incolora.

En el tercer procedimiento (método C), 0,5 gramos de material, finamente dividido, se dejan en maceración, durante 24-48 horas, con dimetilformamida (DMF), a una temperatura de $4^{\circ}C$ (Morán, 1982).

Los tres sistemas de extracción se realizan simultáneamente, repitiendo la experiencia seis veces.

El material vegetal se recolectó diariamente, procediendo a su homogeneización una vez despeciado y adecuadamente troceado.

En el cuadro 1 se exponen los valores obtenidos por tres procedimientos de extracción: Para los métodos A y B se han aplicado las ecuaciones de Lichtenthaler et al., (1983); los correspondientes al método C se han calculado a partir de las fórmulas de Moran (1982)

CUADRO 1.— Concentraciones medias ($\mu g/g$ materia fresca) de pigmentos según el método de extracción.

METODO	PIGMENTO		
	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides totales
A	988 ± 7	252 ± 5	262 ± 2
B	990 ± 4	242 ± 2	263 ± 3
C	757 ± 16	189 ± 6	—

Puede observarse que la eficacia de extracción, tanto triturando con mortero (sistema A), como por molienda (sistema B), es muy semejante y superior a la del sistema C. En vista de estos resultados, se adoptó el método B para la realización de la segunda fase del trabajo, por ser el más rápido y cómodo.

b.—Agentes extractantes

Una vez escogido el sistema de extracción se procedió a comparar el poder extractante de los cuatro solventes orgánicos mencionados anteriormente.

En el cuadro 2 se expresan los valores de las concentraciones medias en miligramos por gramo de materia fresca y las desviaciones típicas obtenidas al aplicar las ecuaciones de Lichtenthaler y Wellburn (1983) y de Holden (1976).

CUADRO 2.— Eficacia extractora de los solventes ($\mu\text{g/g}$ materia fresca).

PIGMENTO SOLVENTE	Clorofila a		Clorofila b		Carotenoides totales
	L	H	L	H	L
Metanol	738±74	810±82	250±36	191±32	124±19
Etanol 96%	699±80	712±81	191±22	195±20	164± 8
Acetona 80%	693±52	730±55	154±15	210±19	156±17
Acetona 100%	793±41	—	202± 6	—	217±11

L = LICHTENTHALER

H = HOLDEN

Al observar este cuadro, se pone de manifiesto que los extractantes más eficaces para las clorofilas son metanol y acetona del 100%, y que esta última es la que ofrece valores más altos en la concentración total de carotenoides. Asimismo la desviación estandar encontrada para la acetona al 100% es mucho menor que para el resto de solventes.

Teniendo en cuenta que las ecuaciones de Lichtenthaler únicamente permiten determinar la concentración total de pigmentos, alicuotas de los extractos se sometieron también a análisis por HPLC, a fin de obtener información sobre los pigmentos individualizados. En el cuadro 3 se expresan las concentraciones medias, en miligramos por gramo de materia fresca, y las desviaciones típicas obtenidas.

Por la observación de este cuadro se confirma el hecho de que todos los solventes no tienen la misma capacidad extractora, siendo más eficaces, para estos pigmentos, aquéllos que son más apolares, hecho que se corrobora al estudiar los valores obtenidos con la acetona del 100%. Esta conclusión contradice la opinión de Davies (1976) quien afirma que en la extracción de

pigmentos de tejidos vegetales pueden emplearse indistintamente acetona, metanol o etanol. Aunque todos disuelven en grado semejante las xantofilas, no ocurre lo mismo con las clorofilas y carotenos, compuestos menos polares. En el caso de las clorofilas, si bien las diferencias no son tan acusadas, también la acetona al 100% es el solvente que proporciona valores de concentración más altos.

CUADRO 3.— Concentración de los pigmentos obtenidos por HPLC en función del extractante utilizado.

SOLVENTE	PIGMENTO						
	Neoxantina	Violaxantina	Taraxantina	Luteína	Clorofila b	Clorofila a	β -Caroteno
Metanol	25 \pm 3	36 \pm 6	7 \pm 2	69 \pm 8	183 \pm 80	747 \pm 35	13 \pm 2
Etanol 96%	25 \pm 3	42 \pm 7	6 \pm 2	79 \pm 9	149 \pm 18	434 \pm 42	53 \pm 5
Acetona 80%	24 \pm 3	37 \pm 6	6 \pm 2	76 \pm 4	166 \pm 26	673 \pm 52	5 \pm 4
Acetona 100%	27 \pm 1	39 \pm 6	6 \pm 2	74 \pm 5	208 \pm 21	783 \pm 53	79 \pm 8

Comprobado que la acetona del 100% es el extractante más eficaz, se procedió a inyectar (6 repeticiones) alícuotas de un mismo extracto con objeto de estudiar la reproducibilidad de los resultados. En el cuadro 4 se exponen los valores medios de concentración, las áreas que los representan y sus correspondientes desviaciones estandar.

CUADRO 4.— Concentraciones de los pigmentos, áreas de picos y desviaciones estandar.

	PIGMENTOS						
	Neoxantina	Violaxantina	Taraxantina	Luteína	Clorofila b	Clorofila a	β -Caroteno
Area (cm ²)	1,10 \pm 0,02	1,70 \pm 0,08	0,32 \pm 0,02	2,88 \pm 0,12	1,46 \pm 0,06	9,02 \pm 0,18	1,06 \pm 0,06
Concentración (µg/g mat. seca)	36,8 \pm 0,67	50,0 \pm 2,35	8,6 \pm 0,54	79,4 \pm 3,31	219,0 \pm 9	987,0 \pm 30,64	69,7 \pm 3,95

Como puede observarse, en las repeticiones realizadas sobre una misma muestra, se obtienen desviaciones inferiores al 5% lo que demuestra la bondad del método, si tenemos en cuenta las bajas concentraciones que normalmente se inyectan en el sistema cromatográfico.

En el cuadro 5 se expresan los valores encontrados para la relación clorofila a / clorofila b a partir de los datos expuestos en los cuadros 2 y 3, obtenidos con las mismas muestras.

CUADRO 5.— *Relación clorofila a / clorofila b calculada a partir de los valores obtenidos aplicando fórmulas matemáticas y por rp-HPLC, en función de distintos solventes.*

SOLVENTE	Fórmula de Holden	Fórmula de Lichtenthaler	rp-HPLC
Metanol	4,24	2,95	4,08
Etanol 96%	3,65	3,66	2,91
Acetona 80%	3,48	4,50	4,05
Acetona 100%	—	3,93	3,76

Como se observa, existe una gran variación de esta relación dependiendo tanto de las ecuaciones o sistemas analíticos utilizados, como del solvente orgánico empleado en la homogeneización del tejido vegetal. Si se calcula esta relación con los datos expresados en el cuadro 4, el valor es de 4,51, muy distinto al que aparece en el cuadro 5. Sin embargo, los resultados con los que se ha elaborado este último, aunque proceden del análisis del mismo material, las muestras fueron tomadas en días diferentes, lo que ha podido influir en el valor medio de la relación.

Puede decirse, por tanto, que la relación clorofila *a* / clorofila *b*, en plantas superiores, es un valor dependiente del extractante, de las ecuaciones aplicadas para su cálculo y del estado fisiológico de la planta en el momento en que se toma la muestra, lo que obliga a conceder un valor relativo a la afirmación, muy común, de que el contenido de clorofila *a* es de dos a tres veces superior al de clorofila *b*.

RESUMEN

En el presente trabajo se comparan los resultados obtenidos en la cuantificación de pigmentos fotosintéticos en hoja de remolacha azucarera, según las fórmulas recomendadas por diferentes autores y mediante el análisis por HPLC. Asimismo se hace un estudio de tres procedimientos de extracción y se comparan varios solventes orgánicos como extractantes, demostrando que, de todos ellos, el más eficaz es la acetona del 100%. Se pone de manifiesto que la relación entre las clorofilas *a* y *b* depende del solvente utilizado y de la ecuación aplicada en el cálculo de las mismas.

REFERENCIAS

- Davies, B.H. (1976). Carotenoids, In: Chemistry and biochemistry of plant pigments. Ed. T.W. Goodwin. 38-165. *Acad. Press. London*.
- Hager, A.; Meyer-Bertenrath, T. (1966). Die isolierung und quantitative bestimmung der carotenoide und chlorophylle von blättern, algen und isolierten chloroplasten mit hilfe dunnschichtchromatographischer methoden. *Planta*, 69: 138-217.
- Holden, M. (1976). Chlorophylls. In: Chemistry and biochemistry of plant pigments. Ed. T.W. Goodwin. 2-37. *Acad. Press. London*.
- Lichtenthaler, H.K.; Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. In: 6Th International Congress on Photosynthesis. Brussels.
- Mackinney, G. (1940). Criteria for purity of chlorophyll preparations. *J. Biol. Chem.* 132: 91-103.
- Monge, E., Val, J.; Heras, L. (1984). Identificación de pigmentos en plantas superiores por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa. *An. Aula Dei* 17:
- Morán, R. (1982). Formula for determination of chlorophyllous pigments extracted with N, N -dimethylformamide. *Plant Physiol.* 69: 1376-1381.
- Salisbury, F.B.; Ross, C.W. (1978). Photosynthesis. In: Plant Physiology. Ed. J.C. Carey, 123-135. *Wersworth Publishing Co. Belmont*.