

# NUEVAS METODOLOGÍAS EN EL ANÁLISIS DE PIGMENTOS DE FITOPLANCTON MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

*José Luis Garrido<sup>1</sup> y Manuel Zapata<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Mariñas (C.S.I.C.).

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Mariñas. Consellería de Pesca, Marisqueo e  
Acuicultura. Xunta de Galicia.

A diferencia de las plantas superiores, en las que un solo sistema constituido por unos pocos pigmentos ha llegado a ser dominante, las microalgas han desarrollado una gran variedad de sistemas pigmentarios que, en su conjunto, presentan un gran número de compuestos diferentes que suelen aparecer en forma mezclas complejas (Jeffrey, 1980).

Esta complejidad en la dotación pigmentaria de las microalgas hace que, en muchos casos, puedan poseer pigmentos o combinaciones de pigmentos que son diagnósticas de su pertenencia a un determinado grupo taxonómico. Esto ha llevado al empleo del análisis de pigmentos en estudios filogenéticos y como herramienta de caracterización de comunidades fitoplanctónicas en aguas naturales.

También se ha empleado el análisis de pigmentos en los estudios relacionados con la producción primaria, el crecimiento y la fisiología de microalgas, utilizándolos, por ejemplo, como estimadores de la contribución de diferentes clases algales a la producción planctónica total. Puesto que el aparato fotosintético es capaz de reflejar las respuestas del fitoplancton a variaciones en factores ambientales, las alteraciones en los

perfiles pigmentarios pueden emplearse como estimadores del estado fisiológico, por ejemplo ante situaciones de déficit de nutrientes o bajo diferentes regímenes lumínicos.

Por otra parte, varios trabajos han demostrado la posibilidad de seguir diversos pasos en las cadenas tróficas que, en medios acuáticos, tienen el fitoplancton como punto de partida, mediante análisis pigmentario.

Cabría citar, por último, la creciente utilización del análisis de pigmentos en las verificaciones en tierra (o a bordo) de las estimaciones remotas (satélite o aéreas) de biomasa fitoplanctónica

Varios de estos aspectos fueron tratados en profundidad en la revisión de Millie *et al.* (1993).

## **ANÁLISIS DE PIGMENTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA**

Los pigmentos fotosintéticos solubles en disolventes orgánicos (clorofilas y carotenoides), son candidatos idóneos al análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), ya que se extraen con facilidad, su solubilidad en los disolventes empleados como fases móviles es elevada y su intensa absorción en el rango visible (así como en el caso de las clorofilas sus propiedades fluorescentes) permite su detección a concentraciones muy bajas.

Sin embargo, la separación cromatográfica completa de los pigmentos de una muestra de origen fitoplanctónico se enfrenta con dos problemas:

- Por una parte, el conjunto exhibe un amplísimo rango de polaridades que abarca, para los carotenoides, desde hidrocarburos a xantofilas polares en las que el oxígeno se presenta formando parte de diferentes funcionalidades y, para las clorofilas, desde las formas esterificadas con fitol a formas muy polares que contienen una función ácido carboxílico libre.

— Por otra parte, muchos de los compuestos se distinguen unos de otros por pequeñas diferencias estructurales. Es frecuente encontrar, en la misma muestra, pares de pigmentos que se diferencian exclusivamente en la presencia o ausencia de un doble enlace -clorofilas  $c_1$  y  $c_2$ , formas mono- y divinílicas de las clorofilas a y b- o incluso de isómeros que se distinguen por la posición en que se encuentre dicha insaturación -clorofila  $c_2$  y Mg-DVP, luteína y zeaxantina, etc...-(Figura 1). Esto origina la aparición de grupos de pigmentos cuya separación es difícil con técnicas de HPLC convencionales.

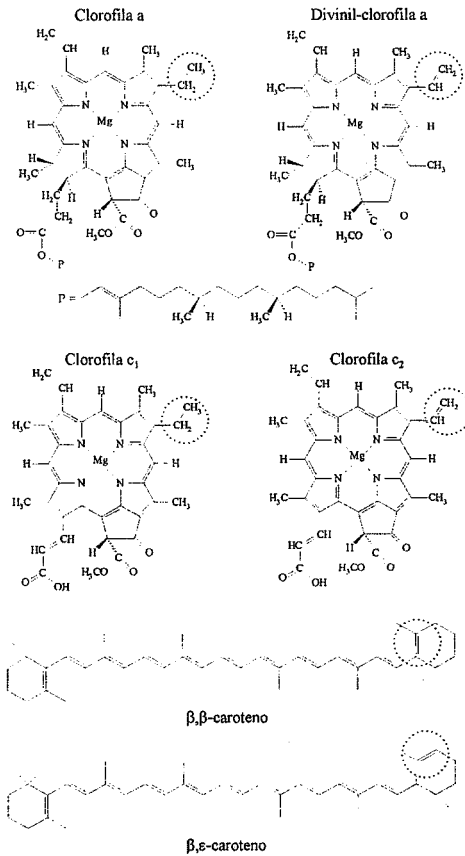


Figura 1.

Esta problemática trajo como consecuencia que se desarrollaran dos tipos de metodologías: las encaminadas a la separación global de los compuestos presentes en extractos pigmentarios de microalgas, aceptando la coelución de varios pigmentos, y aquellas que sacrifican la amplitud del análisis en virtud de la resolución de ciertos grupos críticos.

Con el objetivo de intentar superar simultáneamente ambos problemas, en los últimos años se han aplicado fases estacionarias cuyo uso en cromatografía se hallaba restringido a ciertas aplicaciones especiales. Cabría señalar especialmente dos:

- Las fases de octadecilsílice (ODS) *poliméricas*, cuya capacidad de discriminación por forma molecular les confiere selectividades especiales hacia grupos de pigmentos de polaridad semejante pero estructura tridimensional muy diferente.
- Las fases de octilsílice monomérica, que presentan valores de polaridad y retención adecuados para la separación de compuestos muy similares.

## **HPLC DE PIGMENTOS SOBRE COLUMNAS DE OCTADECILSÍLICE POLIMÉRICA**

Estas fases se obtienen por reacción de la sílice con triclorooctadecilsilano en presencia de agua, de modo que la hidrólisis que se produce da como resultado la formación de silanoles silánicos que pueden a su vez reaccionar con otras moléculas del silano para dar silanopolímeros (Figura 2). El estudio de estas fases por espectroscopía de RMN reveló que estos silanopolímeros se organizan en forma de oligómeros no ramificados que dejan entre sí zonas intersticiales bien delimitadas (Wirth, 1994). De modo intuitivo, estas fases pueden representarse esquemáticamente como una superficie con ranuras (Figura 3) en las cuales los solutos penetrarían durante la retención cromatográfica ("slot model", Sander y Wise, 1990). De este modo, los solutos de forma molecular más plana son capaces de penetrar mayor número de veces o a mayor profundidad en las rendijas disponibles que

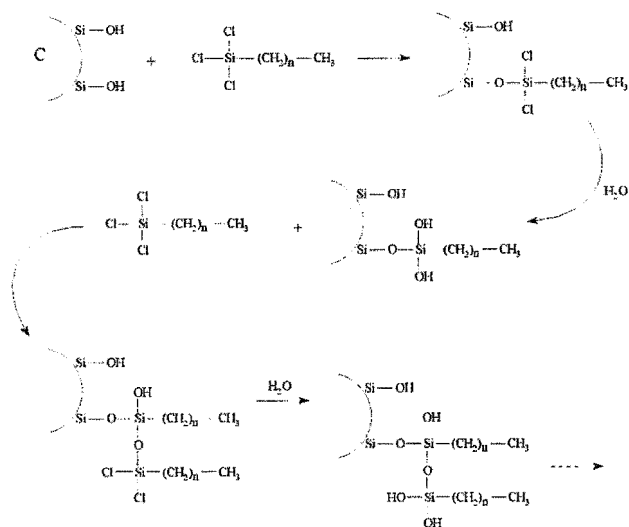


Figura 2.

otros más globulares de similar peso molecular y, por tanto, resultan más retenidos en el proceso cromatográfico. Esta capacidad de discriminación por forma molecular ha permitido recientemente la resolución de pigmentos algales que con anterioridad no habían podido ser separados. Así, la Figura 4 muestra los cromatogramas de extractos pigmentarios de tres microalgas obtenidos empleando una columna ODS polimérica (Columna: Vydac 201 TP 54. Eluyentes: A= Metanol/Acetonitrilo/Piridina acuosa 0.25 M (pH 5) 45/35/20; B= Acetona. Gradiente: de 5 a 60 % de B en 28 min., de 60 a 100 % de B del minuto 28 al 32, isocrático en 100 % de B hasta el minuto 40. Flujo: 1.2 mL.min<sup>-1</sup>. Temperatura de la columna: 27 °C), en los que se aprecia la resolución, entre otros, del par clorofila c<sub>1</sub>-clorofila c<sub>2</sub> y de los carotenoides isómeros luteína y zeaxantina. La resolución de estos compuestos, cuyas diferencias de polaridad son tan pequeñas que no pueden ser separados por las columnas ODS monoméricas, se ha explicado por la diferencia en sus formas

moleculares (Figura 5), considerando el modelo de ranuras (Garrido y Zapata, 1997). Así, por ejemplo, se retiene más la clorofila  $c_2$ , (que por poseer un radical vinilo que se alinea con el macrociclo tetrapirrólico y es más plana) que la clorofila  $c_1$  (que, en una posición análoga presenta un grupo etilo, mucho más voluminoso). Un razonamiento similar puede hacerse para el caso de los carotenoides derivados formalmente del  $\beta$ -caroteno (zeaxantina), que con todos sus dobles enlaces conjugados constituyen estructuras relativamente planas y, por tanto, se retienen más que los correspondientes isómeros derivados del  $\alpha$ -caroteno (luteína), en los que la conjugación se interrumpe en uno de los anillos terminales y resultan mucho más voluminosos (Figuras 1 y 5).

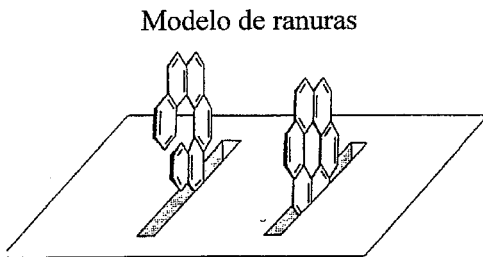


Figura 3.

## **HPLC DE PIGMENTOS SOBRE COLUMNAS DE OCTILSÍLICE MONOMÉRICA**

Las sutiles diferencias de polaridad cromatográfica existentes entre los pares críticos de pigmentos a los que nos hemos venido refiriendo pueden, en cambio, ser la base de su discriminación si se emplean columnas monoméricas de fases ligadas de menor longitud de cadena (octilsílice, OS). Estas fases fueron introducidas en el análisis de pigmentos de microalgas por Goericke y Repeta (1993) para la separación de clorofila a de su correspondiente análogo divinílico.

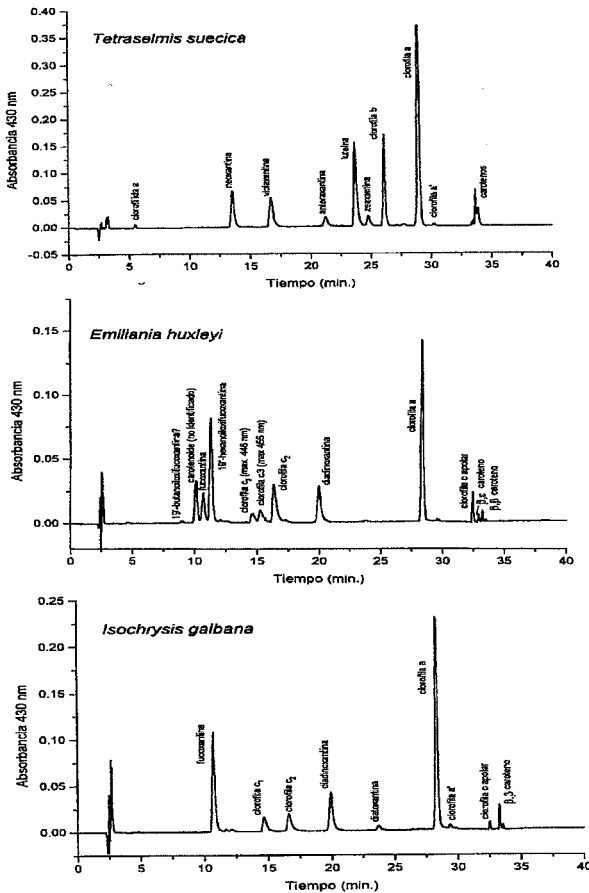


Figura 4.

La capacidad de separación de este tipo de fases cuando se tratan con sistemas de elución adecuados queda de manifiesto en la Figura 6 (Columna: Waters Symmetry C8, 150 x 4.6 mm, 3.5  $\mu$ m. Eluyentes: A= Metanol/Acetato amónico acuoso 1M, 75/25; B= Metanol. Gradiente: lineal de 0 a 100 % de B en 20 min., isocrático en 100 % de B hasta el minuto 30. Flujo: 0.8 mL.min<sup>-1</sup>. Temperatura de la columna: 25 °C). Al contrario de lo que sucede en las ODS poliméricas, la selectividad en estas fases está principalmente controlada por el factor de polaridad. Esto da

Sin embargo, tras la separación de los pigmentos, su identificación inequívoca (en el caso de compuestos conocidos) o su caracterización (en el caso de picos de naturaleza dudosa o desconocida) requiere de un sistema de detección que suministre datos característicos con los que inferir su estructura. La mejor herramienta con la que actualmente se cuenta, y que ha experimentado un espectacular desarrollo en los últimos años, se basa en el acoplamiento (LC/MS) entre cromatografía líquida (LC) y espectrometría de masas (MS).

La espectrometría de masas (MS) resulta especialmente adecuada para el análisis estructural de pigmentos, ya que requiere cantidades muy pequeñas de la sustancia a analizar, puede acoplarse en línea al sistema cromatográfico y suministra información de gran valor analítico: el ion molecular permite estimar el peso molecular del compuesto y los fragmentos obtenidos en las rupturas de la molécula que pueden producirse durante la ionización proporcionan valiosa información sobre su estructura.

## ACOPLAMIENTO LC/MS

El acoplamiento entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas puede considerarse uno de los mayores éxitos de la instrumentación analítica de los últimos años, pues en sus orígenes ambas técnicas parecían completamente incompatibles. Tal aparente incompatibilidad puede deducirse observando la Tabla 1, que compara alguna de las características esenciales de ambas técnicas (Esteban, 1993).

Tabla 1. Comparación entre algunas características básicas de HPLC y MS

HPLC	MS
Opera en fase líquida	Opera en fase gaseosa
Temperaturas de trabajo: 25-50 °C	Temperaturas de trabajo: 100-350 °C
Sin limitación en el tipo de muestra	Deseables muestras volátiles
Sin limitación en pesos moleculares	Pesos moleculares limitados
Puede emplear tampones inorgánicos	No tolera bien tampones no volátiles



De las diferentes interfases desarrolladas para permitir el acoplamiento LC/MS, las más idóneas para el análisis de pigmentos son las que implican etapas de ionización menos energéticas, dada la extrema fragilidad de este tipo de compuestos. Así, son muy adecuadas las que, al tiempo que realizan la introducción de la muestra procedente del cromatógrafo en el espectrómetro de masas, consiguen la ionización suave de la misma. De todas ellas (Esteban, 1993), las más empleadas en el estudio de pigmentos son las de bombardeo con átomos rápidos en modo dinámico y las de ionización a presión atmosférica (Van Breemen, 1997).

## **BOMBARDEO CON ÁTOMOS RÁPIDOS (FAB) EN MODO DINÁMICO**

En la técnica de FAB la muestra se disuelve en un líquido denominado matriz. Este disolvente debe tener un elevado punto de ebullición para que su tensión de vapor, en las condiciones de alto vacío en las que opera un espectrómetro de masas, sea muy baja; además debe ser un buen disolvente para las muestras. En el caso de clorofilas y carotenoides resultan especialmente adecuados 3-nitrobencilalcohol (para espectros en modo positivo) y trietanolamina (modo negativo). Esta disolución se bombardea con un cañón de átomos rápidos de gases nobles (energías de 2 a 10 kV) o de iones de Cs<sup>+</sup> (35 kV), produciéndose la desorción continua de iones característicos de la matriz y de la muestra, normalmente en forma de iones moleculares o pseudomoleculares positivos y negativos. El proceso de ionización de la muestra tiene lugar mediante la acción combinada de mecanismos de transferencia de momento cinético, transferencia de electrones y fragmentación aleatoria.

En su variante FAB dinámico la muestra se introduce en forma líquida hasta la misma fuente iónica del espectrómetro de masas a flujos continuos de 1-20  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , por medio de un capilar inerte de sílice fundida que termina en una cabeza dotada de un material absorbente que retira el exceso de eluyente y matriz. La ionización se produce de forma análoga a lo que sucede en el modo estático. La matriz se debe añadir al

eluyente de cromatografía en una proporción aproximada de un 5%. Muchas veces la adición de la matriz al eluyente no es posible, pues su presencia perjudica a la separación cromatográfica y en este caso debe utilizarse un flujo post-columna de matriz empleando una bomba auxiliar.

La aplicación de esta técnica a clorofilas ha sido estudiada por Van Breemen *et al.* (1991). Tanto las formas fitoladas (clorofilas a y b) como las ácidas (clorofílicas) o sus correspondientes derivados demetalados (feofitinas y feofórbidos) dan intensos iones moleculares protonados  $[M+H]^+$  y fragmentación escasa pero significativa, destacando el fragmento correspondiente a la pérdida de fitol  $[M+H-278]^+$ . Un espectro de masas FAB de clorofila a se muestra en la Figura 7.

### Espectro de masas (FAB) de la clorofila a

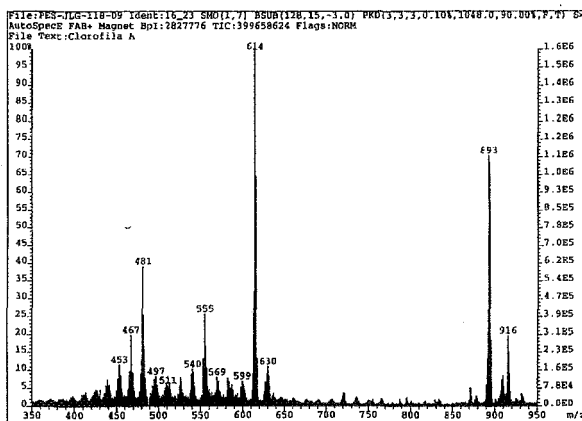


Figura 7.

En el caso de carotenoides (Van Breemen *et al.*, 1993), el espectro FAB continuo prácticamente se circunscribe al ion molecular  $[M]^+$ , que aparece como el correspondiente aducto protonado  $[M+H]^+$  en las xantofilas más oxigenadas. La fragmentación es muy escasa (ruptura de algunos enlaces C-O en xantofilas) o totalmente nula, por lo que esta técnica es extremadamente útil en la determinación de pesos moleculares

de estos pigmentos. Se pueden conseguir fragmentaciones mayores, y en muchos casos muy significativas, empleando espectrometría de masas en tándem (MS-MS), según describen Van Breemen *et al.* (1995). Los límites de detección de esta técnica oscilan entre los 9 y los 28 pmol, dependiendo de la naturaleza del pigmento.

### **INTERFASES A PRESIÓN ATMOSFÉRICA: ELECTROSPRAY (ES) E IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA (APCI).**

Estas interfases, en las que la ionización se produce a presión atmosférica y no a alto vacío, son al mismo tiempo técnicas de ionización y eficaces sistemas de eliminación del disolvente de la muestra, procesos en los que consiguen un altísimo rendimiento por lo que permiten analizar pigmentos en concentraciones muy bajas. Como interfases para HPLC-MS pueden aceptar todo el flujo procedente de un cromatógrafo convencional, hasta 4 mL.min<sup>-1</sup> sin división de flujo, lo que incide muy favorablemente sobre la sensibilidad total del proceso. Son, a buen seguro, las técnicas analíticas que más se van a emplear en la caracterización de pigmentos de microalgas en los próximos años.

Durante el proceso de electrospray se forma una finísima “niebla” de pequeñas gotas cargadas a partir del eluido de HPLC a presión atmosférica. Esto se consigue nebulizando el eluyente, a la salida de la columna, haciéndolo pasar a través de un electrodo capilar a elevados potenciales (2000-7000 V). Las gotas así formadas son atraídas electrostáticamente hacia la entrada del espectrómetro de masas y en su trayecto encuentran una cortina de gas nitrógeno caliente que promueve la evaporación del eluyente. Cuando las gotas se reducen hasta que la repulsión electrostática entre las moléculas cargadas es mayor que la combinación de la energía de solvatación y la tensión superficial, los iones salen expulsados de las gotas o bien éstas estallan, liberando los iones de los analitos, que entran en el espectrómetro de masas.

La técnica de electrospray se ha empleado sobre todo en el análisis de carotenoides (Van Breemen, 1995). Se ha observado que estos

pigmentos producen cationes moleculares  $[M]^+$  muy abundantes, con fragmentación prácticamente nula y no producen aniones moleculares, por lo que su análisis queda restringido al modo positivo. Los límites de detección (1-2 pmol) son los más bajos que se consiguen con técnicas mixtas LC-MS (Van Breemen, 1997). La técnica resulta excelente para la determinación de pesos moleculares, pero si lo que se desea es una mayor información estructural debe recurrirse a técnicas mixtas, como acoplamiento espectrometría de masas-espectrometría de masas en tándem (MS-MS), que permitan la fragmentación de las moléculas en estudio.

La técnica de ionización química a presión atmosférica (APCI) utiliza un nebulizador térmico en lugar de un fuerte campo electromagnético para facilitar la evaporación del eluyente y conseguir un fino nebulizado a partir de la fase móvil. La ionización tiene lugar aplicando al nebulizado una descarga en corona que da lugar a numerosas especies reactivas, con especial abundancia de aquellos iones en fase gaseosa procedentes de los eluyentes que finalmente dan lugar a la ionización química de los componentes de la muestra en una serie de procesos entre los que predominan los de transferencia de protones. Los iones son electrostáticamente atraídos al interior del analizador de masas, atravesando en su recorrido una cortina de nitrógeno caliente que elimina gran parte del disolvente y evita que moléculas sin carga puedan entrar en el espectrómetro.

La aplicación de la técnica APCI a pigmentos fotosintéticos produce iones moleculares positivos  $[M]^+$  o negativos  $[M]^-$  con carotenos eluidos con disolventes apolares (metil-tert-butil éter) o mayoritariamente, como se esperaría de la naturaleza de los fenómenos que intervienen en la ionización, sus correspondientes formas protonadas  $[M+H]^+$  o deprotonadas  $[M-H]^-$ , especialmente si la elución se realiza con alcoholes. La fragmentación también depende del tipo de moléculas analizadas, oscilando desde muy bajos grados de ruptura para los carotenos hasta fragmentaciones medias con clorofilas o incluso moderadas en el caso de las xantofilas más oxigenadas (Van Breemen *et al.*, 1996; Garrido y

Zapata, 1998). Los límites de detección de esta técnica son también muy bajos, entre 1 y 13 pmol (Van Breemen, 1997).

Espectro de masas y esquema de fragmentación de fucoxantina

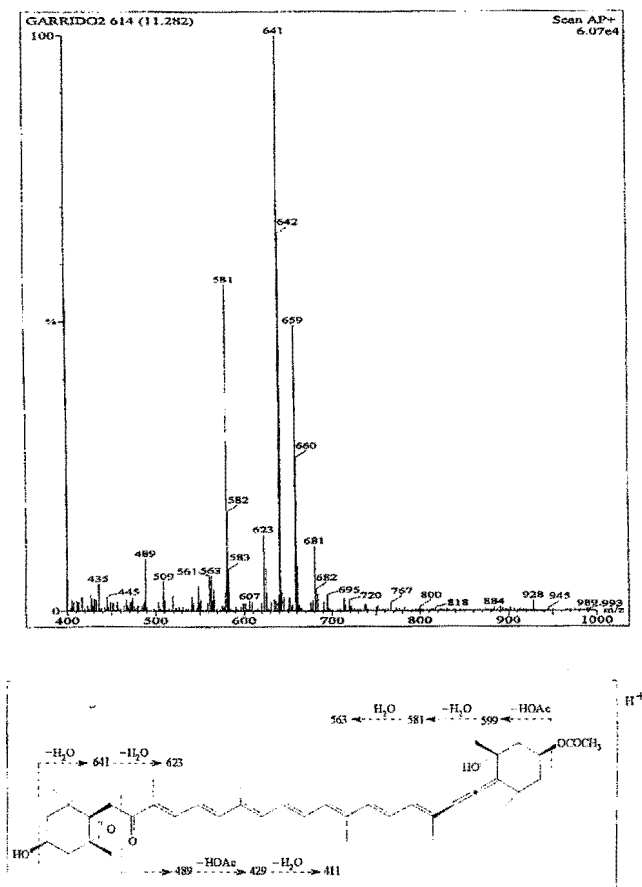


Figura 8.

En el caso de pigmentos de origen algal, esta interfase se ha aplicado al estudio de clorofilas y sus productos de degradación en sedimentos

marinos (Harris *et al.*, 1995). La primera aplicación a pigmentos de microalgas (Garrido y Zapata, 1998) ha demostrado la utilidad de la técnica en la elucidación estructural de xantofilas (Figura 8), cuyos espectros proporcionan buenas señales para los aductos protonados del ion molecular al tiempo que contienen fragmentos indicativos de la presencia de diferentes grupos funcionales.

Ambas técnicas de ionización a presión atmosférica son complementarias en el análisis de pigmentos y están llamadas a convertirse en sistemas de rutina en el análisis de clorofilas y carotenoides de microalgas, especialmente si tenemos en cuenta la gran oferta que ya existe en el mercado de equipos que incorporan ambas interfases y permiten el cambio de una a otra de forma cómoda y sencilla.

Es de esperar que el futuro nos traiga mejoras en estos sistemas, especialmente en cuanto hace referencia a los analizadores de masa, campo en el que no sería extraño presenciar la sustitución de los actuales cuadrupolos por sistemas de tiempo de vuelo o de trampa iónica.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Esteban, L. (1993) "La espectrometría de masas en imágenes". ACK Editores, Madrid.
- Garrido, J.L.; Zapata, M. (1997) *Chromatographia* 44, 43-49.
- Garrido, J.L.; Zapata, M. (1998) *J. Phycol.* 34, 70-78.
- Goericke, R., Repeta, D. (1993) *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101, 307-313.
- Harris, P.G., Carter, J.F., Head, R.N., Harris, R.P., Eglinton, G., Maxwell, J.R. (1995) *Rapid Comm. Mass Spec.* 9, 1177-1183.
- Hynninen, P.H. (1991) en "Chlorophylls". H. Scheer, editor. CRC Press, Boca Raton. pp: 146-209.
- Jeffrey, S.W. (1980) en "Primary productivity in the sea". P.G. Falkowski. Plenum Press, New York. pp: 33-58.

- Millie, D.F., Paerl, H.W., Hurley, J.P. (1993) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 2513-2527.
- Rodríguez, F., Zapata, M., Garrido, J.L. (1998) *Chromatographia* 48, 677-680.
- Sander, L.C., Wise, S.A. (1990) *LC-GC* 8, 378-390.
- Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S. (1995) en "Carotenoids. Vol. 1 A". G. Britton, S. Liaaen-Jensen & H. Pfander, editores. Birkhäuser Verlag, Basel. pp: 81-108.
- Van Breemen, R. B. (1995) *Anal. Chem.* 67, 2004-2009.
- Van Breemen, R. B. (1997) *Pure Appl. Chem.* 69, 2061-2066.
- Van Breemen, R. B., Canjura, F.L., Schwartz, S.J. (1991) *J. Chromatogr.* 542, 373-383.
- Van Breemen, R. B., Huang, C.R., Tan, Y., Sander, L.C. Schilling, A.B. (1996) *J. Mass Spec.* 31, 975-981.
- Van Breemen, R. B., Schmitz, H.H., Schwartz, S.J. (1993) *Anal. Chem.* 65, 965-969.
- Van Breemen, R. B., Schmitz, H.H., Schwartz, S.J. (1995) *J. Agric Food Chem.* 43, 384-389.
- Wirth, M.J. (1994) *LC-GC* 7, 626-630.