

Extraction optimization prior to HPLC analysis for phytoplankton pigments

Bárbara Abaroa-Pérez¹, Daura Vega-Moreno¹, J.J. Hernández-Brito², O. Llinás²

¹ Technologies, Management and Environmental Biogeochemistry. University of Las Palmas de Gran Canaria

² Oceanic Platform of the Canary Islands (PLOCAN)

RESUMEN

La extracción de pigmentos del fitoplancton marino es una técnica frecuentemente usada para la determinación de los principales grupos presentes mediante el uso de técnicas analíticas. La determinación de estos compuestos (carotenoides y clorofilas) se hace principalmente por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección UV-visible y fluorescencia, con diversos métodos publicados al respecto. Pero la extracción previa necesaria para su determinación es un paso poco estudiado que requiere ser optimizado. En este trabajo se analizan diversos factores que afectan al proceso de extracción, usando como técnica principal la microsonda ultrasonido, validando el método con muestras de cultivo y muestras reales recolectadas a diferentes profundidades.

INTRODUCCIÓN

Para la extracción y determinación de carotenoides y clorofilas del fitoplancton las técnicas más usadas son la extracción por ultrasonidos y la determinación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección UV-visible y fluorescencia [1].

Son diversos los estudios publicados donde se realiza una optimización de la determinación por HPLC-UV-visible [2, 3], variando en cada método las condiciones cromatográficas, y el número de carotenoides secundarios que pueden ser detectados según las limitaciones de cada método. En cualquier caso todos los métodos publicados permiten la determinación de las clorofilas y los principales carotenoides. El método de detección aceptado por el *Joint Global Ocean Flux Studies* (JGOFS) publicado por S. Wright ha sido uno de los más utilizados [4].

En zonas eutróficas el procedimiento de extracción de los pigmentos no es un paso crítico, porque pequeños porcentaje de recuperación de compuestos son suficientes para obtener buenas señales cromatográficas, pero en zonas oligotróficas este paso puede ser determinante para la obtención de resultados concluyentes.

Los volúmenes de agua de mar recolectados para la determinación de pigmentos fitoplanctónicos, varían entre 0.5 y 4 litros en función de la concentración esperada de fitoplancton en las mismas [5, 6]. Pero no siempre es suficiente con recolectar un volumen de muestra mayor, o no siempre es posible disponer de un volumen de muestra tan elevado, por eso es importante para zonas oligotróficas, optimizar el procedimiento de extracción de estos compuestos para maximizar su recuperación,

aumentando su señal cromatográfica a la vez que se disminuye el ruido por interferencias con la matriz o productos de degradación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras se recolectaron en botellas Niskin para muestras reales y en cultivos controlados del género *Nichia* y *Phaeodactylum* (Banco Español de Algas, BEA). Los cultivos artificiales fueron necesarios para la obtención de muestras idénticas que permitieran el estudio analítico y la optimización de parámetros de forma reproducible. Los filtros utilizados para su recuperación y concentración fueron Whatman GF/F de 47 mm de diámetro, y los pigmentos se extrajeron a través de una sonda ultrasonidos con metanol (Panreac[®]), con clarificación posterior de los extractos por centrifugación y filtración.

Los extractos se analizaron por HPLC siguiendo la metodología de Wright *et al.*, 1991 [4], con una columna cromatográfica Waters[®] Spherisorb 5 µm ODS2 4.6x250 mm C18. Los carotenoides se analizaron a 440 nm para el detector UV-visible y las clorofilas a 436 nm de excitación y 680 nm de emisión con el detector de fluorescencia. Para la determinación de concentraciones individuales de cada compuesto se utilizaron estándares de clorofila *a* y clorofila *b* obtenidos en Sigma-Aldrich[®], y los estándares de los carotenoides se obtuvieron en el DHI Institute for Water and Environment (Denmark).

La sonda ultrasonido utilizada fue Branson Digital Sonifier, modelo 450, con el accesorio de micropunta

instalado para la extracción en viales y tubos de ensayo de pequeño volumen. En nuestro caso la extracción se llevó a cabo en tubos cónicos de 10 mL de volumen total con rosca, para su posterior centrifugación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La optimización del procedimiento de extracción consistió como primer paso en la obtención de sesenta filtros idénticos con la misma concentración y tipo de fitoplancton procedente de cultivos marinos, para poder disponer de muestras reproducibles que permitieran hacer el estudio de la optimización de los parámetros de extracción. Los parámetros optimizados en el estudio fueron:

1. Secado previo de la muestra.
2. Trozado del filtro Whatman GF/F previo a la extracción.
3. Volumen de extractante añadido (metanol puro y refrigerado).
4. Amplitud y tiempo de extracción mediante microsonda ultrasónica.
5. Extracción en un solo paso, o en varios pasos consecutivos con tiempos de reposo intercalados.
6. Estudio del enfriamiento de la muestra en los tiempos de reposo durante la extracción para minimizar la pérdida por degradación.
7. Centrifugación y clarificación de la muestra.
8. Filtrado previo a la determinación por HPLC-UV-visible y fluorescencia.

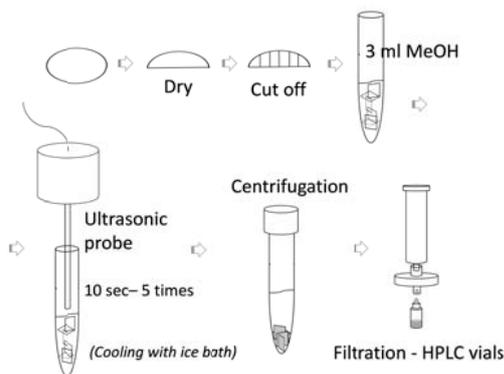


Fig. 1. Resumen del proceso de extracción

AGRADECIMIENTOS

Parte del material utilizado en este estudio ha sido cofinanciado con fondos FEDER en el contexto del proyecto PCMA –Programa de observación y control medio ambiental de la concentración de dispositivos de generación eléctrica en el banco de ensayos de PLOCAN (POTEMA).

REFERENCIAS

- 1 - D. V. Moreno, J. P. Marrero, J. Morales, C. L. García, M. G. V. Úbeda, M. J. Rueda, and O. Llinás, "Phytoplankton functional community structure in Argentinian continental shelf determined by HPLC pigment signatures," *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, vol. 100, pp. 72–81, Mar. 2012.
- 2 - M. Zapata, S. W. Jeffrey, S. W. Wright, F. Rodríguez, J. L. Garrido, and L. Clementson, "Photosynthetic pigments in 37 species (65 strains) of Haptophyta: Implications for oceanography and chemotaxonomy," *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 270, pp. 83–102, 2004.
- 3 - S. W. Wright and S. W. Jeffrey, "Pigment markers for phytoplankton production," *Handb. Environ. Chem. Vol. 2 React. Process.*, vol. 2 N, no. September 2005, pp. 71–104, 2006.
- 4 - S. W. Wright, "Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton," *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 77, no. 2–3, pp. 183–196, 1991.
- 5 - D. V. Moreno, J. P. Marrero, J. Morales, C. L. García, V. M. G. Úbeda, M. J. Rueda, and O. Llinás, "Phytoplankton functional community structure in Argentinian continental shelf determined by HPLC pigment signatures," *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, vol. 100, pp. 72–81, 2012.
- 6 - J. Aiken, Y. Pradhan, R. Barlow, S. Lavender, A. Poulton, P. Holligan, and N. Hardman-Mountford, "Phytoplankton pigments and functional types in the Atlantic Ocean: A decadal assessment, 1995-2005," *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 56, no. 15, pp. 899–917, 2009.