
Aspectes particulars de l'anàlisi de pigments en mostres de sediment

Introducció

Des de la dècada dels 80 l'anàlisi per HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ha esdevingut el mètode més utilitzat per a la determinació ràpida i quantitativa del contingut de carotenoides, clorofil·les i derivats en ecosistemes aquàtics i els seus sediments (revisat per Millie *et al.*, 1993; Pfander i Riesen, 1995; Jeffrey *et al.*, 1999). Abans de la introducció de les tècniques cromatogràfiques se separaven carotens de xantofil·les per partició de fase, donat que tenen polaritats diferents, i llavors es mesurava l'absorbància per espectrofotometria (Fox, 1944; Fogg i Belcher, 1961; Gorham i Sanger, 1975) o fluorometria. La introducció de la cromatografia sobre paper (Daley *et al.*, 1977; Brown *et al.*, 1977), de la cromatografia de capa fina (TLC) (Daley *et al.*, 1977; Griffiths, 1978; Züllig, 1981; Brown *et al.*, 1984) i sobretot de l'HPLC (p.e. Abaychi i Riley, 1979; Repeta i Gagosian, 1982; Mantoura i Llewellyn, 1983; Leavitt, 1988; Leavitt *et al.*, 1989; Hurley i Armstrong, 1990; Leavitt i Carpenter, 1990) va permetre resoldre un creixent nombre de pigments, especialment de xantofil·les.

Els avantatges que presenta la tècnica de l'HPLC respecte les tècniques abans esmentades no són gens menyspreables. En primer lloc, respecte l'espectrofotometria i la fluorometria, l'HPLC permet la separació física d'un gran nombre de xantofil·les i carotens amb informació taxonòmica molt útil (pigments marcadors), i permet una més acurada quantificació de les clorofil·les donat que aquestes es distingeixen dels seus productes de degradació i poden ser quantificades a part. En segon lloc, i respecte les altres tècniques cromatogràfiques i en particular respecte la TLC, l'HPLC ofereix una major reproduïbilitat i és més indicada per analitzar un gran nombre de mostres. La TLC, en canvi, és la tècnica triada pels especialistes que necessiten aïllar quantitats importants de pigment per diferents aplicacions com ara la preparació d'estàndards o determinacions estructurals.

La selecció d'un sistema cromatogràfic per analitzar pigments en mostres de sediment passa per considerar que els cromatogrames obtinguts a partir d'aquest tipus de mostres sovint contenen de dues a cinc vegades més pics que els de mostres que provenen de la columna d'aigua. Això implica que el grau de solapament entre pics pot ser alt i que per obtenir separacions reproduïbles és necessari optimitzar el mètode per aquest tipus de mostres. La separació cromatogràfica depèn del tipus de fase estacionària, és a dir, el ti-

pus de rebliment intern de la columna cromatogràfica que s'utilitzi, i del tipus de fase mòbil que es basa en la combinació de dissolvents i en el gradient d'elució programat. Per altra banda, previ a la separació cromatogràfica, l'elecció d'un protocol d'extracció de carotenoides i clorofil·les depèn tan de les característiques de la matriu de sediment com del poder d'extracció del dissolvent i de les propietats i quantitats relatives dels pigments presents (Liaaen-Jensen, 1971; Schiedt i Liaaen-Jensen, 1995).

L'objectiu en aquest capítol era optimitzar una metodologia d'anàlisi. En primer lloc es van abordar aquells aspectes relacionats amb l'extracció dels pigments de la matriu de sediment: (i) es va avaluar la capacitat d'extracció que presentaven diferents dissolvents amb diferent grau de penetració combinada amb la utilització o no de tècniques disruptives amb l'objectiu de trobar aquella combinació amb millors resultats sobre mostres de sediment i (ii) es va estudiar l'efecte que tenia sobre la resolució i quantificació de pigments el fet de treballar a partir de sediment fresc o de fer-ho a partir de sediment liofilitzat. En segon lloc es van abordar aquells aspectes relacionats amb l'optimització del funcionament del sistema cromatogràfic: (i) seleccionar el tipus de fase estacionària o columna cromatogràfica i (ii) seleccionar el tipus de fase mòbil que es basa en la combinació de dissolvents i en el gradient d'elució programat.

L'extracció de pigments en mostres de sediment

No existeix un mètode d'extracció de pigments aplicable universalment. Resulta difícil generalitzar quan els pigments que volem extractar pertanyen a fitoplàncton amb una composició prou variada d'espècies. En cèl·lules vives de fitoplàncton marí amb una presència important de diatomees, primnesiòfits o dinoflagel·lades nues, l'acetona o el metanol són suficients per completar l'extracció de pigments. Això és així sempre que les mostres siguin analitzades per espectrofotometria, tècnica que no distingeix entre les clorofil·les i els seus productes d'alteració (alòmers, epímers, feofitines i feofòrbids). En canvi, en el cas de pigments que provenen de fitoplàncton d'aigua dolça, molts autors suggereixen la utilització de dissolvents amb un major poder de penetració com ara el dimetil-sulfòxid (DMSO) o la dimetil-formamida (DMF) (Jeffrey *et al.*, 1997 i referències incloses). Així doncs, per què no utilitzar per defecte el dissolvent amb major poder de penetració? En principi hi ha altres paràmetres a considerar alhora de triar el dissolvent a banda de l'extractabilitat com ara: (i) que els pigments siguin extractats sense generar productes de degradació o d'alteració i que siguin estables en el dissolvent almenys durant un dia per permetre reinjeccions de la mostra; (ii) que els dissolvents utilitzats siguin compatibles amb el sistema cromatogràfic; (iii) la precisió en les rèpliques; (iv) la simplicitat, per facilitar l'anàlisi de moltes mostres de manera ràpida, i finalment (v) la utilització preferent de dissolvents de baixa toxicitat i poc inflamables.

Quan els pigments que es volen extractar es troben dins una estructura cel·lular, el dissolvent ha de travessar la paret cel·lular de l'alga i llavors solubilitzar els lípids i lipoproteïnes de les membranes del cloroplast en una matriu aquosa. L'eficiència de l'extracció depèn tan de l'existència d'una bona interacció directa entre dissolvent i pigment com de

la resistència de la paret que s'ha vist és diferent segons els tipus cel·lulars. Moltes algues són difícils d'extractar com ara dinoflagel·lades amb cuirassa, diatomees bentòniques molt silicificades, cianobacteris, i algunes algues verdes de paret cel·lular engruixida (Porra, 1991). Així doncs per escollir un dissolvent és important tenir en compte tant la capacitat de penetració i les propietats de dissolució del dissolvent com el temps d'exposició al dissolvent o la utilització de tècniques disruptives que permetin el trencament d'estructures facilitant el contacte del dissolvent amb els pigments.

Avaluació de la capacitat d'extracció de diferents dissolvents en combinació amb tècniques disruptives

Les principals fonts de pigments en llacs inclouen comunitats algals planctòniques i bentòniques (Carpenter *et al.*, 1986; Steinman *et al.*, 1998), poblacions bacterianes fototròfiques (Yacobi *et al.*, 1990; Hurley i Garrison, 1993; Villanueva *et al.*, 1994) i plantes vasculares aquàtiques o macròfits (Bianchi *et al.*, 1993). A més a més l'aigua i els sediments contenen pigments associats amb material detrític. Donada l'aparent complexitat de la matriu de sediment, es va plantejar un estudi comparatiu que permetés avaluar la capacitat d'extracció que presentaven diferents dissolvents amb diferent grau de penetració, combinada amb la utilització o no de tècniques disruptives, amb l'objectiu de trobar aquella combinació amb millors resultats per aquest tipus de mostres.

Material i mètodes

Els dissolvents escollits van ser: el metanol al 90% (M), l'acetona al 90% (A), el dimetil-sulfòxid al 100% (D) i una barreja de dimetil-sulfòxid amb acetona a parts iguals (DA).

La tècnica disruptiva que es va utilitzar fou l'aplicació d'ultrasons mitjançant un Sonopuls GM70 equipat amb una sonda de 4 mm de diàmetre que s'introduïa directament en el dissolvent. Es va anomenar extracció activa (SS) quan el material era ultrasonicat fins a 2 minuts. El dissolvent s'afegia en dues etapes. Primer se n'afegien 2 mL i llavors es sonicava durant 40 segons mantenint el tub que contenia la mostra submergit en aigua i gel per compensar l'escalfament que es produïa i també minimitzar l'evaporació de dissolvent. Després se centrifugava a 3000 rpm durant 4 minuts i se separava el sobrenedant posant-lo en un tub a part. Llavors s'afegien altre cop 2 mL de dissolvent al tub amb el sediment i se sonicava durant uns altres 40 segons. Finalment es barrejaven els 4 mL i es tornava a sonicar durant 40 segons més, la mostra era centrifugada novament i l'extracte separat per a ser analitzat en l'HPLC immediatament. En l'extracció passiva (NO) la mostra no era sonicada i es deixava que el dissolvent actués durant 12 hores a 4 °C i a les fosques abans d'analitzar la mostra per HPLC. Només en el cas del DMSO això va ser diferent i es va deixar també a les fosques i durant 12 hores però a uns 18 °C ja que l'extracte quedava cristal·litzat pràcticament a temperatura ambient. Finalment, l'extracció mixta (SO) combinava les dues anteriors. Aquest darrer protocol ens hauria de servir per comprovar si se sumaven els efectes dels dos anteriors i s'obtenia més senyal o si per contra

existia una degradació de determinats pigments després de mantenir la mostra amb el dissolvent 12 hores a 4 °C i a les fosques i havent-li aplicat ultrasons.

L'extracció dels pigments es va realitzar a partir de sediment liofilitzat per reduir al màxim la quantitat d'aigua durant el procés i minimitzar així la formació de determinats productes d'alteració de les clorofil·les. L'extracte sempre era filtrat a través d'un filtre de membrana Anodisc de 0.1 µm (Ø = 25 mm) abans d'injectar-ne un volum conegut a l'HPLC. En el sistema cromatogràfic es va utilitzar la fase mòbil del mètode de Kraay *et al.* (1992) amb algunes modificacions en el gradient i flux d'eluent (taula de la figura 2.1) i una columna NovaPakC18 (Taula 1.1). El funcionament d'aquesta fase mòbil en mostres de sediment ja havia estat comparat amb el d'altres fases en un estudi previ i havia donat resultats satisfactoris (dades no publicades). El volum de mostra injectat era de 20 µL. Les concentracions de pigment es van expressar en µg de pigment per g de pes sec de sediment (µg g⁻¹). Es van preparar quatre rèpliques per a cada combinació i per tant es van analitzar un total de 48 mostres.

Resultats

La resolució de pics en els cromatogrames era lleugerament superior en utilitzar metanol i acetona 90% que no amb el DMSO o el DMSO en combinació amb l'acetona (Figures de la 2.1 a la 2.4). En els dos darrers casos, els pics eren més baixos i més eixamplats de la base. En general, els pics de la primera meitat del cromatograma on eluïen les xantofil·les més polars (mixoxantofil·la, al·loxantina i zeaxantina) van ser els més problemàtics pel que fa a la resolució i això en dificultava la integració. La composició de pics i els temps de retenció d'aquests es va conservar entre dissolvents. Hi va haver però algunes excepcions. Pel que fa referència a xantofil·les, la fucoxantina (5) presentava problemes de resolució en utilitzar acetona, l'astaxantina (9z) no era detectada en utilitzar DMSO i l'oscil·laxantina (8) només apareixia en els cromatogrames en què s'havia utilitzat metanol 90% o DMSO sense combinar amb acetona com a dissolvent. Respecte els pigments clorofil·lics, en utilitzar DMSO es formaven feofòrbids (1a, 1b).

Un pic no identificat amb codi Ph18_6 que eluïa just abans de la Chl-a va aparèixer en tots els cromatogrames llevat d'aquells en què les extraccions havien estat fetes amb metanol 90 %. Aquest pic apareixia millor resolt en el grup de mostres que havien estat durant 12 hores a 4 °C i en la foscor abans de ser analitzades (SO i NO) mentre que en les mostres analitzades immediatament després de ser sonicades es trobava més solapat amb la Chl-a. En els 10 pics que es varen quantificar es va veure que les diferències en la concentració de pigment eren més significatives en general entre dissolvents (ANOVA $p < 0.001$) que entre protocols excepte per l'equinenona (21), la Chl-a (19), la Chl-b (13) i la feofitina b2 (26) pels que eren significatives tant les diferències entre dissolvents com entre protocols (Taula 2.1).

2. ANÀLISI DE PIGMENTS EN MOSTRES DE SEDIMENT

Taula 2.1. Resultats de l'ANOVA de 2 factors amb replicació de mostres efectuada pels valors obtinguts en els diferents protocols d'extracció.

Codi	Nom pigment	Entre dissolvents		Entre protocols		Interacció	
		F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
17d	mixoxantofil·la	18.756	<< 0,001	0.374	ns	1.488	ns
18	al·loxantina	22.973	<< 0,001	2.434	ns	1.191	ns
11+12	luteïna+zeaxantina	9.326	<< 0,001	0.008	ns	0.923	ns
16P	cantaxantina(-like)	34.151	<< 0,001	0.705	ns	1.825	ns
13	Chl-b	29.860	<< 0,001	7.843	< 0,005	4.188	< 0,005
19	Chl-a	32.422	<< 0,001	7.287	< 0,005	0.701	ns
21	equinenona	21.952	<< 0,001	3.849	< 0,05	0.884	ns
26	feofitina b2	58.501	<< 0,001	3.513	< 0,05	17.239	<< 0,001
25	feofitina a1	12.227	<< 0,001	0.889	ns	3.095	< 0,05
25a	β,β-carotè	27.688	<< 0,001	1.790	ns	0.990	ns

F=F-Fisher, *p*=probabilitat, ns=no significatiu.

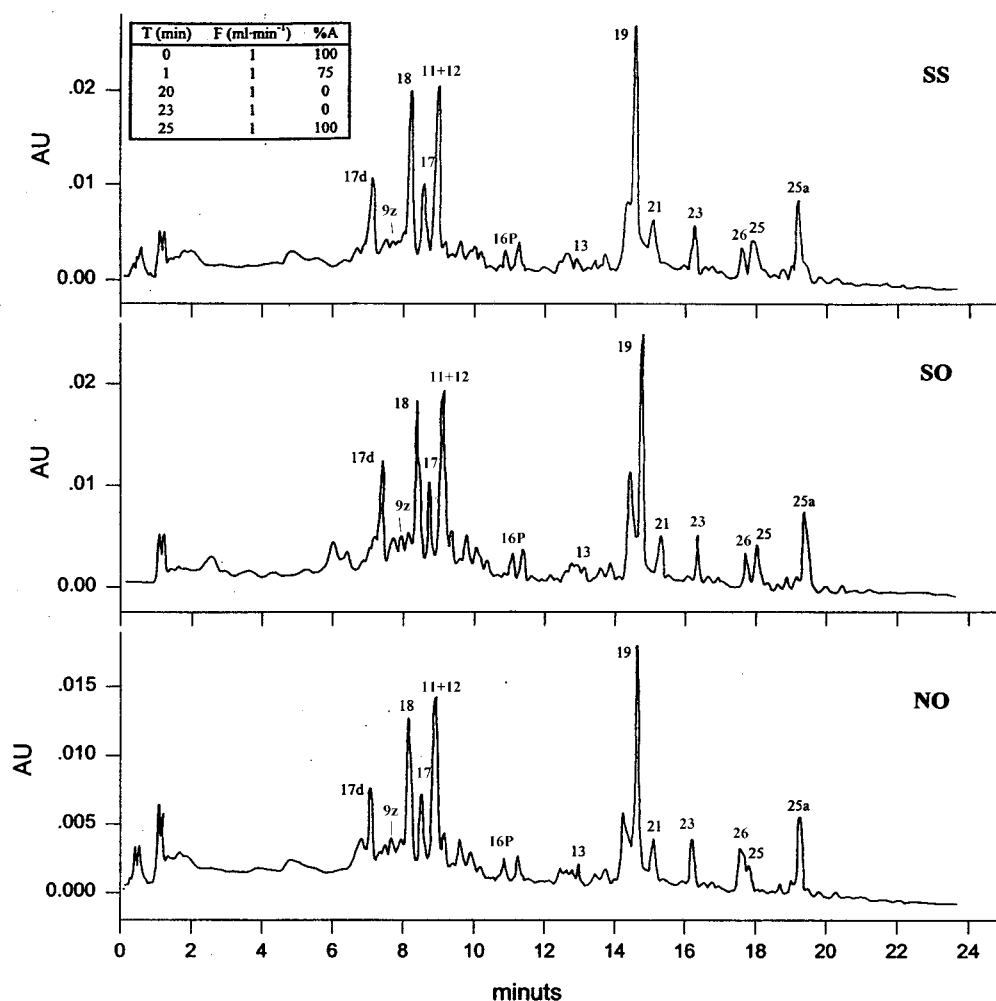


Figura 2.1. Cromatogrames (440 nm) obtinguts utilitzant acetona 90% seguint tres protocols diferents: sonicant la mostra i analitzant l'extracte per HPLC immediatament (SS), sonicant la mostra per després mantenir-la 12 h a 4 °C abans d'analitzar-la (SO), sense sonicar la mostra i mantenint-la 12h a 4 °C abans d'analitzar-la (NO). Els pigments identificats corresponen a: fucoxantina (5), mixoxantofil·la (17d), astaxantina (9z), al·loxantina (18), diatoxantina (17), luteïna+zeaxantina (11+12), cantaxantina(-like) (16P), Chl-b (13), Chl-a (19), equinenona (21), feofitina b1 (23), feofitina b2 (26), feofitina a1 (25), β,β -carotè (25a).

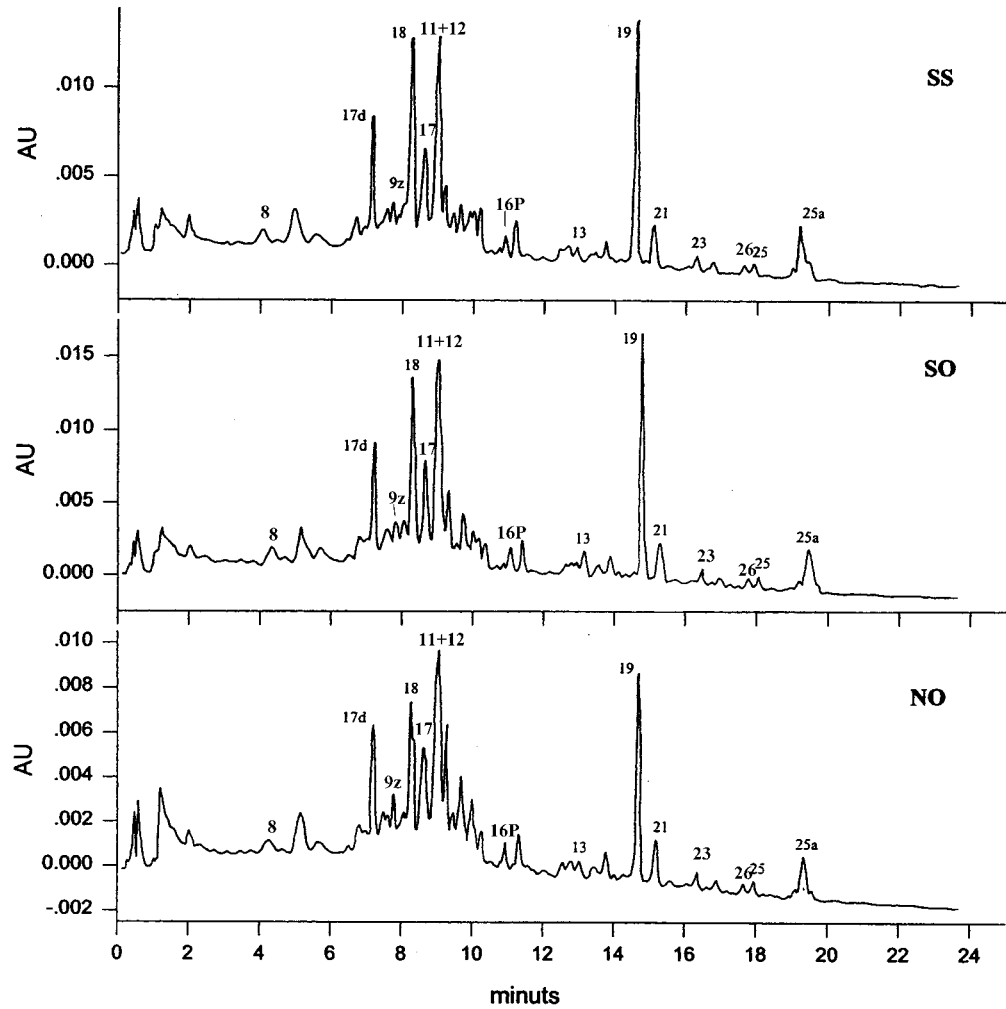


Figura 2.2. Cromatogrames (440 nm) obtinguts utilitzant metanol 90% seguint tres protocols diferents: sonicant la mostra i analitzant l'extracte per HPLC immediatament (SS), sonicant la mostra per després mantenir-la 12 h a 4 °C abans d'analitzar-la (SO), sense sonicar la mostra i mantenint-la 12h a 4 °C abans d'analitzar-la (NO). Als pigments de la figura 2.1 cal afegir oscil·laxantina (8).

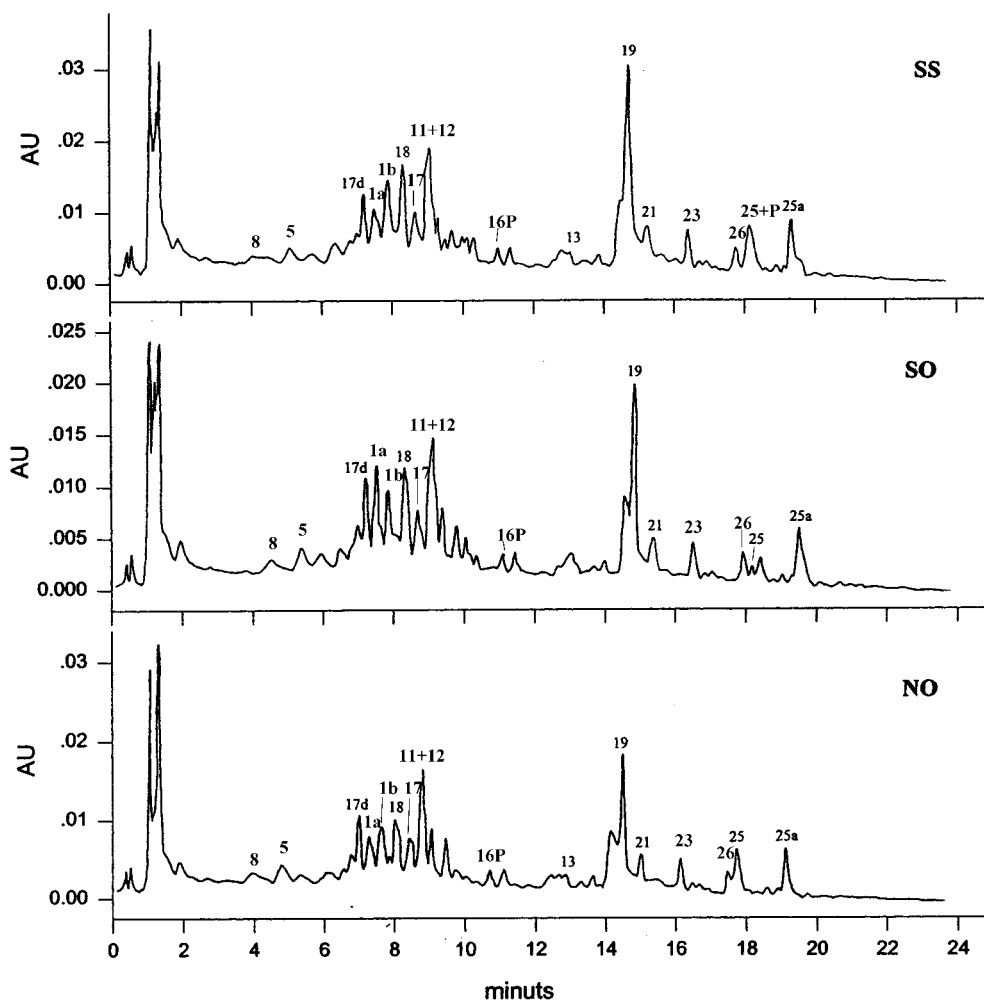


Figura 2.3. Cromatogrames (440 nm) obtinguts utilitzant DMSO seguint tres protocols diferents: sonicant la mostra i analitzant l'extracte per HPLC immediatament (SS), sonicant la mostra per després mantenir-la 12 h a 4 °C abans d'analitzar-la (SO), sense sonicar la mostra i mantenint-la 12h a 4 °C abans d'analitzar-la (NO). Als pigments de la figura 2.1 i 2.2 cal afegir feofòrbid a (1a) i feofòrbid a2 (1b).

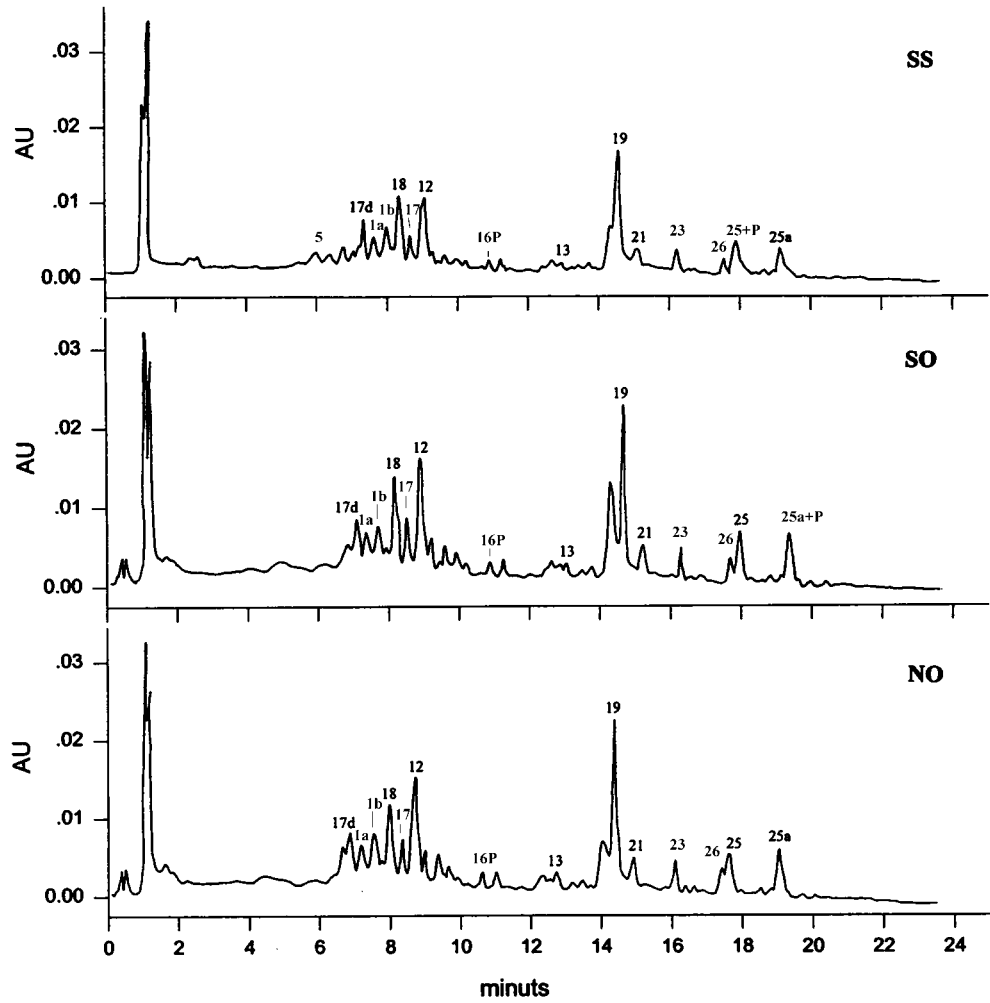


Figura 2.4. Cromatogrames obtinguts utilitzant DMSO/Acetona seguint tres protocols diferents: sonicant la mostra i analitzant l'extracte per HPLC immediatament (SS), sonicant la mostra per després mantenir-la 12 h a 4 °C abans d'analitzar-la (SO), sense sonicar la mostra i mantenint-la 12h a 4 °C abans d'analitzar-la (NO).

El metanol al 90% (M) va ser el dissolvent amb menor capacitat d'extracció (Figura 2.5 i 2.6) sobretot pels pigments més apolars com ara el β,β -carotè (25a), les feofitines a i b (23, 26, 25), l'equinenona (21), i la Chl-a (19) on les diferències amb els altres dissolvents eren superiors. En canvi, era el que conservava millor els temps de retenció entre protocols. L'acetona al 90% (A), presentava molt bons resultats sobretot per a les xantofil·les, i uns resultats més equiparables als obtinguts amb D i DA per a la resta de pigments. Amb el dimetilsulfòxid (D) i la combinació d'aquest amb acetona (DA), si bé s'obtenien valors superiors que utilitzant metanol, aquests quedaven per sota els obtinguts amb l'acetona, llevat del pic corresponent a la feofitina a1 on, tant l'extracció realitzada amb D com la realitzada amb DA, eren superiors a les realitzades amb A, i en els pics que corresponien a la feofitina b2, Chl-a i Chl-b, on la combinació de DA donava resultats molt similars.

L'extracció activa (SS) era el protocol que donava concentracions de pigment superiors quan s'utilitzava A, D o DA com a dissolvent, això era així per tots els pigments exceptuant la cantaxantina(-like) (16P). En canvi quan s'utilitzava M el protocol SS oferia millors resultats que els altres dos en la meitat dels pigments (17d, 18, 11+12, 21 i 19), per l'altra meitat (16P, 25a, 25, 13 i 26) era l'extracció mixta (SO) el protocol que oferia millors resultats.

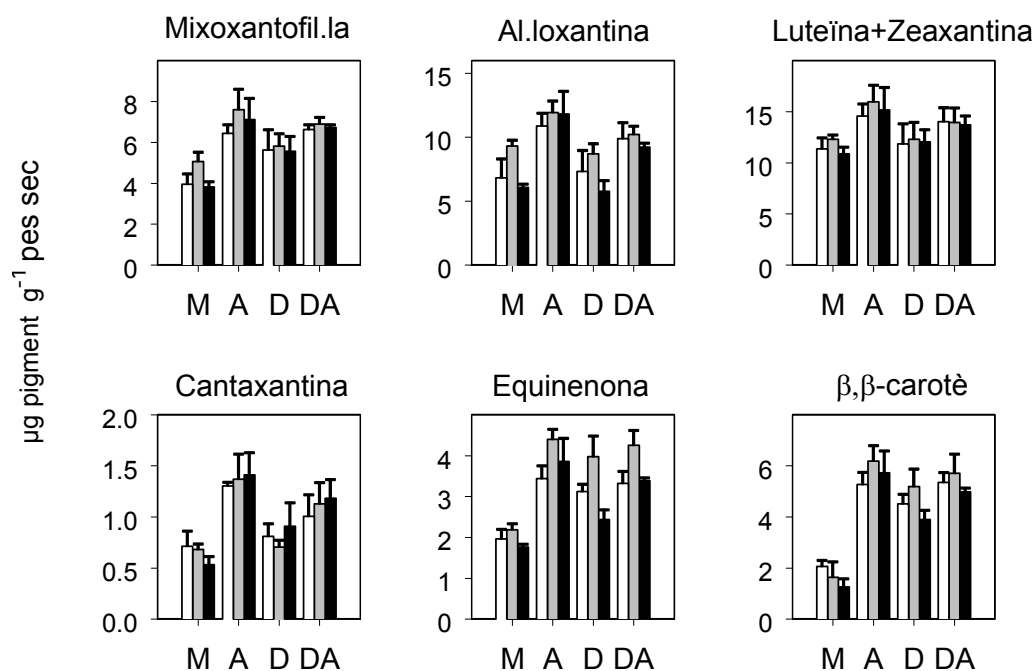


Figura 2.5. Concentracions de carotenoides obtingudes amb cada dissolvent (M, metanol 90%; A, acetona 90%; D, dimetil-sulfòxid 100%; DA, dimetil-sulfòxid i acetona a parts iguals) i protocol d'extracció. L'ordre dels histogrames correspon als diferents protocols d'extracció: sonicant i mantenint la mostra 12 h a 4 °C abans d'analitzar-la (SO, blanc), sonicant i analitzant la mostra immediatament (SS, gris), sense sonicar la mostra i mantenint-la 12 h a 4 °C abans d'analitzar-la (NO, negre).

L'elevada concentració de feofitina b2 en utilitzar acetona 90% amb el protocol NO (Figura 2.6) era un artefacte degut al solapament, en el cromatograma, del pic 26 amb el 25, sobreestimàvem la feofitina b2 (26) en detriment de la feofitina a1 (25).

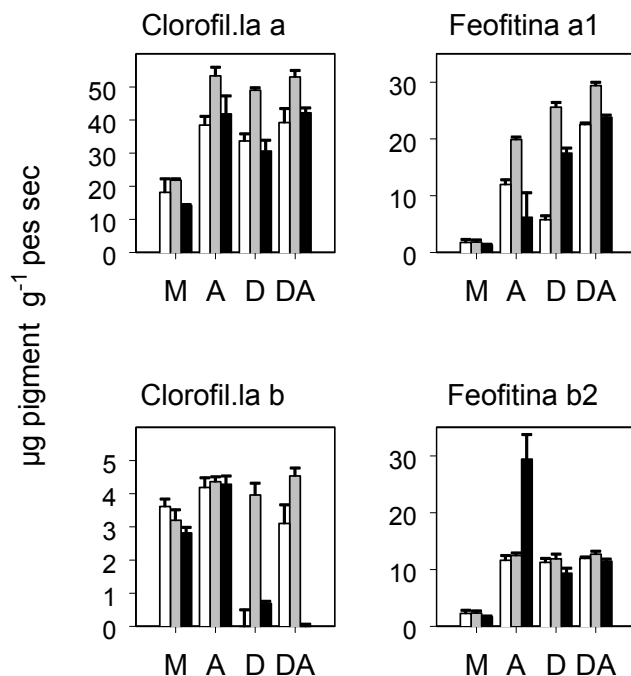


Figura 2.6. Concentracions de forbines obtingudes amb cada dissolvent (M, metanol 90%; A, acetona 90%; D, dimetil-sulfòxid 100%; DA, dimetil-sulfòxid i acetona a parts iguals) i protocol d'extracció. L'ordre dels histogrames correspon als diferents protocols d'extracció: sonicant i mantenint la mostra 12 h a 4 °C abans d'analitzar-la (SO, blanc), sonicant i analitzant la mostra immediatament (SS, gris), sense sonicar la mostra i mantenint-la 12 h a 4 °C abans d'analitzar-la (NO, negre).

Discussió

L'acetona al 90% ha estat tradicionalment utilitzada en oceanografia per molts autors (p.e. Humphrey i Wooton, 1966; Strickland i Parsons, 1972; Parsons *et al.*, 1984) i es considera el dissolvent clàssic d'extracció sobretot si es vol analitzar els pigments per espectrofotometria donat que les equacions que s'apliquen per calcular les concentracions de pigments estan calibrades per aquest dissolvent. Segons Barrett i Jeffrey (1964, 1971) convé utilitzar l'acetona amb una proporció d'aigua reduïda ja que, com més augmenta la proporció d'aquesta, més augmenta l'activitat de la clorofil·lassa, enzim que catalitza la hidròlisi de les clorofil·les a i b cap a les seves respectives clorofil·lides. Per altra banda,

molts autors asseguren que el metanol és més eficient extractant que l'acetona (Marker, 1972; Rai, 1973; Sand-Jensen, 1976; Holm-Hansen i Riemann, 1978; Stauffer *et al.*, 1979), existeixen però discrepàncies alhora de decidir si convé o no utilitzar-lo perquè el seu poder d'extracció varia segons els grups algals. Segons Bowles *et al.* (1985), amb l'acetona s'aconsegueixen millors resultats que amb el metanol en extractar pigments de cianobacteris d'aigües dolces. També sembla ser que el metanol pot facilitar la formació d'olòmers de clorofil·les (Diehn i Seely, 1968) que tot i ser detectats i quantificats per HPLC són productes de degradació no desitjables.

En les mostres de sediment analitzades la utilització de dissolvents amb un cert percentatge d'aigua (metanol 90% i acetona 90%) ofería millor resolució de pics en els cromatogrames que la utilització de dimetil-sulfòxid (DMSO) 100% o d'aquest en combinació amb acetona, el que permetia una integració i posterior quantificació més reproducible. Pel que fa al DMSO, es tracta d'un dissolvent amb un elevat poder de penetració en els teixits vegetals tot i que presenta l'inconvenient de cristal·litzar a temperatura ambient fet que en complica la manipulació al laboratori. La seva capacitat d'extracció també varia segons les espècies (Shoaf i Lium, 1976). En les mostres de sediment analitzades però, no només no donava millors resultats que l'acetona 90% sinó que a més a més portava a la formació de feoforbis que emascaraven la detecció d'altres pigments com ara l'astaxantina (9z).

Un cop la mostra havia estat sonicada els millors resultats s'obtenien analitzant-la immediatament (protocol SS). Deixar la mostra durant més temps amb el dissolvent no augmentava la concentració de pigment sinó tot el contrari. Les mostres que es van deixar durant 12 hores a les fosques i a 4 °C després d'haver-les sonicat (protocol SO) presentaven senyals de degradació de part dels pigments ja que en general les concentracions de pigment obtingudes amb el protocol SO se situaven sempre per sota de les obtingudes amb el protocol SS. Les concentracions obtingudes amb el protocol SO quedaven sempre per sota les obtingudes amb el protocol NO quan l'extracte es realitzava amb acetona 90%, en canvi hi quedaven per sobre quan es realitzava amb metanol 90%. Aquest resultat podria estar relacionat amb l'estabilitat dels pigments en diferents dissolvents i suggereix que després de sonicar la mostra l'extracte realitzat utilitzant acetona 90% era més inestable que el realitzat utilitzant metanol 90%.

Tot i que el metanol ha estat recomanat per el Scientific Committee on Oceanic Research (SCOR) com el dissolvent més adequat per a l'extracció de pigments de fitoplàncton d'origen marí (Wright *et al.*, 1997), en mostres de sediments lacustres l'acetona apareix com el dissolvent més indicat en combinació amb una tècnica disruptiva com és aplicar ultrasons.

Efecte de liofilitzar les mostres en la concentració d'alguns pigments

El contingut d'aigua al llarg d'un testimoni de sediment pot variar segons la seva porositat que alhora depèn de la mida de les partícules i de la compactació del sediment. Una extracció de pigments eficient i reproducible requereix que els sediments continguin una

proporció constant i baixa d'aigua. Aquesta condició es pot assolir més fàcilment realitzant l'extracte a partir de sediment sec. L'assecat del sediment congelat (liofilització) es produeix en el buit (<0.1 Pa) per evitar l'oxidació dels pigments. Aquest tractament previ de la mostra ha estat utilitzat per diferents autors (p.e. Leavitt *et al.*, 1989) tot i que altres han trobat que liofilitzar el sediment redueix les concentracions de pigment fins un màxim del 90% i un 60% de mitjana, essent alguns pigments més afectats que d'altres (Riaux-Gobin *et al.*, 1987).

Material i mètodes

L'efecte de liofilitzar les mostres en la concentració de pigments es va estudiar a partir de cinc mostres que pertanyien a diferents fondàries d'un mateix testimoni de sediment i que es trobaven inicialment congelades (-20 °C). Es va separar una part del sediment per ser liofilitzat (durant 12 hores) i la resta es va conservar congelat fins el moment de l'extracció. El sediment un cop liofilitzat s'emmagatzemava a -20 °C en bosses de plàstic precintades fins al moment de l'extracció (tres dies més tard). El percentatge d'aigua en les mostres congelades oscil·lava entre un 40 i un 70%.

L'extracció dels pigments es va realitzar per una banda a partir d'entre 150 i 190 mg de sediment liofilitzat als que s'afegia 4 mL d'acetona al 90% i per altra a partir d'entre 430 i 740 mg de sediment congelat (humit) als que s'afegia 4 mL d'acetona 100% de manera que en qualsevol cas el percentatge d'aigua es mantenia sempre igual o inferior al 10%. El volum final de dissolvent en les mostres congelades es determinava exactament un cop conegut el percentatge d'aigua de cada mostra. Per facilitar l'extracció les mostres se sonicaven durant 2 minuts (seguint els mateixos passos que en l'apartat anterior) i l'extracte es filtrava a través d'un filtre de membrana Anodisc de 0.1 µm (Ø 25 mm).

En el sistema cromatogràfic es va utilitzar la fase mòbil del mètode de Kraay *et al.* (1992) amb algunes modificacions en el gradient i flux d'eluent (taula de la figura 2.10) i una columna Spherisorb-ODS1 (Taula 1.1). El volum de mostra injectat era de 40 µL. Les concentracions de pigment es van expressar en µg de pigment per g de pes sec de sediment (µg g⁻¹).

Resultats i discussió

Els cromatogrames obtinguts a partir dels extractes de material liofilitzat i humit presentaven una resolució de pics similar. Qualitativament no es veien diferències pel que fa al nombre i característiques espectrals dels pics separats en cada cas (Figura 2.7). Liofilitzar les mostres no donava lloc a derivats detectables. Es van identificar un gran nombre de pigments que incloïen pigments de bacteris fotosintètics del sofre com l'isorenieratè (18.9), l'oquenona (17.2) i dos homòlegs de la bacterioclorofil·la e (9.9b, 9.9c).

Els pigments que apareixien de manera més freqüent es van quantificar i van ser els utilitzats per realitzar la comparació. Les concentracions que es van mesurar d'aquests pigments eren en general lleugerament superiors quan es realitzava l'extracte a partir de sediment humit que quan es feia a partir de sediment liofilitzat. Es va buscar la relació que existia entre els dos mètodes per cada pigment fent una regressió lineal i es van ordenar els valors del coeficient de l'equació (Taula 2.2).

El β,β -carotè i el β,ϵ -carotè eren els dos pigments que presentaven un valor més alt d'aquest coeficient de manera que es mesurava el doble de concentració quan l'extracte es feia a partir de sediment humit. Altres quedaven pròxims a doblar-les com ara un epímer de la Chl-a, la feofitina b1, l'isorenieratè i el pic UV-A1. Un bon nombre de pigments, dins els que s'inclouïen pràcticament totes les xantofil·les i les forbines més abundants, prenen un valor del coeficient pròxim a 1. La Chl-a i la feofitina a2 van ser els pigments menys afectats.

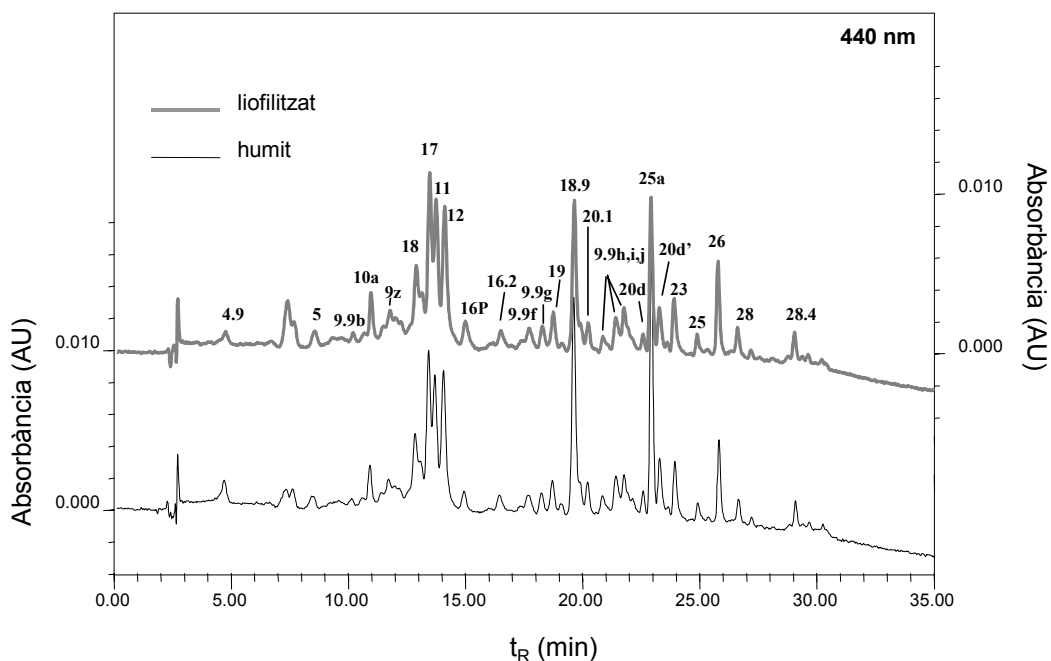


Figura 2.7. Cromatogrames obtinguts en analitzar dues mostres de sediment, una extractada a partir de sediment liofilitzat, en gris; i l'altra extractada a partir de sediment humit, en negre. Els pigments separats en els dos cromatogrames van ser els mateixos UV-A1 (4.9), fucoxantina (5), bacterioclorofil·la e2 (9.9b), diadinoxantina (10a), astaxantina (9z), al·loxantina (18), diatoxantina (17), luteïna (11), zeaxantina (12), cantaxantina-like (16P), carotenoide no identificat Car16_2 (16.2), forbina no identificada Ph9_9f (9.9f) i Ph9_9g (9.9g), clorofil·la a (19), isorenieratè (18.9), carotenoide no identificat Car20_1 (20.1), forbines no identificades Ph9_9h,i,j (9.9h,i,j), β,ϵ -carotè (20d), β,β -carotè (25a), carotenoide no identificat Car20d' (20d'), feofitina b1 (23), feofitina a1 (25), feofitina b2 (26), feofitina a2 (28), forbina no identificada Ph28_4 (28.4).

2. ANÀLISI DE PIGMENTS EN MOSTRES DE SEDIMENT

Taula 2.2. Valors dels coeficients d'una equació de tipus $y = a + bx$ on y és la concentració de pigment obtinguda a partir d'extractes de sediment humit, x és la concentració de pigment a partir d'extractes de sediment liofilitzat, a és el punt d'encreuament amb l'eix d'abcises i b és el pendent de la recta. Els pigments quantificats són els que apareixien amb major freqüència i en concentracions mesurables.

Codi	Pigment	a	b	R ²	p -value	
25a	β,β -carotè	-1.0039	2.3058	0.9935	0.00022	
20d	β,ϵ -carotè	-0.0991	1.9492	0.9759	0.00159	
19e	Epímer	-1.2967	1.8551	0.9795	0.01033	
23	Feofitina b1	-1.1092	1.7681	0.8826	0.01772	
18.9	Isorenieratè	0.1012	1.7247	0.9443	0.00568	
4.9	UV-A1	0.3030	1.5317	0.8161	0.09662	ns
20d'	Car20d'	0.3464	1.4964	0.9559	0.00398	
9.9c	Bacterioclorofil-la e3-like	-0.1497	1.3573	0.9714	0.00207	
9z	Astaxantina	-0.3249	1.3106	0.9860	0.00702	
21	Equinenona	0.1876	1.2967	0.9584	0.02101	
16.2	Car16.2	-0.1619	1.2818	0.9786	0.00133	
10a	Diadinoxantina	-0.2942	1.2736	0.9916	0.00032	
5	Fucoxantina	-0.1887	1.2617	0.9957	0.00011	
17.2	Oquenona	0.8342	1.2548	0.9918	0.05759	ns
17	Diatoxantina	-0.2584	1.2449	0.9936	0.00021	
12	Zeaxantina	0.0330	1.1898	0.9951	0.00014	
11	Luteïna	-0.1090	1.1885	0.9977	0.00004	
18	Al-loxantina	-0.0269	1.1676	0.9994	0.000006	
26	Feofitina b2	-0.0649	1.1013	0.9859	0.00071	
28	Feofitina a2	0.0200	1.0180	0.9529	0.00439	
19	Clorofil-la a	0.5482	1.0131	0.8711	0.02047	
18'	Car18'	0.1596	0.9849	0.9904	0.00040	
20.1	Car20.1	0.7567	0.8920	0.7370	0.1415	ns
9.9b	Bacterioclorofil-la e2-like	0.0343	0.8518	0.9963	0.00009	
16P	Cantaxantina-like	0.1020	0.8003	0.9628	0.01876	
17d	Mixoxantofil-la-like	0.3879	0.7554	0.8602	0.07252	ns
25	Feofitina a1	0.8832	0.5990	0.4157	0.2401	ns

N=5

Liofilitzar les mostres reduïa la concentració mesurada de pigments en un 28 % de mitjana amb el mètode utilitzat. En alguns pigments com el β,β -carotè, β,ϵ -carotè, epímer de Chl-a, feofitina b1, isorenieratè i UV-A1 la reducció superava el 50 %. Les diferències tot i existir no eren tan grans com les trobades per altres autors que, treballant en un rang més reduït de concentracions, fins i tot van descriure canvis en la polaritat d'alguns pigments (Riaux-Gobin *et al.*, 1987).

A banda dels resultats obtinguts, utilitzar sediment humit presenta un clar inconvenient i aquest és que cal conèixer la quantitat d'aigua de cada mostra per saber quina quantitat d'acetona 100% hem d'afegir per mantenir la concentració final per sobre

el 90%. Utilitzant sediment humit, la concentració final d'acetona variava segons la mostra entre els valors de 90 i 95% i encanvi utilitzant sediment liofilitzat sempre era de 90%. En un estudi previ (dades no publicades) que es va realitzar utilitzant acetona 90% per extreure tan mostres liofilitzades com humides (de manera que en els extractes a partir de mostres humides el percentatge d'aigua se situava per sobre el 10%), els resultats eren els oposats als que es troben ara. L'utilització d'un volum fix d'acetona per extreure sediment humit implica que aquest volum ha de ser prou gran com per evitar sobrepassar el 10% d'aigua en l'extracte i això també vol dir que els extractes finals serien menys concentrats i que per detectar petits pics s'hauria d'injectar volums més grans a l'aparell, el que podria fer perdre la resolució de pics en el cromatograma. Sembla important doncs, mantenir el percentatge d'aigua per sota el 10% per evitar la degradació de pigments i també per facilitar una millor extracció d'aquests.

Efecte d'utilitzar diferents columnes en la resolució, composició i quantificació de pics

En funció de la combinació de paràmetres que caracteritzen les propietats d'una columna, aquestes es classifiquen segons si tenen recobriments monomèrics, intermedis o polimèrics. Les que tenen més acceptació són les monomèriques i les que menys les polimèriques. La raó principal de la poca acceptació de les columnes polimèriques C18 és la feble retenció dels carotenoides degut a una baixa càrrega de carboni associada a un porus ample i una superfície de cobertura baixa. Per evitar aquesta limitació Sander i Wise (1990) van proposar enllaçar silans polifuncionals a síliques amb molta superfície o bé augmentar la longitud de la cadena alquil fins a 20 o 30 carbonis enlloc dels 18 convencionals. La columna YMC30 és un exemple d'aquest tipus de columnes i va ser dissenyada específicament per analitzar carotenoides molt similars estructuralment (Sander *et al.*, 1994) mentre que la Nova-Pak és una columna més genèrica i la Spherisorb-ODS1 és molt semblant en característiques a la Nova-Pak però té una longitud superior i és *no end-capped* com la YMC30.

L'objectiu era veure el comportament d'aquestes columnes alhora d'analitzar extractes amb una elevada complexitat de pics com és el cas dels obtinguts a partir de mostres de sediment.

Spherisorb-ODS1 respecte YMC30 en una sèrie de patrons de Chl-a

Les diferències entre les dues columnes C18 afectaven principalment la resolució de pics. Utilitzant la fase mòbil basada en el mètode de Kraay *et al.* (1992) amb la Nova-Pak C18 (per exemple Figura 2.1) es podia separar en només 25 minuts d'anàlisi un nombre important de pics però no es resolien la luteïna (11) de la zeaxantina (12) i tampoc es resolien bé pigments més polars com ara la fucoxantina (5). En canvi, les diferències no afectaven

la quantificació mesurada amb una sèrie de patrons de Chl-a en el rang de concentracions per sota els $6 \mu\text{g L}^{-1}$. La concentració de pigment mesurada amb la Spherisorb-ODS1 i la mesurada amb la Nova-Pak C18 era pràcticament la mateixa ($r^2 = 0.999$; pendent = 1.007) i molt semblant als valors obtinguts amb la YMC30 ($r^2 = 0.999$; pendent = 0.915) (Figura 2.9).

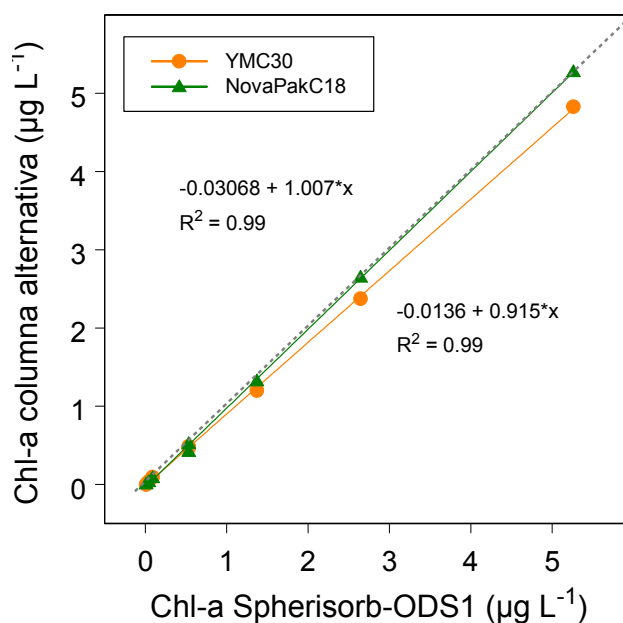


Figura 2.9. Comparació de les concentracions de Chl-a determinades per HPLC utilitzant la Spherisorb-ODS1 amb les obtingudes amb la Nova-Pak i la YMC30.

Spherisorb-ODS1 respecte YMC30 en mostres de sediment

Per estudiar la relació entre la concentració mesurada amb una C18 i la mesurada amb una C30 en un nombre més gran de pigments, es van analitzar mostres de cinc testimonis de sediment (dues mostres per testimoni a diferent fondària) que provenien de cinc llacs de caràcter eutròfic de l'Europa Central. Les diferències entre columnes es van trobar en primer lloc en l'ordre d'elució dels pics (Figura 2.10).

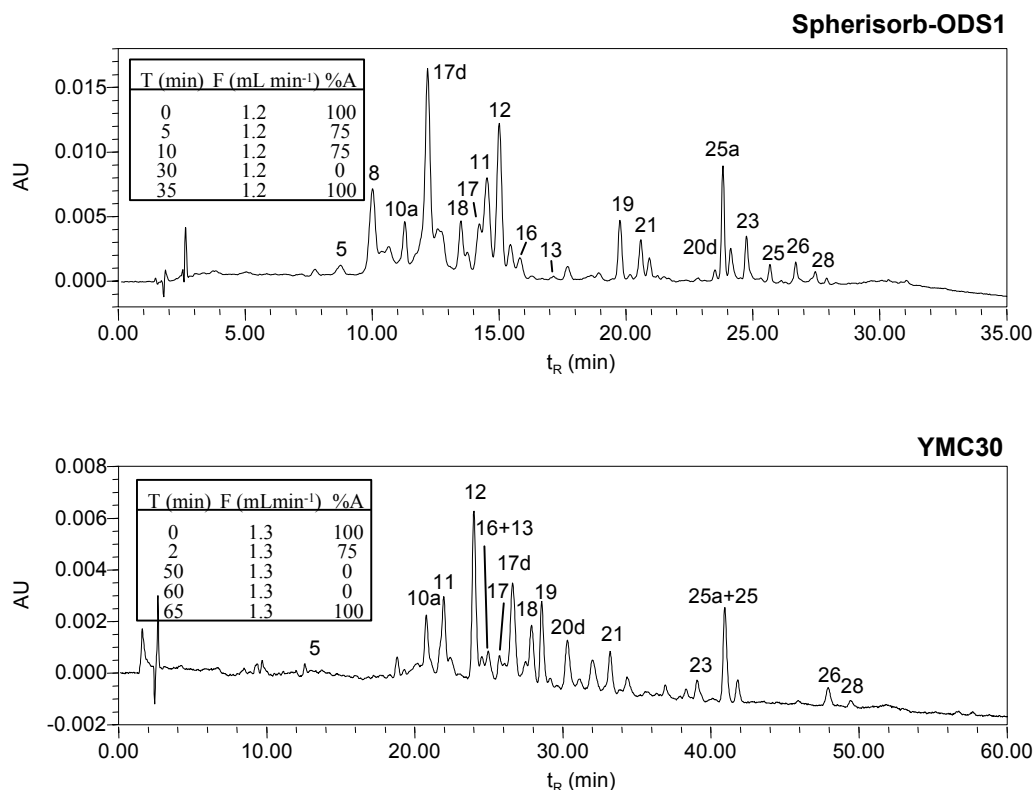


Figura 2.10. Cromatogrames (440nm) obtinguts a partir de l'anàlisi d'una mostra de sediment del llac Baldeggersee (Suïssa). Les modificacions en el gradient i flux d'eluent es troben resumides en les respectives taules de cada figura on T és el temps en que canvia el percentatge de cada eluent i F és el flux al que circula la fase mòbil. Els pigments incloïen fucoxantina (5), oscil·laxantina (8), diatinoxantina (10a), luteïna (11), mixoxantofil·la (17d), zeaxantina (12), al·loxantina (18), diatinoxantina (17), cantaxantina (16), Chl-b (13), Chl-a (19), equinenona (21), β,ϵ -carotè (20d), β,β -carotè (25a), feofitina b1 (23), feofitina a1 (25), feofitina b2 (26) i feofitina a2 (28).

En general la C30 presentava una millor resolució de pics, si més no pels que eren de major interès com a marcadors taxonòmics, especialment pel conjunt al·loxantina (18), diatinoxantina (17), luteïna (11) i zeaxantina (12). La cantaxantina i la Chl-b coelueïen (16+13) si coincidien en un cromatograma i el mateix passava amb el β,β -carotè i la feofitina a1 (25a+25) el que en dificultava la quantificació neta del carotenoide. La composició de pics era la mateixa amb les dues columnes llevat de la oscil·laxantina (8) que només es detectava amb la C18 (Figura 2.10).

Les concentracions de pigment calculades a partir de cada columna eren lleugerament diferents. Pel que fa a pigments clorofil·lics (forbines), la relació entre les dues columnes dins el rang comprès entre 0 i 70 $\mu\text{g g}^{-1}$ de pes sec de sediment i considerant tots els pigments seguia l'equació de la figura 2.11a ($r^2 = 0.897$; $p \ll 0.001$). La relació però variava

segons el pigment. La Chl-a era l'únic pigment que mantenia una relació 1:1 mentre per a la resta de forbines la concentració mesurada era sempre superior amb la C18 que amb la C30. Respecte els carotenoides, en el rang de concentració entre 0 i 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de pes sec, la concentració de fucoxantina mesurada en les dues columnes mantenia una relació 1:1, en canvi en altres pigments com la mixoxantofil·la el residu en la regressió podia ser molt alt. La concentració de β,β -carotè era sobreestimada amb la C30 donat que, com ja s'ha comentat, aquest pigment coel·luïa en l'anàlisi amb una feofitina a1 (25). Aquesta feofitina que coel·luïa podia ser quantificada a partir d'un cromatograma a 660 nm donat que els carotens no presenten absorció a aquesta longitud d'ona. En considerar el conjunt de carotenoides la relació la descrivia l'equació de la figura 2.11b ($r^2 = 0.729$; $p \ll 0.001$), és a dir en general la detecció tornava a ser superior amb la C18.

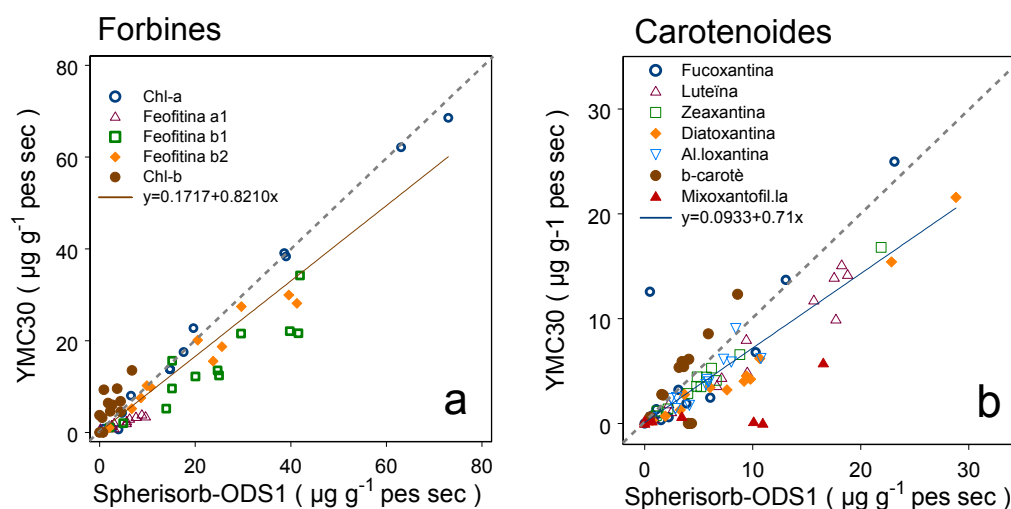


Figura 2.11. Forbines (a) i carotenoides (b) en el sediment de 5 llacs europeus de caràcter eutròfic, quantificades amb dues columnes cromatogràfiques diferents.

Conclusions

L'efecte de la interacció dels grups silanol residuals en les columnes *no end-capped* s'ha vist que és beneficiosa en la separació d'isòmers conflictius com ara la luteïna i la zeaxantina. Els resultats obtinguts amb la Spherisorb-ODS1 coincideixen amb els obtinguts per Sander *et al.* (1994) que desaconsellen la utilització de *end-capping* per a la separació d'aquest tipus de molècules.

Els recobriments polimèrics com el que presenta la YMC30 ofereixen una millor selectivitat de mides que els monomèrics (Sander i Wise, 1990). En mostres amb una composició heterogènia de pigments, això es traduïa en una millor resolució de pics el que simplificava el disseny d'un protocol d'integració de pics automatitzat que permetia agilitzar el tractament de les dades. Aquesta selectivitat de mides però jugava en detriment d'una

pèrdua en l'eficiència de la columna que derivava en una menor recuperació de pigment a la sortida de la YMC30 mesurada tant en la sèrie de patrons de Chl-a com en alguns pigments de mostres naturals. En mostres naturals amb una composició de pics complexa, la relació entre la concentració de pigment mesurada a partir de cada columna es conservava en aquells pigments que apareixien en el cromatograma en una zona sense solapament de pics, com passava amb la fucoxantina i la Chl-a. Per a la resta de pigments, ja fossin forbines o carotenoides, les concentracions amb la Spherisorb-ODS1 eren lleugerament superiors. Aquest fet també podria estar relacionat amb una integració deficient degut a l'elevat grau de solapament entre els pics. La YMC30 presentava però dos clars desavantatges. Tot i tractar-se d'una columna més específica per a carotenoides que la Spherisorb-ODS1, no permetia detectar pigments d'interès taxonòmic com ara la oscil·laxantina ni resolía la cantaxantina de la Ch-b o el β,β -carotè de la feofitina a1. El darrer aspecte a tenir en compte estava relacionat amb l'estalvi, l'anàlisi amb la Spherisorb-ODS1 era més curt amb el que s'economitzava en temps i despesa d'eluent tot i que després requeria una revisió manual de les integracions.